

ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА НА ОСНОВЕ КЛАССИЧЕСКИХ И САМОАМПЛИФИЦИРУЮЩИХСЯ РНК

Д. А. Кунык¹, Е. П. Мазунина², Е. А. Мукашева², А. В. Игнатьева², Е. С. Кириллова², О. М. Курченко¹, Р. А. Иванов¹, В. А. Гушчин², В. В. Решетников^{1✉}¹ Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия² Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия

Высокая изменчивость вируса гриппа и ограниченная гибкость инактивированных вакцин обуславливают необходимость в создании новых более эффективных профилактических препаратов. РНК-платформа — одна из наиболее перспективных для создания вакцин нового поколения против респираторных инфекций. Целью работы было сравнить иммуногенность двух экспериментальных препаратов на основе классической мРНК и самоамплифицирующейся РНК (саРНК), кодирующих гемагглютинин (HA) вируса гриппа A(H1N1)pdm09. Мышей линии BALB/c дважды иммунизировали РНК-препаратами в дозе 2 мкг с интервалом в 21 день. Уровень гуморального иммунного ответа оценивали в реакции торможения гемагглютинации. После второй иммунизации среднестатистические титры антител против гомологичного штамма A/Wisconsin/588/2019 составили 1 : 2281 (ДИ: 1 : 1319 – 1 : 3943) для мРНК и 1 : 640 (ДИ: 1 : 404 – 1 : 1014) для саРНК. Против антигенно-дистантного штамма A/Victoria/4897/2022 титры в группах мРНК и саРНК достигли 1 : 1810 (ДИ: 1 : 844 – 1 : 3882) и 1 : 452 (ДИ: 1 : 246 – 1 : 832) соответственно. Эти показатели титров антител были значительно выше, чем в группе инактивированной сплит-вакцины «Ультрикс Квадри», которые не превышали 1 : 56 (ДИ: 1 : 26 – 1 : 121). Несмотря на более высокие титры антител в РТГА после иммунизации вакциной на основе классической мРНК по сравнению с саРНК, различия в титрах антител не достигали статистической значимости. Таким образом, вакцины на основе мРНК и саРНК приводят к формированию выраженного гуморального ответа, что подтверждает их перспективность для создания вакцин нового поколения.

Ключевые слова: мРНК-вакцины, самоамплифицирующаяся РНК, вирус гриппа, иммуногенность, гемагглютинин, липидные наночастицы, перекрестная реактивность, реакция торможения гемагглютинации

Финансирование: исследование выполнено при поддержке гранта государственной программы федерального округа «Сириус»: «Научно-технологическое развитие федерального округа «Сириус» (Соглашение № 3-03 от 18 февраля 2025 г.).

Благодарности: авторы благодарят О. О. Васильеву и И. А. Скворцова из Научно-технологического университета «Сириус» за помощь в формуляции РНК в липидные наночастицы.

Вклад авторов: Д. А. Кунык, О. М. Курченко, В. В. Решетников — дизайн исследования, подготовка мРНК-вакцин, интерпретация данных, написание рукописи; Е. П. Мазунина — планирование и проведение экспериментов на животных; Е. А. Мукашева, А. В. Игнатьева, Е. С. Кириллова — проведение серологических исследований (РТГА); В. В. Решетников, Р. А. Иванов, В. А. Гушчин — редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» (протокол № 94 от 20 мая 2025 г.). Все процедуры с животными проведены в соответствии с этическими стандартами, утвержденными Приказом Минздрава России, и принципами международного руководства Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Были приняты все меры для минимизации страданий животных и сокращения числа используемых особей.

✉ **Для корреспонденции:** Василий Владимирович Решетников
Олимпийский проспект, д. 1, г. Сочи, 354340; Россия; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

Статья получена: 10.04.2026 **Статья принята к печати:** 23.05.2026 **Опубликована онлайн:**

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.028

Авторские права: © 2026 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/>).

ASSESSMENT OF THE IMMUNOGENICITY OF CLASSIC AND SELF-AMPLIFYING RNA-BASED ANTIVIRAL THERAPEUTICS FOR INFLUENZA

Kunyk DA¹, Mazunina EP², Mukasheva EA², Ignatieva AV², Kirillova ES², Kurchenko OM¹, Ivanov RA¹, Gushchin VA², Reshetnikov VV^{1✉}¹ Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia² Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

The high variability of the influenza virus and the limited flexibility of inactivated vaccines result in a need to develop new, more effective preventive therapeutics. The RNA platform is among the most promising ones for developing new generation vaccines against respiratory infections. The study aimed to compare the immunogenicity of two experimental therapeutics based on classic mRNA and self-amplifying RNA (saRNA) encoding the hemagglutinin (HA) of the A(H1N1)pdm09 influenza virus. BALB/c mice were immunized twice with the RNA-based therapeutics at a dose of 2 µg at a 21-day interval. Humoral immune responses were assessed using the hemagglutination inhibition (HAI) assay. After the second immunization, the geometric mean titers of antibodies against the homologous strain A/Wisconsin/588/2019 were 1 : 2281 (CI: 1 : 1319 – 1 : 3943) for the mRNA vaccine and 1 : 640 (CI: 1 : 404 – 1 : 1014) for the saRNA vaccine. Titers against the antigenically distant strain A/Victoria/4897/2022 in the mRNA group and saRNA group reached 1 : 1810 (CI: 1 : 844 – 1 : 3882) and 1 : 452 (CI: 1 : 246 – 1 : 832), respectively. These antibody titer values were considerably higher than those in the group that received the Ultrix Quadri inactivated split vaccine, which did not exceed 1 : 56 (CI: 1 : 26 – 1 : 121). Despite the higher antibody titers in the HAI assay after immunization with the classic mRNA-based vaccine compared with the saRNA-based vaccine, the differences were not statistically significant. Thus, the mRNA- and saRNA-based vaccines induce a pronounced humoral immune response, confirming that these platforms are promising for the development of new generation vaccines.

Keywords: mRNA vaccines, self-amplifying RNA, influenza virus, immunogenicity, hemagglutinin, lipid nanoparticles, cross-reactivity, hemagglutination inhibition

Funding: the study was supported by grant of the state programme of the Sirius Federal District: Scientific and Technological Development of the Sirius Federal District (Agreement No. 3-03 dated 18 February 2025).

Acknowledgements: the authors express their gratitude to O.O. Vasilieva and I.A. Skvortsov from the Sirius University of Science and Technology for the formulation of RNA into lipid nanoparticles.

Author contribution: Kunyk DA, Kurchenko OM, Reshetnikov VV — study design, preparation of mRNA vaccines, data interpretation, manuscript writing; Mazunina EP — planning and conducting animal experiments; Mukasheva EA, Ignatieva AV, Kirillova ES — serological testing (HAI assay); Reshetnikov VV, Ivanov RA, Gushchin VA — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (protocol No. 94 dated 20 May 2025). All procedures involving animals were compliant with the ethical standards approved by the Order of the Ministry of Health of Russia and with the principles of the International Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Every effort was made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vasily V. Reshetnikov
Olimpiysky prospect, 1, Sochi, 354340; Russia; e-mail: reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

Received: 10.04.2026 **Accepted:** 23.05.2026 **Published online:**

DOI: 10.24075/brsmu.2026.028

Copyright: © 2026 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/>).

Вирус гриппа вызывает сезонные заболевания и относится к семейству Orthomyxoviridae, подразделяющемуся на четыре рода (А, В, С и D). Вирус гриппа рода А вызывает наиболее тяжелое течение инфекции и является причиной 290–650 тыс. смертей в год в основном среди детей, беременных женщин и пожилых людей [1]. Высокая изменчивость вируса, обусловленная различными механизмами, включая антигенный дрейф (мутации в генах, кодирующих вирусные белки) и шифт (реассортация сегментов генома), требует ежегодного обновления антигенного состава вакцин [2–4]. Таким образом, эта специфика вируса гриппа обуславливает необходимость обновления состава вакцинных препаратов к постоянно изменяющимся антигенным детерминантам.

Вакцинопрофилактика остается наиболее эффективным инструментом контроля вирусных инфекций, позволяющим снизить заболеваемость и тяжесть клинических проявлений [5]. В настоящее время в России применяют такие вакцины для профилактики гриппа, как «Ультрикс Квадри», «Совигрипп», «Флю-М», «Гриппол плюс», «Гриппол» и «Квадριвалент», которые относятся к инактивированным вакцинам [6]. Инактивированные вакцины, несмотря на высокий профиль безопасности, имеют ряд ограничений. Среди них слабая перекрестная активность индуцируемого иммунного ответа, необходимость ежегодной смены штаммового состава, в том числе из-за снижения иммунного ответа в течение года, сниженная эффективность среди определенных групп риска, а также длительные сроки производства, затрудняющие быструю адаптацию к циркулирующим вариантам вируса [1]. Более того, на этапе получения инактивированных вакцин вирусные антигены могут претерпевать изменения, что может приводить к сниженной эпидемиологической эффективности вакцинальной кампании [7, 8]. Для поддержания долгосрочной защиты обычно необходимы ревакцинации [1]. Показано, что из-за длительного процесса разработки вакцин, а также изменения антигенных детерминант вируса гриппа эффективность инактивированных вакцин варьируется в пределах 10–60% [9].

В отличие от инактивированных препаратов, РНК-вакцины кодируют нативную структуру антигена, обладают собственными адъювантными свойствами и позволяют быстро менять последовательность в ответ на изменчивость вируса [10, 11]. В качестве основы для РНК-вакцины могут быть использованы классические мРНК-молекулы и самоамплифицирующиеся РНК (саРНК), которые, помимо последовательности целевого антигена, содержат также последовательности неструктурных генов альфавирусов, обеспечивающих репликацию РНК в клетке [11, 12]. Препараты на основе саРНК обеспечивают более пролонгированный биосинтез целевого белка, что в контексте вакцинных препаратов может обеспечить более высокую иммуногенность или позволить снизить дозу препарата. Однако использование препаратов на основе саРНК остается ограниченным из-за потенциальных побочных эффектов, связанных с повышенным уровнем реактогенности. Цель данной работы — проведение сравнительного анализа иммуногенности экспериментальных препаратов на основе классической мРНК и самоамплифицирующейся саРНК, кодирующих гемагглютинин вируса гриппа A(H1N1)pdm09 на мышах линии BALB/c. Для валидации экспериментальной системы и корректной интерпретации данных в качестве положительного контроля была использована зарегистрированная инактивированная вакцина «Ультрикс

Квадри». Мы оценили динамику гуморального иммунного ответа (титры антител в РТГА) после двукратной иммунизации с интервалом 21 день. Данное исследование направлено на определение потенциала платформы саРНК в контексте разработки вакцин против гриппа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование и *in vitro* транскрипция

Плазмида, кодирующая самоамплифицирующуюся РНК, содержащую репликон вируса веносуэльского энцефалита лошадей (VEE) с геном GFP (T7-VEE-GFP), была получена из коллекции Addgene (плазмида № 58977). Исходная плазмида, содержащая последовательности EMCV IRES и ген устойчивости к пуromицину, была модифицирована путем удаления этих элементов. Для снижения реактогенности в последовательность неструктурного белка nsP2 была введена мутация S773P. Кроме того, последовательность eGFP под контролем субгеномного промотора заменили на последовательность гемагглютинина вируса гриппа A/Wisconsin/588/2019 (H1N1). Для конструкции классической матричной РНК последовательность H1N1 фланкировали 5'-нетранслируемой областью (5'-UTR) и 3'-нетранслируемой областью (3'-UTR) человеческого альфа-глобина, а также полиА-хвостом длиной 110 н.о.

Транскрипцию саРНК и мРНК *in vitro* проводили в реакционной смеси, содержащей 5 мкг линейаризованной плазмиды, реагенты из набора RNA-20 Kit (Biolabmix, Россия), 2,4 мМ синтетического аналога 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G (кэп-аналог ARCA) (Biolabmix, Россия) для саРНК и 2,4 мМ m27,3'-OGpppAmG (CapAG; Biolabmix) для мРНК, 1 мкг/мкл ингибитора рибонуклеаз RiboCare (Evrogen, Россия) и 0,002 е.а/мкл неорганической пирофосфатазы (New England Biolabs, США) в соответствии с протоколом производителя. Для транскрипции саРНК *in vitro* использовали стандартный набор нуклеотидов, включающий 3 мМ каждого из ATP, UTP, CTP и 0,6 мМ GTP (Biolabmix, Россия), для синтеза мРНК — 3 мМ ATP, CTP, GTP и N1-метилпсевдоуридина (Biolabmix, Россия). Реакцию проводили в течение 1 ч при 37 °C. Для удаления ДНК-матрицы образцы гидролизировали термолабильной ДНКазой (Thermolabile DNase; Biolabmix, Россия). Затем РНК очищали с использованием магнитных частиц для выделения РНК (RNA beads; Vazyme, Китай). Длину и чистоту синтезированных молекул РНК оценивали с помощью системы микрочипового электрофореза MultiNA (Shimadzu, Япония).

Формуляция РНК в липидные наночастицы

Для инкапсуляции мРНК и саРНК в липидные наночастицы (ЛНЧ) мы использовали автоматизированную систему NP System для генерации липосом (микрочип-миксер, Dolomite Microfluidics, Великобритания). Методика формулирования была аналогична описанной для других мРНК-платформ [13]. Липидный состав включал следующие компоненты: холестерин (Merck, США), ионизируемые катионные липиды (ICL) SM-102 (Sinopreg, Китай), ICL ALC-0315 (Sinopreg, Китай), вспомогательный липид DSPC (Avanti, США), пегилированный липид DMG-PEG2000 (Avanti, США). Оптимальное молярное соотношение компонентов составляло 42,70 : 23,15 : 23,15 : 9,40 : 1,60 (холестерин : SM-102 : ALC-0315 : DSPC : DMG-PEG2000).

После формулирования суспензии частиц очищали методом диализа с использованием мембран Float-A-

Lyzer G2 объемом 1 мл с порогом молекулярной массы отсечения (MWCO) 10 кДа; материал мембраны — сложный эфир целлюлозы (Cellulose Ester; Repligen, США). Мембраны подготавливали в соответствии с протоколом производителя. Диализ проводили в течение ночи (12 ч) в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4) при +4 °C при интенсивном перемешивании. Буфер заменяли один раз. Криопротекцию осуществляли в 20% растворе сахарозы в PBS в течение 2 ч при +4 °C, затем необходимое количество алиquot для анализа и функционального тестирования замораживали при –80 °C.

Аналитическая характеристика мРНК препаратов

Определение размера липидных наночастиц (ЛНЧ) и индекса полидисперсности (PDI) осуществляли на анализаторе Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical). Образцы ЛНЧ предварительно разбавляли в 100 раз фосфатно-солевым буфером (PBS) и выдерживали при комнатной температуре для термостабилизации. Измерения проводили в пластиковых кюветах; для каждого образца регистрировали три повторности (каждая — до 100 сканов) до достижения стабильных показаний.

Показатель эффективности инкапсуляции (ЭИ, %) определяли согласно опубликованному протоколу [14]. С целью оценки инкапсуляции ЛНЧ подвергали лизису в ТЕ-буфере (pH 7,5), содержащем 1% Triton X-100. Окрашивание интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Green (Evrogen, Россия) выполняли как для intactных, так и для лизированных частиц — до и после дестабилизации липидной оболочки. Количественное содержание РНК устанавливали по калибровочной зависимости, построенной с использованием стандарта мРНК в ТЕ-буфере (в присутствии и отсутствии Triton X-100). Итоговую концентрацию инкапсулированной мРНК вычисляли как разность сигналов, полученных для лизированных и нативных образцов.

Подробная характеристика препаратов мРНК-ЛНЧ, используемых в эксперименте, приведена в результатах исследования.

Иммунизация

Для оценки иммуногенности были сформированы четыре группы мышей линии BALB/c (самки возрастом 7–8 недель, по шесть мышей в группе; рис. 1А). При формировании групп мышей распределяли в случайном порядке. Иммунизировали мышей в мышцу бедра на нулевой день и 21-й день в дозах 2 мкг саРНК или мРНК в объеме 0,2 человеческой дозы (3 мкг) вакцины «Ультрикс Квадри» (штаммовый состав 2025–2026 гг. для Северного полушария: A/Victoria/4897/2022 (H1N1)pdm09; A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2); B/Austria/1359417/2021; B/Phuket/3073/2013) и 100 мкл плацебо (PBS с 20% сахарозы). Оценку титра антител проводили в сыворотках крови мышей на 20-й день после первой иммунизации и на 21-й день после второй иммунизации (42-й день после первой иммунизации) в реакции торможения гемагглютинации (титр РТГА) по отношению к гемагглютину антигенных вариантов вируса гриппа A(H1N1)pdm09.

Доза инактивированной вакцины «Ультрикс Квадри» для мышей (3 мкг гемагглютинаина на штамм, что соответствует ~0,2 человеческой дозы) была выбрана на основе аллометрического масштабирования по площади поверхности тела с использованием Km -факторов [15]:

Km (человек) = 37, Km (мышь) = 3. Расчетная эквивалентная доза составила ~1,2 мкг, однако для обеспечения надежной детекции иммунного ответа и сопоставимости с дозой экспериментальных РНК-препаратов (2 мкг) использовали консервативную дозу 3 мкг. Поскольку экспериментальные РНК-препараты кодируют единственный антиген (ГА A/Wisconsin/588/2019), сравнение иммуногенности с «Ультрикс Квадри» проводили по эквивалентной дозе гемагглютинаина конкретного штамма H1N1, что обеспечивает корректность интерпретации данных.

Реакция торможения гемагглютинации

Иммуногенность в экспериментах на животных оценивали с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА) в соответствии с протоколом РТГА, разработанным на основе рекомендаций Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [16]. Для этого сыворотки крови мышей обрабатывали рецептор-разрушающим ферментом (RDE, полученный из *Vibrio cholerae*, приобретен в Denka Seiken Co., Ltd., Токио, Япония), после чего в 96-луночных планшетах с V-образным дном готовили двукратные разведения обработанных сывороток. Затем добавляли вирусный антиген в рабочей дозе 8 агглютинирующих единиц (АЕ) и инкубировали планшет в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого добавляли 0,5–1% суспензии человеческих эритроцитов первой группы крови системы АВ0 и инкубировали планшет еще 60 мин при комнатной температуре. Если в образце сыворотки присутствовали антитела, способные перекрестно реагировать с вирусом, они связывались с вирусом и препятствовали его способности агглютинировать эритроциты. После инкубации титр антител определяли как наибольшее разведение сыворотки, при котором еще наблюдали торможение гемагглютинации.

Антиген вируса гриппа A/Victoria/4897/2022 для проведения РТГА был приобретен в ООО «Компания по производству диагностических препаратов» (Санкт-Петербург, Россия). Культивирование вирусного штамма A/Wisconsin/588/2019 с целью накопления антигенного материала проводили на культуре клеток MDCK согласно общепринятой методике [16].

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили, используя однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса с помощью теста Данна для попарного сравнения (post-hoc). 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

На первом этапе проводили оценку качества полученных вакцинных препаратов на основе мРНК и саРНК, инкапсулированных в липидные наночастицы (рис. 1). Оба препарата были приготовлены в концентрации 20 нг/мкл (в пересчете на РНК). Препараты имели высокий уровень инкапсуляции: для классической мРНК этот показатель составил 99,9%, для самоамплифицирующейся саРНК — 94,0% (рис. 1А). Средний гидродинамический диаметр частиц находился в сопоставимом диапазоне: ~99,2 нм для мРНК-препарата и ~88,2 нм для саРНК-препарата,

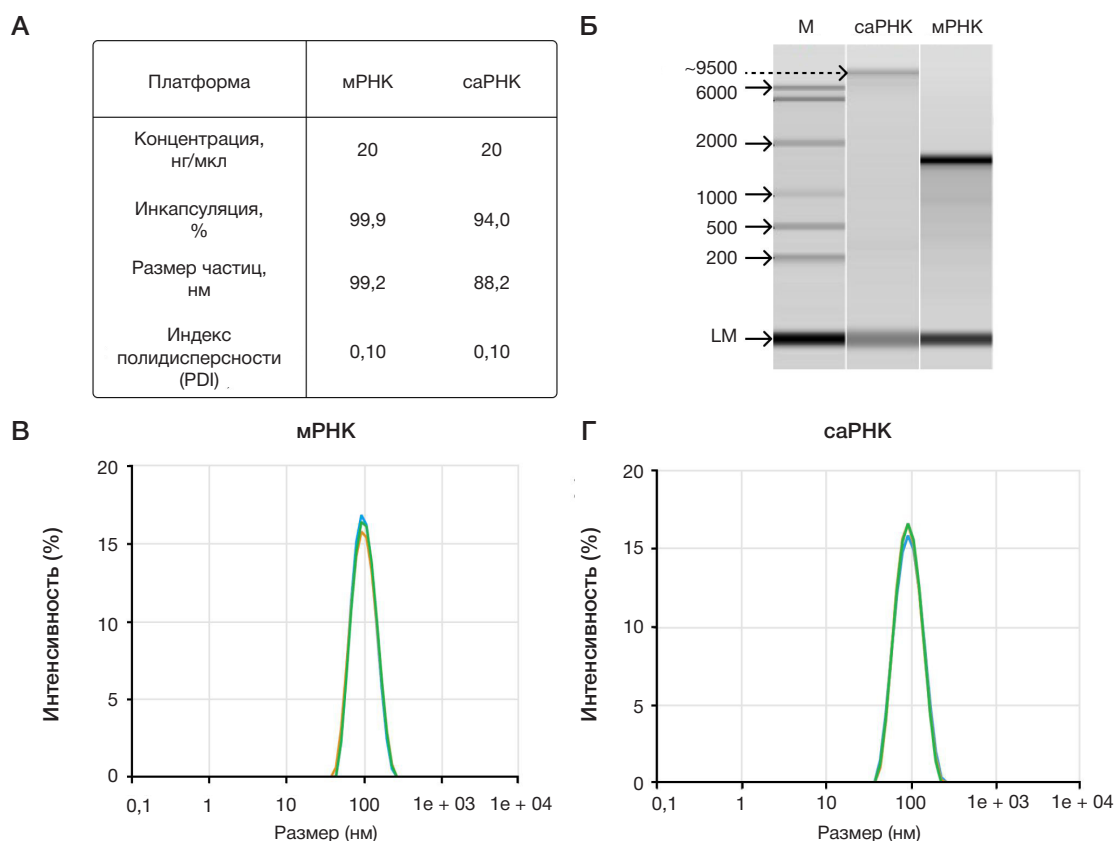


Рис. 1. Физико-химические параметры РНК-ЛНЧ. **А.** Аналитические характеристики липидных наночастиц. **Б.** Капиллярный электрофорез саРНК и мРНК после разрушения частиц. Пунктирной стрелкой указана предполагаемая длина саРНК. **В, Г.** Анализ распределения частиц по размерам методом динамического светорассеяния мРНК и саРНК соответственно

что соответствует оптимальному размеру для клеточного захвата путем эндоцитоза. Целостность и размер нуклеиновых кислот были верифицированы методом капиллярного гель-электрофореза после разрушения липидных наночастиц. Четкие дискретные полосы без признаков деградации свидетельствовали о высоком качестве полученных препаратов. Длина классической мРНК ~2000 н.о., а саРНК ~9500 н.о., что обусловлено наличием в ее составе последовательности неструктурных генов альфавируса (рис. 1Б). Анализ распределения частиц по размерам методом динамического светорассеяния подтвердил однородность обоих препаратов. Размер частиц был в диапазоне от 88 нм до 100 нм при индексе полидисперсности PDI < 0,11 (рис. 1В, Г). Таким образом, препараты на основе мРНК и саРНК имели высокие показатели качества и сопоставимые физико-химические параметры, что позволило использовать их для дальнейшей оценки иммуногенности.

Через 20 дней после первой иммунизации в группах мышей, получивших экспериментальные РНК-препараты (саРНК и мРНК), наблюдали детектируемые титры антител, ингибирующих гемагглютинацию ($p < 0,01$), против антигенов вирусов гриппа A/Wisconsin/588/2019 и A/Victoria/4897/2022 по сравнению с группой отрицательного контроля (PBS) (рис. 2Б). В группе саРНК среднее геометрических титров антител составило 1 : 180 (ДИ (95% доверительный интервал): 1 : 133 – 1 : 242) против штамма A/Wisconsin/588/2019 и 1 : 67 (ДИ: 1 : 44 – 1 : 92) против A/Victoria/4897/2022. В группе классической мРНК были получены более высокие показатели: 1 : 285 (ДИ: 1 : 165 – 1 : 493) и 1 : 101 (ДИ: 1 : 48 – 1 : 214) против тех же штаммов соответственно, однако межгрупповые различия не достигали статистической значимости. В

группе животных, вакцинированных коммерческой инактивированной сплит-вакциной «Ультрикс Квадри» (0,2 человеческой дозы), титр антител в РТГА против штамма A/Wisconsin/588/2019 составил 1 : 71 (ДИ: 1 : 53 – 1 : 96), а против штамма A/Victoria/4897/2022 наблюдали минимальные титры антител (менее 1 : 37 (ДИ: 1 : 17 – 1 : 73)). Таким образом, вакцина «Ультрикс Квадри» хоть и имела в своем составе антигены вирусного штамма A/Victoria/4897/2022, однако стимулировала выработку более низкого уровня иммунного ответа в выбранной дозе.

Через 20 дней после второй иммунизации (41-й день эксперимента; рис. 2В) наблюдалось существенное повышение титров антител, ингибирующих гемагглютинацию как против штамма A/Wisconsin/588/2019, так и против штамма A/Victoria/4897/2022 в группах экспериментальных РНК-препаратов по сравнению с первой иммунизацией (рис. 2Б). Наиболее выраженное повышение титра антител отмечено в группе мышей, иммунизированных классической мРНК. Титр антител в группе мРНК против штамма A/Wisconsin/588/2019 был 1 : 2281 (ДИ: 1 : 1319 – 1 : 3943), что выше ($p < 0,0001$) по сравнению с группой отрицательного контроля (PBS) и группой мышей, получивших контрольную вакцину (1 : 17 (ДИ: 1 : 8 – 1 : 42)). Против штамма A/Victoria/4897/2022 в группе мРНК также наблюдались высокие титры (1 : 1810 (ДИ: 1 : 844 – 1 : 3882)), отличающиеся от контроля и группы «Ультрикс Квадри» (1 : 56 (ДИ: 1 : 26 – 1 : 121); $p < 0,05$). В группе мышей, иммунизированных саРНК, титры антител также повышались после второй иммунизации, но менее выражено, чем в группе мРНК. В группе саРНК титры составили 1 : 640 (ДИ: 1 : 404 – 1 : 1014) против штамма A/Wisconsin/588/2019 и 1 : 452 (ДИ: 1 : 246 – 1 : 832) против штамма A/Victoria/4897/2022, что было также

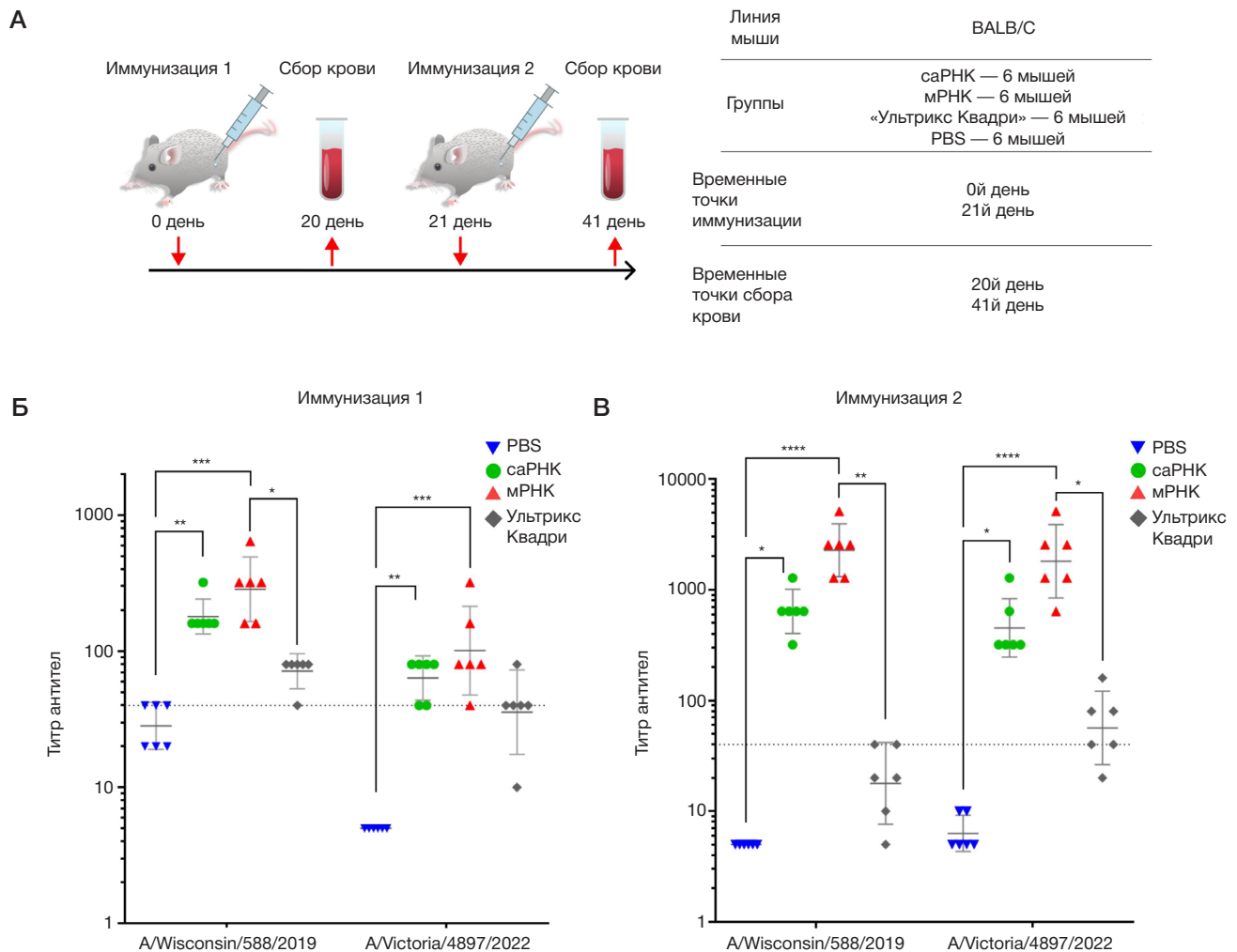


Рис. 2. Схема иммунизации и результаты РТГА. **А.** Схема эксперимента. **Б.** График среднего геометрического титра антител групп мышей, иммунизированных PBS, мРНК, саРНК и «Ультрикс Квадри» через 20 дней после первой иммунизации. **В.** График среднего геометрического титра антител групп мышей, иммунизированных PBS, мРНК, саРНК и «Ультрикс Квадри» через 21 день после второй иммунизации (* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$; тест Данна)

выше, чем у контрольной группы ($p < 0,05$). Межгрупповые различия групп саРНК и мРНК не достигли статистической значимости. Вакцина «Ультрикс Квадри» после второй иммунизации показала низкие титры антител в тесте РТГА, которые были значительно ниже показателей обеих групп РНК-вакцин. В целом, эти данные свидетельствуют о высоком гуморальном иммунном ответе, наблюдаемом при использовании мРНК- и саРНК-вакцин.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании проведено сравнение иммуногенности экспериментальных вакцин на основе классической мРНК и самоамплифицирующейся саРНК, кодирующих гемагглютинин вируса гриппа A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)pdm09, в доклинической модели на мышах линии BALB/c. После второй иммунизации наблюдалось значительное увеличение титров антител в обеих группах РНК-вакцин, которые значительно превосходили показатели, наблюдаемые при использовании вакцины «Ультрикс Квадри». Последняя показала лишь умеренный рост или отсутствие значимого ответа против штаммов A/Wisconsin/588/2019 и A/Victoria/4897/2022. Низкая иммуногенность инактивированной вакцины, наблюдаемая нами в ходе описанных экспериментов, может быть обусловлена как низкой выбранной дозой

вакцины (по 3 мкг каждого из четырех антигенов), так и свойствами платформы (фиксированной дозой антигена, отсутствием эндогенной экспрессии и адъювантов). Что же касается РНК-препаратов, то они, согласно литературным источникам, обеспечивают длительный биосинтез вирусных антигенов и могут оказывать дополнительный адъювантный эффект за счет активации рецепторов врожденного иммунитета (TLR3, TLR7/8, RIG-I) [11].

Анализ перекрестной реактивности выявил, что использование РНК-препаратов обеспечивает формирование высокого титра антител как против гомологичного штамма A/Wisconsin/588/2019, так и против антигенно-дистантного варианта A/Victoria/4897/2022. Способность обеих РНК-препаратов индуцировать выраженную иммуногенность против антигенно-дистантного штамма A/Victoria/4897/2022 подтверждает потенциал платформы РНК для индукции кросс-реактивного иммунного ответа [17]. Эти результаты подтверждают литературные сведения о способности РНК-вакцин индуцировать антитела, распознающие антигенно-дрейфующие штаммы [18–20]. Таким образом, создание мультивалентных конструкций, кодирующих гемагглютинины нескольких подтипов гриппа, может способствовать разработке универсальной вакцины с широкой перекрестной защитой [21]. Эти обстоятельства подтверждают перспективность обеих РНК-технологий для профилактики гриппа.

Полученные в нашем исследовании титры РТГА для классической мРНК (1 : 2281 (ДИ: 1 : 1319 – 1 : 3943) против гомологичного штамма после второй иммунизации) находятся в диапазоне значений, наблюдаемых в других исследованиях [19–20]. Показано, что однократная иммунизация мРНК-препаратом против гриппа индуцировала титры >1 : 40, а после второй иммунизации значения находились в диапазоне 1 : 1000–1 : 5000 в зависимости от штамма и дозы [22]. В нашем предыдущем исследовании [23] средние геометрические титры антител в РТГА после двукратной иммунизации трехвалентным мРНК-препаратом также превышали 1 : 1000 и были в ~86 раз выше по сравнению с инактивированной вакциной. Для саРНК-платформы наши данные (1 : 640 (ДИ: 1 : 404 – 1 : 1014) при дозе 2 мкг) согласуются с другим исследованием, показывающим, что вакцины на основе самоамплифицирующейся РНК обеспечивают высокие титры РТГА после первой иммунизации на уровне 1 : 104 ± 53,67 при дозе 1,25 мкг [24]. Несмотря на отсутствие статистической значимости в РТГА-титрах в группах мРНК и саРНК, абсолютные значения и размах в группе мРНК были выше. Эти эффекты могут быть связаны со специфическим паттерном трансляции саРНК. Так, в экспериментах по прижизненной биолуминесценции на репортерных белках было показано, что в первые дни после введения саРНК наблюдается более низкий уровень биосинтеза целевого белка, который достигает максимума на 5–7 день после введения и затем постепенно снижается [25–27]. В случае препаратов мРНК максимальный уровень репортерного белка достигается через сутки после введения и затем значительно снижается, что обусловлено коротким периодом полудеградаций РНК [25–27].

Важным ограничением текущего исследования является отсутствие оценки клеточного иммунного ответа. В данной работе мы сосредоточились на оценке гуморального иммунитета, в частности на оценке уровня гемагглютинирующих антител. Титры в РТГА являются коррелятом защиты против гриппа и используются регуляторными органами для оценки эффективности вакцин [28]. Следует также отметить, что при одинаковой массовой

дозе (2 мкг) молярное количество саРНК (~9,5 т.п.н.) примерно в 5 раз ниже, чем у мРНК (~2 т.п.н.). Сравнение препаратов в равной дозе необходимо для детекции возможных дозозависимых побочных эффектов. Выбор дозы был обусловлен ограничениями по реактогенности саРНК-платформы (активация врожденного иммунитета репликационными интермедиатами) и компенсирующим эффектом самоамплификации, обеспечивающим высокий уровень экспрессии антигена даже при меньшем стартовом количестве молекул.

Несмотря на более скромные результаты по иммуногенности кандидатной вакцины на основе саРНК, ее использование обладает большим потенциалом снижения дозы и потенциально может способствовать более длительному сохранению титров антител по сравнению с мРНК благодаря внутриклеточной репликации, что может снизить стоимость препарата и нежелательные эффекты, связанные с более высокой дозой липидных наночастиц. Перспективы дальнейшей разработки связаны с оптимизацией последовательности самоамплифицирующейся РНК. В частности, внесение мутаций в последовательности неструктурных белков репликационного и оптимизация регуляторных элементов могут значительно улучшить иммуногенность саРНК-вакцин [11].

ВЫВОДЫ

Полученные данные демонстрируют, что кандидатные РНК-препараты на основе классической мРНК и саРНК, инкапсулированные в липидные наночастицы, приводят к формированию выраженного гуморального иммунного ответа против гомологичного A/Wisconsin/588/2019 и дистантного штамма A/Victoria/4897/2022, что подчеркивает их перспективность для создания вакцин нового поколения против сезонного и пандемического гриппа. Результаты нашего исследования показали, что кандидатный вакцинный препарат против гриппа на основе саРНК не показал преимуществ по сравнению с мРНК-препаратом. Таким образом, требуется дальнейшая оптимизация ее последовательности, дозы и режима введения.

Литература

1. Nuwarda RF, Alharbi AA, Kayser V. An Overview of Influenza Viruses and Vaccines. *Vaccines*. 2021; 9 (9): 1032. DOI: 10.3390/vaccines9091032.
2. Taubenberger JK, Kash JC, Morens DM. The 1918 influenza pandemic: 100 years of questions answered and unanswered. *Sci Transl Med*. 2019; 11 (502): eaau5485. DOI: 10.1126/scitranslmed.aau5485.
3. Taubenberger JK, Morens DM. Influenza: The Once and Future Pandemic. *Public Health Rep*. 2010; 125 (3_suppl): 15–26. DOI: 10.1177/00333549101250S305.
4. Stubbs TM, Te Velthuis AJ. The Rna-Dependent RNA Polymerase of the Influenza A Virus. *Future Virol*. 2014; 9 (9): 863–76. DOI: 10.2217/fvl.14.66.
5. Taylor MW. *Vaccines Against Viral Infections*. B: Viruses and Man: A History of Interactions. Cham: Springer International Publishing, 2014; p. 355–77 [цитируется по 30 март 2026 г.]. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-07758-1_19 DOI:10.1007/978-3-319-07758-1_19.
6. Bulgakova VA, Selimzyanova LR, Privalova TE, Yusupova DA. Immunisation of young children against influenza — evidence review. *Lechaschi Vrach*. 2022; 10 (25). DOI: 10.51793/OS.2022.25.10.009.
7. Zost SJ, Parkhouse K, Gumina ME, Kim K, Diaz Perez S, Wilson PC, et al. Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114 (47): 12578–83. DOI: 10.1073/pnas.1712377114.
8. Xie H, Wan XF, Ye Z, Plant EP, Zhao Y, Xu Y, et al. H3N2 Mismatch of 2014–15 Northern Hemisphere Influenza Vaccines and Head-to-head Comparison between Human and Ferret Antisera derived Antigenic Maps. *Sci Rep*. 2015; 5 (1): 15279. DOI: 10.1038/srep15279.
9. Paules CI, Fauci AS. Influenza Vaccines: Good, but We Can Do Better. *The Journal of Infectious Diseases*. 2019; 219 (Supplement_1): S1–4. DOI: 10.1093/infdis/jiy633.
10. Jin L, Zhou Y, Zhang S, Chen SJ. mRNA vaccine sequence and structure design and optimization: Advances and challenges. *Journal of Biological Chemistry*. 2025; 301 (1): 108015. DOI: 10.1016/j.jbc.2024.108015.
11. Kunyk D, Plotnikova M, Beshpalov M, Shevryev D, Klotchenko S, Ivanov R, et al. The Interplay Between Therapeutic Self-Amplifying RNA and the Innate Immune System: Balancing Efficiency and Reactogenicity. *IJMS*. 2025; 26 (18): 8986. DOI: 10.3390/ijms26188986.
12. Li J, Liu Y, Dai J, Yang L, Xiong F, Xia J, et al. mRNA Vaccines: Current Applications and Future Directions. *MedComm*. 2025; 6 (11): e70434. DOI: 10.1002/mco2.70434.
13. 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. DOI: 10.3390/vaccines12111267.
14. Ryapolova A, Shevryev D, Tsvetkova A, Sokolova O, Vasileva O, Andrianov V, et al. Enhanced Antitumor Effect of Oncolytic Virotherapy Combined with mRNA-Encoded Immunoadjuvants in Colorectal Carcinoma (CT26) Tumor Model. *Applied Biosciences*. 2025; 5 (1): 1. DOI: 10.3390/applbiosci5010001.
 15. FDA. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. 2005.
 16. World Health Organization, редактор. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: World Health Organization, 2011; 139 p.
 17. Allen JD, Ross TM. mRNA vaccines encoding computationally optimized hemagglutinin elicit protective antibodies against future antigenically drifted H1N1 and H3N2 influenza viruses isolated between 2018–2020. *Front Immunol*. 2024; 15: 1334670. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1334670.
 18. Cheung M, Chang C, Rathnasinghe R, Rossignol E, Zhang Y, Ferrari A, et al. Self-amplifying mRNA seasonal influenza vaccines elicit mouse neutralizing antibody and cell-mediated immunity and protect ferrets. *npj Vaccines*. 2023; 8 (1): 150. DOI: 10.1038/s41541-023-00747-2.
 19. Chang C, Music N, Cheung M, Rossignol E, Bedi S, Patel H, et al. Self-amplifying mRNA bicistronic influenza vaccines raise cross-reactive immune responses in mice and prevent infection in ferrets. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development*. 2022; 27: 195–205. DOI: 10.1016/j.omtm.2022.09.013.
 20. Cao RG, Suarez NM, Obermoser G, Lopez SMC, Flano E, Mertz SE, et al. Differences in Antibody Responses Between Trivalent Inactivated Influenza Vaccine and Live Attenuated Influenza Vaccine Correlate With the Kinetics and Magnitude of Interferon Signaling in Children. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014; 210 (2): 224–33. DOI: 10.1093/infdis/jiu079.
 21. Uno N, Ross TM. Multivalent next generation influenza virus vaccines protect against seasonal and pre-pandemic viruses. *Sci Rep*. 2024; 14 (1): 1440. DOI: 10.1038/s41598-023-51024-0.
 22. Reneer ZB, Bergeron HC, Reynolds S, Thornhill-Wadolowski E, Feng L, Bugno M, et al. mRNA vaccines encoding influenza virus hemagglutinin (HA) elicits immunity in mice from influenza A virus challenge. Huber VC, редактор. *PLoS ONE*. 2024; 19 (4): e0297833. DOI: 10.1371/journal.pone.0297833.
 23. Mazunina EP, Gushchin VA, Kleymentov DA, Siniavin AE, Burtseva EI, Shmarov MM, et al. Trivalent mRNA vaccine-candidate against seasonal flu with cross-specific humoral immune response. *Front Immunol*. 2024; 15: 1381508. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1381508.
 24. Vogel AB, Lambert L, Kinnear E, Busse D, Erbar S, Reuter KC, et al. Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Molecular Therapy*. 2018; 26 (2): 446–55. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.11.017.
 25. Gong Y, Yong D, Liu G, Xu J, Ding J, Jia W. A Novel Self-Amplifying mRNA with Decreased Cytotoxicity and Enhanced Protein Expression by Macrodomain Mutations. *Advanced Science*. 2024; 11 (43): 2402936. DOI: 10.1002/advs.202402936.
 26. Casmil IC, Friesen JJ, Bathula NV, Strumpel A, Ho CH, Guez I, et al. Divergent Delivery and Expression Kinetics of Lipid and Polymeric Nanoparticles across mRNA Modalities. *Advanced Science*. 2025; 12 (38): e08907. DOI: 10.1002/advs.202508907.
 27. McGee JE, Kirsch JR, Kenney D, Cerbo F, Chavez EC, Shih TY, et al. Complete substitution with modified nucleotides in self-amplifying RNA suppresses the interferon response and increases potency. *Nat Biotechnol*. 2025; 43 (5): 720–6. DOI: 10.1038/s41587-024-02306-z.
 28. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2023–2024 northern hemisphere influenza season.

References

1. Nuwarda RF, Alharbi AA, Kayser V. An Overview of Influenza Viruses and Vaccines. *Vaccines*. 2021; 9 (9): 1032. DOI: 10.3390/vaccines9091032.
2. Taubenberger JK, Kash JC, Morens DM. The 1918 influenza pandemic: 100 years of questions answered and unanswered. *Sci Transl Med*. 2019; 11 (502): eaau5485. DOI: 10.1126/scitranslmed.aau5485.
3. Taubenberger JK, Morens DM. Influenza: The Once and Future Pandemic. *Public Health Rep*. 2010; 125 (3_suppl): 15–26. DOI: 10.1177/00333549101250S305.
4. Stubbs TM, Te Velthuis AJ. The Rna-Dependent RNA Polymerase of the Influenza A Virus. *Future Virol*. 2014; 9 (9): 863–76. DOI: 10.2217/fvl.14.66.
5. Taylor MW. Vaccines Against Viral Infections. B: Viruses and Man: A History of Interactions. Cham: Springer International Publishing, 2014; p. 355–77 [цитируется по 30 март 2026 г.]. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-07758-1_19 DOI:10.1007/978-3-319-07758-1_19.
6. Bulgakova VA, Selimzyanova LR, Privalova TE, Yusupova DA. Immunisation of young children against influenza — evidence review. *Lechaschi Vrach*. 2022; 10 (25). DOI: 10.51793/OS.2022.25.10.009.
7. Zost SJ, Parkhouse K, Gumina ME, Kim K, Diaz Perez S, Wilson PC, et al. Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114 (47): 12578–83. DOI: 10.1073/pnas.1712377114.
8. Xie H, Wan XF, Ye Z, Plant EP, Zhao Y, Xu Y, et al. H3N2 Mismatch of 2014–15 Northern Hemisphere Influenza Vaccines and Head-to-head Comparison between Human and Ferret Antisera derived Antigenic Maps. *Sci Rep*. 2015; 5 (1): 15279. DOI: 10.1038/srep15279.
9. Paules CI, Fauci AS. Influenza Vaccines: Good, but We Can Do Better. *The Journal of Infectious Diseases*. 2019; 219 (Supplement_1): S1–4. DOI: 10.1093/infdis/jiy633.
10. Jin L, Zhou Y, Zhang S, Chen SJ. mRNA vaccine sequence and structure design and optimization: Advances and challenges. *Journal of Biological Chemistry*. 2025; 301 (1): 108015. DOI: 10.1016/j.jbc.2024.108015.
11. Kunyk D, Plotnikova M, Bespalov M, Shevryev D, Klotchenko S, Ivanov R, et al. The Interplay Between Therapeutic Self-Amplifying RNA and the Innate Immune System: Balancing Efficiency and Reactogenicity. *IJMS*. 2025; 26 (18): 8986. DOI: 10.3390/ijms26188986.
12. Li J, Liu Y, Dai J, Yang L, Xiong F, Xia J, et al. mRNA Vaccines: Current Applications and Future Directions. *MedComm*. 2025; 6 (11): e70434. DOI: 10.1002/mco2.70434.
13. 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. DOI: 10.3390/vaccines12111267.
14. Ryapolova A, Shevryev D, Tsvetkova A, Sokolova O, Vasileva O, Andrianov V, et al. Enhanced Antitumor Effect of Oncolytic Virotherapy Combined with mRNA-Encoded Immunoadjuvants in Colorectal Carcinoma (CT26) Tumor Model. *Applied Biosciences*. 2025; 5 (1): 1. DOI: 10.3390/applbiosci5010001.
15. FDA. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. 2005.
16. World Health Organization, редактор. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: World Health Organization, 2011; 139 p.
17. Allen JD, Ross TM. mRNA vaccines encoding computationally optimized hemagglutinin elicit protective antibodies against future antigenically drifted H1N1 and H3N2 influenza viruses isolated between 2018–2020. *Front Immunol*. 2024; 15: 1334670. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1334670.
18. Cheung M, Chang C, Rathnasinghe R, Rossignol E, Zhang Y, Ferrari A, et al. Self-amplifying mRNA seasonal influenza vaccines elicit mouse neutralizing antibody and cell-mediated immunity and protect ferrets. *npj Vaccines*. 2023; 8 (1): 150. DOI: 10.1038/s41541-023-00747-2.
19. Chang C, Music N, Cheung M, Rossignol E, Bedi S, Patel H, et al. Self-amplifying mRNA bicistronic influenza vaccines raise

- cross-reactive immune responses in mice and prevent infection in ferrets. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development*. 2022; 27: 195–205. DOI: 10.1016/j.omtm.2022.09.013.
20. Cao RG, Suarez NM, Obemose G, Lopez SMC, Flano E, Mertz SE, et al. Differences in Antibody Responses Between Trivalent Inactivated Influenza Vaccine and Live Attenuated Influenza Vaccine Correlate With the Kinetics and Magnitude of Interferon Signaling in Children. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014; 210 (2): 224–33. DOI: 10.1093/infdis/jiu079.
 21. Uno N, Ross TM. Multivalent next generation influenza virus vaccines protect against seasonal and pre-pandemic viruses. *Sci Rep*. 2024; 14 (1): 1440. DOI: 10.1038/s41598-023-51024-0.
 22. Reneer ZB, Bergeron HC, Reynolds S, Thornhill-Wadolowski E, Feng L, Bugno M, et al. mRNA vaccines encoding influenza virus hemagglutinin (HA) elicits immunity in mice from influenza A virus challenge. Huber VC, редактор. *PLoS ONE*. 2024; 19 (4): e0297833. DOI: 10.1371/journal.pone.0297833.
 23. Mazunina EP, Gushchin VA, Kleymentov DA, Siniavin AE, Burtseva EI, Shmarov MM, et al. Trivalent mRNA vaccine-candidate against seasonal flu with cross-specific humoral immune response. *Front Immunol*. 2024; 15: 1381508. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1381508.
 24. Vogel AB, Lambert L, Kinnear E, Busse D, Erbar S, Reuter KC, et al. Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Molecular Therapy*. 2018; 26 (2): 446–55. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.11.017.
 25. Gong Y, Yong D, Liu G, Xu J, Ding J, Jia W. A Novel Self-Amplifying mRNA with Decreased Cytotoxicity and Enhanced Protein Expression by Macrodomein Mutations. *Advanced Science*. 2024; 11 (43): 2402936. DOI: 10.1002/advs.202402936.
 26. Casmil IC, Friesen JJ, Bathula NV, Strumpel A, Ho CH, Guez I, et al. Divergent Delivery and Expression Kinetics of Lipid and Polymeric Nanoparticles across mRNA Modalities. *Advanced Science*. 2025; 12 (38): e08907. DOI: 10.1002/advs.202508907.
 27. McGee JE, Kirsch JR, Kenney D, Cerbo F, Chavez EC, Shih TY, et al. Complete substitution with modified nucleotides in self-amplifying RNA suppresses the interferon response and increases potency. *Nat Biotechnol*. 2025; 43 (5): 720–6. DOI: 10.1038/s41587-024-02306-z.
 28. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2023–2024 northern hemisphere influenza season.