

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МРНК ВАКЦИН ПРОТИВ *M. TUBERCULOSIS* НА ОСНОВЕ ЛИНЕЙНЫХ И КОЛЬЦЕВЫХ РНК

А. С. Киршина¹, Г. С. Шепелькова², А. С. Хлебникова¹, А. А. Маслов¹, А. В. Козлова¹, Д. А. Кунык¹, В. В. Еремеев², Р. А. Иванов¹, В. В. Решетников¹✉

¹ Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

² Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Успехи вакцинных препаратов на основе мРНК против вирусных инфекций побудили многих исследователей к разработке мРНК-вакцин против бактериальных инфекций. Разработка новой вакцины против туберкулеза является актуальной задачей, поскольку единственная одобренная к использованию вакцина BCG, хотя и снижает риск развития тяжелых форм заболевания, не является достаточно эффективной для предотвращения инфицирования. Целью исследования было сравнить две мРНК-вакцины против туберкулеза на основе классической линейной мРНК (mRNA-MTB-mEp-5-1) и на основе кольцевой мРНК (circRNA-MTB-mEp-5-1) по иммуногенности и способности защищать мышей I/St от заражения *M. tuberculosis*. Эффективность мРНК-вакцин в составе с липидными наночастицами сравнивали с эффективностью BCG. Результаты свидетельствуют о том, что иммунизация мРНК-вакциной на основе линейной мРНК привела к формированию клеточного и гуморального иммунного ответа (OD IgG = 0,36 ± 0,12), который был менее выражен, чем после вакцинации BCG (OD IgG = 0,54 ± 0,14). В то же время иммунизация мРНК-вакциной и BCG обеспечила сопоставимое снижение бактериальной нагрузки в легких и селезенке экспериментальных мышей (КОЕ в легочной ткани BCG: 4,00 × 10⁵ ± 2,13 × 10⁵, *p* = 0,0068; линРНК: 4,72 × 10⁵ ± 3,44 × 10⁵, *p* = 0,0059; LNP: 4,91 × 10⁵ ± 3,89 × 10⁵, ns; PBS: 4,01 × 10⁶ ± 1,69 × 10⁶) и повысила их выживаемость после заражения *M. tuberculosis*. Иммунизация вакциной на основе кольцевой мРНК привела к формированию только гуморального иммунитета (OD IgG = 0,52 ± 0,13) и не обеспечила защиту после заражения *M. tuberculosis* (КОЕ в легких колРНК: 2,12 × 10⁶ ± 5,30 × 10⁵, *p* = 0,85). Таким образом, в наших исследованиях противотуберкулезные вакцины на основе кольцевых мРНК уступают в эффективности препаратам на основе линейных РНК.

Ключевые слова: мРНК-вакцина, кольцевые мРНК, туберкулез, иммуногенность, протективный иммунитет

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания ФГБНУ «ЦНИИТ», тема НИР FURE-2025-0018.

Благодарности: авторы выражают благодарность сотруднику АНО ВО «Университет «Сириус» О. В. Заборовой за формулировку мРНК в липидные наночастицы, а также сотруднице лаборатории биотехнологии ФГБНУ «ЦНИИТ» Е. И. Чебанюк за помощь в работе с животными и постановке экспериментов на линейных мышах.

Вклад авторов: А. С. Киршина, Хлебникова А. С. — подготовка мРНК-вакцины, планирование эксперимента, написание рукописи; А. В. Козлова, Д. А. Кунык, А. А. Маслов — подготовка мРНК-вакцины; Г. С. Шепелькова — постановка экспериментов, анализ результатов; В. В. Еремеев, Р. А. Иванов — планирование эксперимента, редактирование рукописи; В. В. Решетников — подготовка мРНК-вакцины, планирование эксперимента, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «ЦНИИТ» (протокол № 3/2 от 11 мая 2022 г.), проведено в соответствии с Приказом Минздрава № 755 и Руководством Управления по охране лабораторных животных А5502-01.

✉ **Для корреспонденции:** Василий Владимирович Решетников

Олимпийский пр-т, д. 1, г. Сочи, 354340; Россия; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru, Еремеев Владимир Витальевич, Яузская ал. д. 2, г. Москва, 107564; Россия; yeremeev56@mail.ru

Статья получена: 22.07.2025 **Статья принята к печати:** 17.08.2025 **Опубликована онлайн:** 26.08.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.040

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

COMPARISON OF THE EFFICACY OF MRNA VACCINES AGAINST *M. TUBERCULOSIS* BASED ON LINEAR AND CIRCULAR RNAs

Kirshina AS¹, Shepelkova GS², Khlebnikova AS¹, Maslov AA¹, Kozlova AV¹, Kunyk DA¹, Yeremeev VV², Ivanov RA¹, Reshetnikov VV¹ ✉

¹ Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia

² Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

The success of mRNA-based vaccine formulations against viral infections motivated many researchers to develop mRNA vaccines against bacterial infections. The development of new anti-tuberculosis vaccine is an urgent task since the only approved BCG vaccine is not effective enough in terms of infection prevention, despite the fact that it reduces the risk of severe disease. The study aimed to compare two anti-tuberculosis mRNA vaccines based on the classic linear mRNA (mRNA-MTB-mEp-5-1) and circular RNA (circRNA-MTB-mEp-5-1) by immunogenicity and the capability of protecting I/St mice against *M. tuberculosis* infection. The efficacy of mRNA vaccines in the formulations with lipid nanoparticles was compared with the BCG efficacy. The findings suggest that immunization with the mRNA vaccine based on the linear mRNA resulted in the cell-based and humoral immune response (OD IgG = 0.36 ± 0.12) that was less pronounced than after BCG vaccination (OD IgG = 0.54 ± 0.14). At the same time, immunization with the mRNA vaccine and BCG ensured comparable reduction of bacterial load in the lung and spleen of experimental mice (CFU in lung tissue for BCG: 4.00 × 10⁵ ± 2.13 × 10⁵, *p* = 0.0068; mRNA: 4.72 × 10⁵ ± 3.44 × 10⁵, *p* = 0.0059; LNP: 4.91 × 10⁵ ± 3.89 × 10⁵, ns; PBS: 4.01 × 10⁶ ± 1.69 × 10⁶) and increased survival of mice after getting infected with *M. tuberculosis*. Immunization with the vaccine based on the circular RNA resulted in developing humoral immunity only (OD IgG = 0.52 ± 0.13) and did not ensure protection after getting infected with *M. tuberculosis* (CFU in the lung for circRNA: 2.12 × 10⁶ ± 5.30 × 10⁵, *p* = 0.85). Thus, in our studies, anti-tuberculosis vaccines based on circular RNAs are inferior in effectiveness to formulations based on linear RNAs.

Keywords: mRNA vaccine, circular RNA, tuberculosis, immunogenicity, protective immunity

Funding: the study was conducted within the framework of the State Assignment of the Central Tuberculosis Research Institute, R&D project: FURE-2025-0018.

Acknowledgements: the authors express their gratitude to O.V. Zaborova, staff member of the Sirius University of Science and Technology, for formulation of mRNA into lipid nanoparticles and E.I. Chebanyuk, staff member of the biotechnology laboratory of the Central Tuberculosis Research Institute, for assistance in animal handling and setting the experiments involving lineal mice.

Author contribution: Kirshina AS, Khlebnikova AS — mRNA vaccine preparation, planning the experiment, manuscript writing; Kozlova AV, Kunyk DA, Maslov AA — mRNA vaccine preparation; Shepelkova GS — experimental procedure, data analysis; Yeremeev VV, Ivanov RA — planning the experiment, manuscript editing; Reshetnikov VV — mRNA vaccine preparation, planning the experiment, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Central Tuberculosis Research Institute (protocol No. 3/2 dated 11 May 2022) and conducted in accordance with the Order of the Ministry of Health No. 755 and the Guidelines issued by the Office of Laboratory Animal Welfare (A5502-01).

✉ **Correspondence should be addressed:** Vasily V. Reshetnikov

Olimpiyskiy prospekt, 1, Sochi, 354340, Russia; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru, Vladimir V. Yeremeev, Yauzskaya alleya, 2, Moscow, 107564; Russia; yeremeev56@mail.ru

Received: 22.07.2025 **Accepted:** 17.08.2025 **Published online:** 26.08.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.040

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Туберкулез (ТБ) — это высококонтагиозное заболевание, вызываемое бактерией *Mycobacterium tuberculosis*, которое и на сегодняшний день остается первой причиной смерти от инфекционных заболеваний. В 2023 г. было зарегистрировано 10,8 млн случаев заболевания ТБ и 1,25 млн смертей от данной инфекции [1]. Профилактика туберкулеза осложняется частым бессимптомным течением начала заболевания и поздней манифестацией, что затрудняет отслеживание эпидемиологической ситуации. Дополнительные проблемы связаны с распространением микобактерий, устойчивых к противомикробным препаратам. ТБ до сих пор остается опасным заболеванием, и поиск эффективных способов профилактики и лечения является актуальной задачей.

Разработка и внедрение новой противотуберкулезной вакцины являются важнейшим шагом на пути к элиминации этой опасной инфекции. Вакцина BCG не рекомендована Всемирной организацией здравоохранения для профилактики туберкулеза у взрослых из-за риска развития нежелательных побочных реакций. К недостаткам BCG можно также отнести вариабельную эффективность в разных географических регионах, гетерогенность штаммов и низкую эффективность против наиболее распространенной формы туберкулеза — туберкулеза легких [2]. Таким образом, существует острая необходимость в создании новых препаратов, способных предотвратить развитие ТБ во всех возрастных группах. В настоящее время около 15 вакцин находятся в стадии клинической разработки на разных этапах: от I до III фазы клинических испытаний [3]. Все они представляют собой разнообразные типы препаратов: на основе вирусных векторов, инактивированные микобактерии, живые аттенуированные микобактерии, субъединичные белковые и мРНК-вакцины.

мРНК-вакцины стали активно использовать благодаря успеху вакцин RNA-1273 (Moderna) и BNT162b2 (Pfizer) против SARS-CoV2 [4]. Данный подход в вакцинации обладает целым рядом преимуществ по сравнению с другими вариантами иммунизации — низкой стоимостью производства, быстрой разработкой, высокой эффективностью, неинфекционностью и отсутствием интеграции в геном. В то же время опыт применения мРНК-вакцин против инфекционных заболеваний, вызванных бактериями, ограничен [5]. К тому же не все мРНК-препараты высокоэффективны, низкая стабильность РНК в клетке приводит к преждевременной деградации РНК, снижению трансляции целевого белка [6]. Как одно из возможных путей решения этих проблем рассматривают использование альтернативных платформ мРНК, таких как самоамплифицирующиеся или кольцевые РНК.

Кольцевые РНК были открыты в 1980-х гг., и с тех пор привлекли к себе пристальное внимание своими особенностями. В отличие от линейных мРНК, препараты на основе кольцевых РНК более устойчивы к деградации, поскольку не обладают свободными 5'- или 3'-концами, по которым идет протеолитическое расщепление [7]. Кроме того, кольцевые РНК не подвержены механизмам деградации, таким как нонсенс-опосредованный распад мРНК (англ. nonsense-mediated mRNA decay, NMD) или распад мРНК без стоп-кодона (англ. non-stop decay, NSD) [8]. Кольцевые РНК транслируются с помощью IRES (от англ. internal ribosome entry site) — опосредованного механизма, который преимущественно активируется в условиях клеточного стресса при ингибировании кэп-зависимой трансляции, и обеспечивается рекрутированием так называемых IRES-transacting factors (ITAF) вместе с eIF и eEF [9]. В настоящее время не ведутся

клинические испытания противотуберкулезных вакцин на основе кольцевой РНК [3]. В то же время препараты на основе кольцевых РНК показали высокую эффективность в экспериментальных моделях вирусных заболеваний [10, 11], и уже сейчас проходят тестирование в клинических испытаниях препаратов против ксеростомии, вызванной радиацией [NCT06714253] и SARS-CoV-2 [NCT06205524]. Мы предполагаем, что эти особенности кольцевых РНК могут позволить рассматривать препараты на основе кольцевых РНК как перспективную платформу для будущих вакцин против туберкулеза, поэтому целью нашего исследования было оценить эффективность противотуберкулезной вакцины на основе кольцевой РНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Эксперименты проводили на самках мышей инбредных линий C57BL/6J (B6) и I/StSnEgYCit (I/St) из питомника ФГБНУ «ЦНИИТ». В исследование включали животных в возрасте 2–4 месяцев и массой 20–25 г. Линии поддерживали путем братско-сестринских скрещиваний, предоставляли доступ к корму и воде *ad libitum*. В общей сложности использовали 25 самок B6 и 75 самок I/St.

Экспериментальный дизайн

Для работы сформировали по 5 экспериментальных групп для каждой из линий мышей: для мышей B6 (по 5 животных в группе) и для мышей I/St (по 15 животных в группе).

1. Группа с двукратным внутримышечным введением мРНК-вакцины mRNA-MTB-mEp5-1 в дозе 5 мкг/мышь с интервалом в 4 недели между введениями.

2. Группа с двукратным внутримышечным введением мРНК-вакцины circRNA-MTB-mEp5-1 в дозе 5 мкг/животное с интервалом в 4 недели между введениями.

3. Группа с однократным подкожным введением BCG в дозе 1×10^5 КОЕ/мышь (за 5 недель до забора тканей).

4. Группа контроля с двукратным внутримышечным введением липидных наночастиц без мРНК (LNP) в дозе, эквивалентной с введением в группах I–II, с интервалом в 4 недели между введениями.

5. Группа контроля с двукратным внутримышечным введением фосфатного буфера (PBS) с интервалом в 4 недели между введениями.

Мышей линии B6 использовали для оценки Т-клеточного ответа (ELISpot), а также для оценки титра IgG к антигенам *M. tuberculosis*.

Для оценки протективного иммунного ответа использовали мышей линии I/St, так как мыши этой линии проявляют повышенную чувствительность к туберкулезной инфекции [12]. Мышей линии I/St через 4 недели после второй вакцинации мРНК-вакцинами / через 5 недель после вакцинации BCG внутривенно инфицировали вирулентным штаммом *M. tuberculosis*. Через 50 дней после инфицирования у данных мышей оценивали микобактериальную нагрузку селезенки и легких (5 мышей в каждой группе), а также динамику гибели животных после инфицирования (10 мышей в каждой группе).

Получение мРНК-вакцин

Мультиэпитопная мРНК-вакцина MTB-mEp5-1 была подробно описана ранее [13]. Для вакцины на основе кольцевой РНК circMTB-mEp5-1 кодирующая последовательность была

идентична MTB-mEp5-1. Кассета для колРНК содержала интроны I типа из *Anabaena* (на 5'- и 3'-концах), плечи гомологии, спейсеры, IRES I типа (CVB3). Конструкция была также собрана с помощью метода ПЦР и клонирована в pSmart (Lucigen, США) по сайтам эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *AhlI*. Последовательность кольцевой мРНК MTB-mEp5-1 представлена в приложении.

Синтез РНК проводили с использованием набора mRNA-20 («Биолабмикс», Россия) с добавлением пирофосфатазы (NEB, США) и ингибитора РНКаз («Биолабмикс», Россия). Для *in vitro* транскрипции линейной РНК был использован синтетический аналог кэпа m27,3'-OGpppAmG («Биолабмикс», Россия). Для получения кольцевой РНК после завершения транскрипции в реакционную смесь добавляли гуанозинтрифосфат (GTP) до конечной концентрации 2 мМ («Биолабмикс», Россия) для индукции процесса кольцевания. Смесь инкубировали при 55 °C в течение 15 мин, охлаждали на льду в течение 5 мин и очищали на магнитных частицах (VAHTS RNA Clean Beads, Китай). Для удаления линейных форм РНК в препарате кольцевой РНК образец подвергали обработке РНКазой R (Abcam, США). Для этого РНК нагревали при 70 °C в течение 3 мин, затем быстро охлаждали на льду (5 мин). После этого добавляли 0,5 мкл РНКазы R (Abcam, США) на 20 мкг РНК и 10× буфер РНКазы R и инкубировали при 37 °C в течение 7 мин, по истечении которых добавляли еще 0,5 мкл РНКазы R, инкубировали еще 7 мин при 37 °C и очищали на магнитных частицах (VAHTS RNA Clean Beads, Китай).

По завершении *in vitro* транскрипции матрицу ДНК удаляли обработкой 2 ед. а. на 1 мкг ДНК ДНКазы I (NEB, США) при температуре 37 °C в течение 15 мин. Очистку РНК проводили с использованием магнитных частиц (VAHTS RNA Clean Beads, Китай) согласно инструкции производителя. Качество РНК оценивали капиллярным электрофорезом (Qsep1-Plus, BiOptic, Тайвань).

Формуляцию мРНК в липидные наночастицы осуществляли с помощью микрофлюидного картриджа на приборе NanoAssemblr™ Benchtop, как описано ранее [14]. РНК смешивали с раствором этанола липидной смеси в микрофлюидном картридже, водные и этанольные фазы смешивали в соотношении 3 : 1 по объему. Пятикомпонентная липидная смесь состояла из ионизированного липидоидного ALC-0315 (Sinoprep, Xiamen, Китай), SM-102 (Sinoprep, Xiamen, Китай), DSPC (Avanti Polar Lipids, США), холестерина (Merck Millipore, США) и DMG PEG-2000 (Merck Millipore, США) в молярном соотношении (%) 23,15 : 23,15 : 9,4 : 42,7 : 1,6. Частицы были сконцентрированы и стерилизованы с помощью PES-мембраны с диаметром пор 0,22 мкм. Качество полученных LNP анализировали с использованием трех параметров: размер частиц, индекс полидисперсности (PDI) (Zetasizer Ultra ZSP; Malvern PanalityCal, США) и процента загрузки мРНК в частицы. Размер частиц для образца MTB-mEp5-1 — 90,5 нм, индекс полидисперсности — 0,22. Для препарата circMTB-mEp5-1 гидродинамический диаметр был равен 85,7 нм, индекс полидисперсности — 0,19. Уровень загрузки РНК был более 90% в обоих препаратах. До момента введения препарата липидные наночастицы хранились при +4 °C не более 2 недель.

Оценка Т-клеточного ответа: определение количества IFN γ -продуцирующих клеток

Уровень протективного Т-клеточного иммунного ответа у мышей линии B6 оценивали по количеству выделенных

из селезенки клеток, секретирующих IFN γ в ответ на стимуляцию микобактериальными антигенами методом ELISpot при помощи наборов Mouse IFN γ ELISpot Set (BD; США) и AEC Substrate Set (BD; США) в соответствии с рекомендациями производителя [15]. Соникат (ультразвуковой дезинтегра́т) *M. tuberculosis* в дозе 10 мкг/мл использовали в качестве источника антигенов микобактерий. Соникат для работы был любезно предоставлен В. Г. Авдиенко. Для его получения микобактерии выращивали в синтетической среде Сотона в течение 28 дней при 37 °C. Ультразвуковой дезинтегра́т получали из отмытой бактериальной массы на ультразвуковом дезинтеграторе MSE по методике, описанной ранее В. Г. Авдиенко и соавторами [16].

Оценка гуморального иммунитета: определение титра иммуноглобулинов IgG-класса к соникату *M. tuberculosis*

В образцах сыворотки крови экспериментальных животных определяли титр иммуноглобулинов IgG-класса к соникату *M. tuberculosis*. Сыворотки крови экспериментальных мышей B6 титровали в фосфатно-солевом буфере (PBS) от 1 : 50 до 1 : 400. Интенсивность гуморального ответа оценивали по оптической плотности (OD) по ранее описанной методике [17].

Оценка протективного эффекта вакцинации

Для индукции экспериментальной туберкулезной инфекции через 4 недели после второй дозы мРНК-вакцины мышей I/St внутривенно инфицировали вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv (Pasteur) из коллекции ФГБНУ «ЦНИИТ» в дозе 5×10^5 КОЕ на мышь. Вакцинацию BCG проводили за 5 недель до инфицирования подкожно в дозе 1×10^5 КОЕ/мышь. Эксперименты по оценке выживаемости после заражения *M. tuberculosis* завершили на 111-й день после инфицирования.

Определение количества микобактерий в органах зараженных животных

Определение микобактериальной нагрузки легочной ткани и селезенки проводили на 50-й день после инфицирования (по 5 животных в группе). Для этого органы гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора. Десятикратные разведения гомогенатов высевали на агар Мидлбрука 7H10 (HiMedia Laboratories LLC, США) (по 50 мкл/чашка Петри). Через 18–21 суток подсчитывали колонии и рассчитывали КОЕ/орган по формуле: $N = 2N_1 \times P / 0,05$, где N — КОЕ в органе; N_1 — число колоний на чашке; P — разведение.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили, используя двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки для множественных сравнений для оценки титра IgG. Для данных анализа ELISpot и для данных по бактериальной нагрузке легких и селезенки иммунизированных мышей после инфицирования *M. tuberculosis* был проведен тест Данна как пост-хок-анализ к критерию Краскела–Уоллиса. Общую выживаемость оценивали методом Каплана–Мейера. Значимость различий в общей выживаемости рассчитывали с помощью логарифмического критерия рангов

Мантеля–Кокса. Различия между экспериментальными группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Анализ данных и их визуализацию производили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 10.4.1 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка иммуногенности противотуберкулезных мРНК-вакцин

Мы оценили эффективность двух различных противотуберкулезных РНК-вакцин с последовательностью антигена МТВ-мЕр-5-1 на основе линейной и кольцевой РНК. Вакцины МТВ-мЕр-5-1 и circMTB-мЕр-5-1 (рис. 1А) в составе с липидными наночастицами (LNP) были протестированы на способность активировать гуморальный (рис. 1В) и клеточный иммунные ответы (рис. 1Г) в сравнении с BCG-вакциной и контрольными группами (PBS и LNP). При иммунизации животных LNP-частицами, не содержащими мРНК, результаты исследований достоверно не отличались от таковых в группе мышей, получивших PBS.

Наиболее высокие титры антимикобактериальных IgG выявлены у групп мышей, вакцинированных BCG и circMTB-мЕр-5-1 ($p < 0,001$ для большинства разведений по сравнению с контролем; см. таблицу), при этом между BCG и circRNA-MTB-мЕр уровень IgG был сопоставим (рис. 1В; таблица). После иммунизации МТВ-мЕр-5-1 титры IgG повышались менее выражено, увеличение титра иммуноглобулинов IgG-класса по сравнению с невакцинированными животными было обнаружено лишь при разведении сыворотки 1 : 50 ($p = 0,001$). Уровень антимикобактериальных IgG после иммунизации МТВ-мЕр-5-1 уступал как по сравнению с circMTB-мЕр-5-1, так и по сравнению с BCG почти во всех вариантах разведения сыворотки (рис. 1В; таблица). Таким образом, обе мРНК-вакцины приводили к формированию гуморального иммунного ответа против *M. tuberculosis*, однако в случае с кольцевой РНК-вакциной гуморальный иммунитет был более выражен и сопоставим с уровнем иммунитета, наблюдаемым после вакцинации BCG.

Для определения способности противотуберкулезных вакцин на основе различных РНК-платформ активировать специфический клеточный иммунный ответ были оценены уровни IFN γ -продуцирующих клеток (ИПК) селезенки после стимуляции соникатом микобактерий (рис. 1Г; таблица). Наиболее высокий уровень ИПК был обнаружен у группы мышей, вакцинированных BCG (более 100 пятен, $p < 0,001$ по сравнению с контролем; таблица). Вакцинация МТВ-мЕр-5-1 также приводила к увеличению уровня ИПК по сравнению с контролем (более 20 пятен, $p = 0,026$; таблица). У мышей, иммунизированных circMTB-мЕр-5-1, уровни ИПК статистически не отличались от контрольных групп.

Таким образом, среди вакцин на основе РНК лишь circMTB-мЕр-5-1 была способна вызывать гуморальный ответ, сопоставимый с наблюдаемым при иммунизации BCG. Однако вакцинация данной вакциной не приводила к формированию Т-клеточного иммунитета. В то время как иммунизация линейной мРНК-вакциной МТВ-мЕр-5-1 приводила к формированию умеренного гуморального и клеточного иммунного ответа против микобактериальных антигенов.

Оценка протективности противотуберкулезных мРНК-вакцин

Для вакцины одним из наиболее важных критериев является ее способность формировать протективный иммунный ответ после заражения. Было проведено сравнительное исследование эффективности двух противотуберкулезных вакцин на основе разных РНК-платформ по способности защищать мышей после заражения *M. tuberculosis* (рис. 2А). На рис. 2Б и в таблице показано, что вакцинация МТВ-мЕр-5-1 и BCG способна обеспечивать снижение количества микобактерий в легких и селезенке на 50-й день после заражения по сравнению с контролем ($p = 0,007$ и $p = 0,006$ в легких, $p = 0,009$ и $p = 0,022$ в селезенке соответственно). Для мышей, провакцинированных circMTB-мЕр-5-1, после заражения статистически достоверных снижений бактериальной нагрузки в легких и селезенке по сравнению с контролем обнаружено не было.

При оценке динамики гибели мышей после инфицирования иммунизация BCG или МТВ-мЕр-5-1 обеспечивала выживаемость 8 и 7 животных из 10 в течение 111 дней после заражения *M. tuberculosis* ($p < 0,001$; таблица). Выживаемость мышей в группе контроля составляла 20%. В группе мышей, получивших circRNA-MTB-мЕр, выживаемость после инфицирования статистически не отличается от контроля, тем не менее количество выживших животных в данной группе составляло 50% (рис. 2В).

Таким образом, лишь вакцинация МТВ-мЕр-5-1 за счет снижения бактериальной нагрузки в легких и селезенке и увеличения выживаемости зараженных мышей приводила к формированию протективного иммунного ответа. Наблюдаемый протективный эффект от вакцинации данной мРНК-вакциной был сопоставим с таковым после вакцинации BCG.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании были оценены иммуногенные и протективные свойства вакцин на основе линейной и кольцевой РНК против *M. tuberculosis* в сравнении с вакциной BCG. Результаты демонстрируют, что иммунизация линейной мРНК-вакциной МТВ-мЕр-5-1 приводила к формированию адаптивного и протективного иммунного ответа, снижала бактериальную нагрузку и в легких, и в селезенке и увеличивала выживаемость зараженных мышей. Иммуногенность МТВ-мЕр-5-1 была ниже, чем после иммунизации BCG, но протективная эффективность была сопоставима с наблюдаемой после BCG.

Вакцина circMTB-мЕр-5-1 на основе кольцевой РНК оказалась менее эффективной. Наши результаты показали, что circMTB-мЕр-5-1 способна индуцировать выраженный гуморальный ответ, сопоставимый с наблюдаемым после вакцинации BCG. Однако иммунизация circMTB-мЕр-5-1 не приводила к формированию IFN γ -опосредованного Т-клеточного ответа и не обеспечивала защиту животных от заражения *M. tuberculosis*. Эти результаты показывают, что для обеспечения защиты от патогена недостаточно формирования только гуморального иммунитета, необходимо также формирование Т-клеточного иммунитета, что согласуется с результатами предыдущих исследований по противотуберкулезным вакцинам на основе нуклеиновых кислот [2].

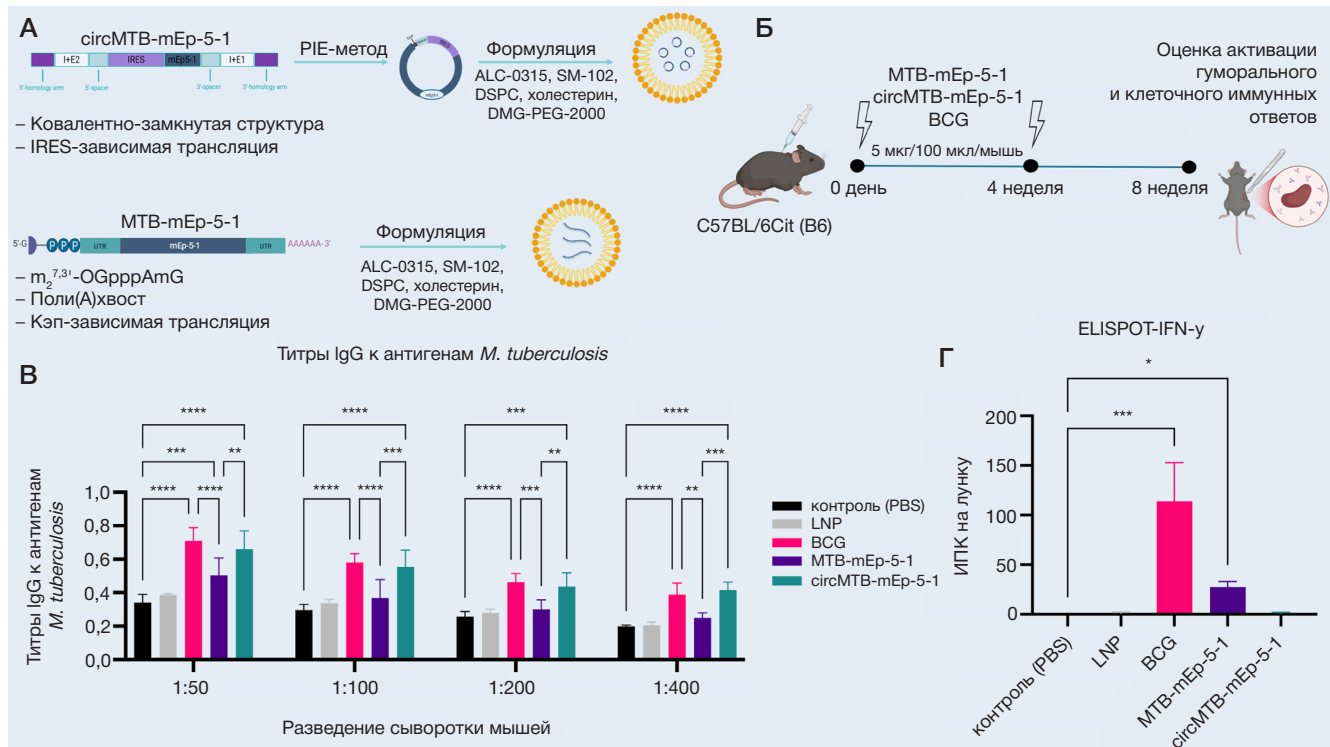


Рис. 1. Оценка иммуногенности мРНК-вакцин. **А.** Структура противотуберкулезных РНК-вакцин с последовательностью антигена MTB-mEp-5-1 на основе линейной и кольцевой РНК. **Б.** Схема постановки эксперимента. **В.** Титр иммуноглобулинов IgG-класса к антигенам *M. tuberculosis* в сыворотке крови мышей после иммунизации противотуберкулезными вакцинами. **Г.** Различия в количестве ИПК в селезенке мышей, вакцинированных различными вариантами мРНК-вакцин. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Мышей в группе $n = 5$. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$.

По всей видимости, различия в эффективности мРНК-вакцин связаны с механизмами, лежащими в основе динамики трансляции антигена. Кольцевые РНК отличаются от линейных РНК повышенной стабильностью [7]. Высокая стабильность колРНК способствует длительной продукции антигена, что может приводить к выраженному гуморальному ответу, но скорость трансляции антигена за счет IRES намного ниже, чем скорость трансляции по кэп-зависимому пути с линейной РНК [18], приводя к низкому уровню экспрессии антигена, чего может быть недостаточно для формирования клеточного и протективного иммунитета. Роль Т-клеточного иммунитета важна при формировании гранулемы, поэтому основные усилия исследований ранее были сосредоточены именно на разработке вакцин, приводящих к формированию выраженного клеточного иммунного ответа [19]. Тем не менее в ряде недавно проведенных исследований на грызунах, нечеловекообразных приматах и людях было показано, что и индукция гуморального иммунитета важна для эффективности вакцин [20]. Это согласуется с нашими данными, полученными по линейной РНК, которая вызвала умеренный гуморальный и клеточный ответ, обеспечивший формирование протективного ответа.

Еще одним возможным объяснением формирования более выраженного гуморального иммунитета после иммунизации circMTB-mEp-5-1 является возможная чрезмерная активация врожденного иммунитета после вакцинации. В составе кольцевых РНК, помимо вирусной последовательности IRES, присутствуют и бактериальные последовательности — интрон-экзонные регионы, которые являются необходимыми элементами для кольцевания РНК при использовании самосплайсирующихся интронов 1 группы [21]. В исследовании Chen et al. показано, что экзонгенная кольцевая РНК, полученная с использованием

самосплайсирующихся интронов 1 группы, способна активировать рецепторы врожденного иммунного ответа (RIG-1, MDA5, OAS1, OASL) в отличие от эндогенной кольцевой РНК, полученной с использованием человеческих интронов, лишенных способности к автокаталитическому сплайсингу, но способных образовывать кольцевые РНК в клетке с участием сплайсосомы. Эндогенная кольцевая РНК не идентифицируется как чужеродная, так как ассоциирована со многими РНК-связывающимися белками [22]. Экзогенная кольцевая РНК из-за своей структуры способна активировать рецепторы врожденного иммунитета, что может способствовать более высокой реактогенности вакцин на основе кольцевых РНК по сравнению с линейной РНК-вакциной. Активация рецепторов врожденного иммунитета, таких как RIG-1 и MDA5, приводит к продукции IFN-I [23], что может вызывать активацию гуморальной ветки иммунитета, интенсивный В-клеточный ответ [24], а также приводить к подавлению Т-клеточного ответа [25].

Тем не менее, вакцина на основе кольцевой РНК, по всей вероятности, может быть эффективна против вирусных заболеваний, где более важно формирование именно выраженного гуморального иммунного ответа. Возможно, одним из перспективных направлений в дальнейшем будет комбинирование в одном препарате или в различных прайм-буст-стратегиях вакцин на основе линейной и кольцевой РНК, для того чтобы усилить как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ и обеспечить более эффективный протективный иммунитет.

Занимаясь конструированием вакцин против *M. tuberculosis*, необходимо иметь в виду еще одну проблему: сложность этого микроорганизма. В связи с тем что *M. tuberculosis* содержит около 4000 генов [26], использование стратегий, применяемых для разработки

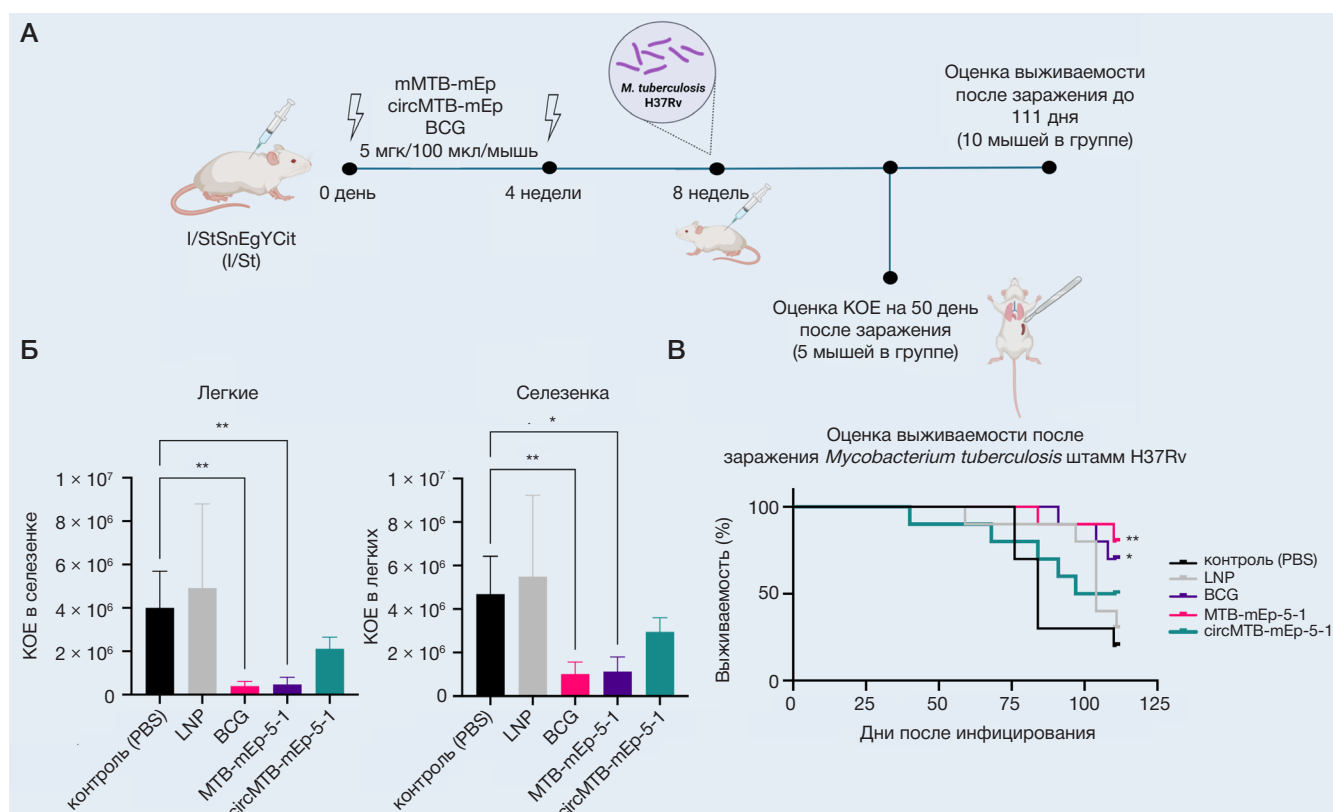


Рис. 2. Оценка протективного иммунного ответа после иммунизации мРНК-вакцинами **А.** Схема постановки эксперимента. **Б.** Бактериальная нагрузка легочной ткани и селезенки иммунизированных мышей ($n = 5$) после инфицирования *M. tuberculosis* (штамм H37Rv). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. **В.** Динамика выживаемости мышей ($n = 10$), иммунизированных противотуберкулезными вакцинами, после заражения *M. tuberculosis* (штамм H37Rv). * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

вакцин на основе вирусной мРНК, вряд ли будет напрямую применимо к вакцинам против туберкулеза на основе мРНК. Генетическая сложность *M. tuberculosis* контрастирует с относительно простой структурой вирусных геномов и еще больше усиливается из-за необычного генетического разнообразия, наблюдаемого среди различных штаммов микобактерий [27]. В настоящее время нет доказательств того, что один определенный антиген или ограниченное число антигенов играют решающую роль в обеспечении защиты.

В будущем, вероятно, применение гетерологичной буст-иммунизации для усиления эффекта вакцины BCG станет важным компонентом комплексных стратегий вакцинации против ТБ. Гетерологичную ревакцинацию

можно проводить в младенчестве или подростковом возрасте, когда эффект от BCG начинает ослабевать. Вакцины на основе мРНК находятся на переднем крае исследований, направленных на изучение возможности повышения уровня клеточного иммунитета против ТБ с помощью гетерологичной буст-иммунизации. Хотя ограничение инфекции для профилактики ТБ может быть реалистичным первым шагом, конечной целью должно стать использование схемы гетерологичного буста для создания либо «доконтактных» вакцин, предотвращающих развитие инфекции и заболевания, либо «постконтактных» вакцин, которые смогут остановить реактивацию заболевания у латентно инфицированных людей.

Таблица. Сводные данные по результатам исследований

Титр IgG (среднее $\pm$ стандартное отклонение, OD = A450)					
Разведение	BCG	MTB-mEp-5-1	circRNA-MTB-mEp	LNP	PBS
1 : 50	0,71 $\pm$ 0,08	0,50 $\pm$ 0,10	0,66 $\pm$ 0,11	0,39 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,05
1 : 100	0,58 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,11	0,56 $\pm$ 0,10	0,34 $\pm$ 0,02	0,30 $\pm$ 0,03
1 : 200	0,46 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,08	0,28 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,03
1 : 400	0,39 $\pm$ 0,07	0,25 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,01
ИПК на лунку (среднее $\pm$ стандартное отклонение)					
	114,00 $\pm$ 38,99	27,60 $\pm$ 5,41	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	0,20 $\pm$ 0,45
КOE в легких (среднее $\pm$ стандартное отклонение)					
	4,00 $\times 10^5 \pm 2,13 \times 10^5$	4,72 $\times 10^5 \pm 3,44 \times 10^5$	2,12 $\times 10^6 \pm 5,30 \times 10^5$	4,91 $\times 10^6 \pm 3,89 \times 10^6$	4,01 $\times 10^6 \pm 1,69 \times 10^6$
КOE в селезенке (среднее $\pm$ стандартное отклонение)					
	1,01 $\times 10^6 \pm 5,52 \times 10^5$	1,13 $\times 10^6 \pm 6,78 \times 10^5$	2,95 $\times 10^6 \pm 6,47 \times 10^5$	5,49 $\times 10^6 \pm 3,75 \times 10^6$	4,69 $\times 10^6 \pm 1,74 \times 10^6$
Медиана выживаемости					
	—	—	94	104	84

ВЫВОДЫ

Полученные результаты по иммуногенности и протективной эффективности вакцин на основе линейной РНК подтверждают перспективность их использования в качестве вакцин

против *M. tuberculosis*. Вакцина на основе кольцевой РНК circMTB-mEP-5-1, несмотря на обеспечение значительного гуморального ответа, пока уступает в эффективности линейной, и требуется дальнейшая оптимизация для усиления клеточного и протективного иммунного ответа.

Литература

1. Global Tuberculosis Report 2024. Available from: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024> (дата обращения: 19.05.2025).
2. Kazakova A, Zhelnov P, Sidorov R, Rogova A, Vasileva O, Ivanov R, et al. DNA and RNA vaccines against tuberculosis: a scoping review of human and animal studies. *Frontiers in Immunology*. 2024; 15: 1457327.
3. Working Group for New TB Vaccines. Available from: <https://newtbvaccines.org/> (дата обращения: 12.07.2025).
4. Baden LR, El Sahly H.M, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2021; 384 (5): 403–16.
5. Khlebnikova A, Kirshina A, Zakharova N, Ivanov R, Reshetnikov V. Current Progress in the Development of mRNA Vaccines Against Bacterial Infections. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25 (23): 13139.
6. Weng Y, Li C, Yang T, Hu B, Zhang M, Guo S, et al. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnology Advances*. 2020; 40: 107534.
7. Liu X, Zhang Y, Zhou S, Dain L, Mei L, Zhu G. Circular RNA: An emerging frontier in RNA therapeutic targets, RNA therapeutics, and mRNA vaccines. *Journal of Controlled Release*. 2022; 348: 84–94.
8. Hwang HJ, Kim YK. Molecular mechanisms of circular RNA translation. *Experimental & molecular medicine*. 2024; 56 (6): 1272–80.
9. Margvelani G, Maquera KAA, Welden JR, Rodgers DW, Stamm S. Translation of circular RNAs. *Nucleic acids research*. 2025; 53 (1): gkae1167.
10. Zhou J, Ye T, Yang Y, Li E, Zhang K, Wang Y, et al. Circular RNA vaccines against monkeypox virus provide potent protection against vaccinia virus infection in mice. *Molecular Therapy*. 2024; 32 (6): 1779–89.
11. Qu L, Yi Z, Shen Y, Lin L, Chen F, Xu Y, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants. *Cell*. 2022; 185 (10): 1728–44.
12. Radaeva TV, Nikonenko BV, Mischenko VV, Averbakh MM, Apt AS. Direct comparison of low-dose and Cornell-like models of chronic and reactivation tuberculosis in genetically susceptible I/St and resistant B6 mice. *Tuberculosis*. 2005; 85 (1–2): 65–72.
13. Reshetnikov V, et al. The Candidate Anti-Tuberculosis MRNA Vaccine Immunogenicity and Reactogenicity Dependency on the Animal's Sex and the Vaccine Dose. *Bull Russ State Med Univ*. 2024; 5: 25–31.
14. Kozlova A, Pateev I, Shepelkova G, Vasileva O, Zakharova N, Yermeev V, et al. A Cap-Optimized MRNA Encoding Multiepitope Antigen ESAT6 Induces Robust Cellular and Humoral Immune Responses Against Mycobacterium tuberculosis. *Vaccines*. 2024; 12 (11): 1267.
15. Reshetnikov V, Terenin I, Shepelkova G, Yermeev V, Kolmykov S, Nagornyykh M, et al. Untranslated region sequences and the efficacy of mRNA vaccines against tuberculosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25 (2): 888.
16. Avdienko VG, Babayan SS, Bocharova IV. Characteristics and application of monoclonal antibodies to Mycobacterium kansasii. *CTRI Bulletin*. 2024; 8 (4): 51–60.
17. Nikonenko BV, Apt AS, Mezhlumova MB, Avdienko VG, Yermeev VV, Moroz AM. Influence of the mouse Bcg Tbc-1 and xid genes on resistance and immune responses to tuberculosis infection and efficacy of bacille Calmette–Guérin (BCG) vaccination. *Clinical and Experimental Immunology*. 2003; 104 (1) 37–43.
18. Yang Y, Wang Z. IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome. *Journal of molecular cell biology*. 2019; 11 (10): 911–9.
19. Lai R, Ogunola AF, Rakib T, Behar SM. Key advances in vaccine development for tuberculosis—success and challenges. *NPJ vaccines*. 2023; 8 (1): 158.
20. Rijnsink WF, Ottenhoff TH, Joosten SA. B-cells and antibodies as contributors to effector immune responses in tuberculosis. *Frontiers in immunology*. 2021; 12: 640168.
21. Obi P, Chen YG. The design and synthesis of circular RNAs. *Methods*. 2021; 196: 85–103.
22. Chen YG, Kim MV, Chen X, Batista PJ, Aoyama S, Wilusz JE. Sensing self and foreign circular RNAs by intron identity. *Molecular cell*. 2017; 67 (2): 228–38.
23. Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20 (9): 537–51.
24. Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I interferons potentially enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity*. 2001; 14 (4): 461–70.
25. Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nature Reviews Immunology*. 2015; 15 (4): 231–42.
26. Cole St, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*. 1998; 396 (6707): 190.
27. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development. *The Lancet infectious diseases*. 2007; 7 (5): 328–37.

References

1. Global Tuberculosis Report 2024. Available from: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024> (access date: 19.05.2025).
2. Kazakova A, Zhelnov P, Sidorov R, Rogova A, Vasileva O, Ivanov R, et al. DNA and RNA vaccines against tuberculosis: a scoping review of human and animal studies. *Frontiers in Immunology*. 2024; 15: 1457327.
3. Working Group for New TB Vaccines. Available from: <https://newtbvaccines.org/> (access date: 12.07.2025).
4. Baden LR, El Sahly H.M, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2021; 384 (5): 403–16.
5. Khlebnikova A, Kirshina A, Zakharova N, Ivanov R, Reshetnikov V. Current Progress in the Development of mRNA Vaccines Against Bacterial Infections. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25 (23): 13139.
6. Weng Y, Li C, Yang T, Hu B, Zhang M, Guo S, et al. The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape. *Biotechnology Advances*. 2020; 40: 107534.

7. Liu X, Zhang Y, Zhou S, Dain L, Mei L, Zhu G. Circular RNA: An emerging frontier in RNA therapeutic targets, RNA therapeutics, and mRNA vaccines. *Journal of Controlled Release*. 2022; 348: 84–94.
8. Hwang HJ, Kim YK. Molecular mechanisms of circular RNA translation. *Experimental & molecular medicine*. 2024; 56 (6): 1272–80.
9. Margvelani G, Maquera KAA, Welden JR, Rodgers DW, Stamm S. Translation of circular RNAs. *Nucleic acids research*. 2025; 53 (1): gkae1167.
10. Zhou J, Ye T, Yang Y, Li E, Zhang K, Wang Y, et al. Circular RNA vaccines against monkeypox virus provide potent protection against vaccinia virus infection in mice. *Molecular Therapy*. 2024; 32 (6): 1779–89.
11. Qu L, Yi Z, Shen Y, Lin L, Chen F, Xu Y, et al. Circular RNA vaccines against SARS-CoV-2 and emerging variants. *Cell*. 2022; 185 (10): 1728–44.
12. Radaeva TV, Nikonenko BV, Mischenko VV, Averbakh MM, Apt AS. Direct comparison of low-dose and Cornell-like models of chronic and reactivation tuberculosis in genetically susceptible I/St and resistant B6 mice. *Tuberculosis*. 2005; 85 (1–2): 65–72.
13. Reshetnikov V, et al. The Candidate Anti-Tuberculosis MRNA Vaccine Immunogenicity and Reactogenicity Dependency on the Animal's Sex and the Vaccine Dose. *Bull. Russ. State Med. Univ*. 2024; 5: 25–31.
14. Kozlova A, Pateev I, Shepelkova G, Vasileva O, Zakharova N, Yermeev V, et al. A Cap-Optimized MRNA Encoding Multiepitope Antigen ESAT6 Induces Robust Cellular and Humoral Immune Responses Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccines*. 2024; 12 (11): 1267.
15. Reshetnikov V, Terenin I, Shepelkova G, Yermeev V, Kolmykov S, Nagornyykh M, et al. Untranslated region sequences and the efficacy of mRNA vaccines against tuberculosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25 (2): 888.
16. Avdienko VG, Babayan SS, Bocharova IV. Characteristics and application of monoclonal antibodies to *Mycobacterium kansasii*. *CTRI Bulletin*. 2024; 8 (4): 51–60.
17. Nikonenko BV, Apt AS, Mezhlumova MB, Avdienko VG, Yermeev VV, Moroz AM. Influence of the mouse Bcg Tbc-1 and xid genes on resistance and immune responses to tuberculosis infection and efficacy of bacille Calmette–Guérin (BCG) vaccination. *Clinical and Experimental Immunology*. 2003; 104 (1) 37–43.
18. Yang Y, Wang Z. IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome. *Journal of molecular cell biology*. 2019; 11 (10): 911–9.
19. Lai R, Ogunsola AF, Rakib T, Behar SM. Key advances in vaccine development for tuberculosis—success and challenges. *NPJ vaccines*. 2023; 8 (1): 158.
20. Rijnink WF, Ottenhoff TH, Joosten SA. B-cells and antibodies as contributors to effector immune responses in tuberculosis. *Frontiers in immunology*. 2021; 12: 640168.
21. Obi P, Chen YG. The design and synthesis of circular RNAs. *Methods*. 2021; 196: 85–103.
22. Chen YG, Kim MV, Chen X, Batista PJ, Aoyama S, Wilusz JE. Sensing self and foreign circular RNAs by intron identity. *Molecular cell*. 2017; 67 (2): 228–38.
23. Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20 (9): 537–51.
24. Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity*. 2001; 14 (4): 461–70.
25. Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nature Reviews Immunology*. 2015; 15 (4): 231–42.
26. Cole St, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998; 396 (6707): 190–190.
27. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *The Lancet infectious diseases*. 2007; 7 (5): 328–37.