

УДК 615.371:612.017.1:578.7:578.834.1

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-287-298>

Оригинальная статья | Original article



Двухкомпонентная мРНК-вакцина, сочетающая В- и Т-клеточные иммуногены вируса SARS-CoV-2, индуцирует гуморальный и клеточный иммунный ответ у мышей

М.Б. Боргоякова^{1,✉}, А.П. Рудомётов¹, С.В. Шарабрин¹,
Е.В. Старостина¹, В.А. Яковлев¹, Е.В. Яковлева¹, Д.И. Вахитов¹,
А.В. Зайковская¹, Л.А. Кисакова¹, Д.Н. Кисаков¹, К.П. Макарова¹,
Е.В. Дмитриенко², Л.И. Карпенко¹, А.А. Ильичёв¹

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре Сибирского отделения Российской академии наук, проспект Академика Лаврентьева, д. 8, г. Новосибирск, 630090, Российская Федерация

✉ Боргоякова Мария Борисовна; borgoyakova_mb@vector.nsc.ru, borgoyakova.mb@gmail.com

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Несмотря на эффективность существующих вакцин для профилактики COVID-19, появление новых штаммов вируса SARS-CoV-2 требует разработки иммуногенов, способных формировать широкий перекрестно-реактивный иммунный ответ. Перспективным подходом является создание мРНК-вакцин, индуцирующих как гуморальный, так и Т-клеточный ответ, что может обеспечить защиту против вариантов вируса, ускользающих от нейтрализующих антител.

ЦЕЛЬ. Исследование иммуногенности экспериментальной двухкомпонентной мРНК-вакцины, кодирующей искусственный мультиэпитопный Т-клеточный иммуноген и рецепторсвязывающий домен (RBD) S-белка вируса SARS-CoV-2, для обоснования возможности обеспечения широкого перекрестно-реактивного ответа, необходимого для эффективной защиты от высокоизменчивых вирусов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. мРНК синтезировали *in vitro*: mRNA-RBD кодировала RBD, mRNA-BSI — мультиэпитопный Т-клеточный иммуноген. Вакцинную мРНК инкапсулировали в липидные наночастицы (ЛНЧ); размер частиц оценивали методом динамического светорассеяния. Использовали мышей линии BALB/c (24 самки) — 4 группы по 6 особей. Для иммунизации внутримышечно дважды с интервалом 3 нед. вводили по 10 мкг мРНК-ЛНЧ по отдельности или в виде их смеси. Гуморальный ответ оценивали по титрам вирус-специфических и нейтрализующих антител, Т-клеточный ответ — методами ELISpot (по количеству спотообразующих единиц; SFUs), сэндвич-ИФА, внутриклеточного окрашивания цитокинов и проточной цитометрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ. ЛНЧ с инкапсулированной вакцинной мРНК имели размер 115,4–123,7 нм и низкий индекс полидисперсности (0,165–0,211). Двухкомпонентная вакцина (mRNA-RBD + mRNA-BSI) индуцировала у мышей высокие титры RBD-специфических (1:131322) и нейтрализующих антител к Ухань-подобному (Wuhan-Hu-1; 1:3620)

и омикрон-подобному штаммам (BA.5.2; 1:718). Т-клеточный ответ в группе с двухкомпонентной вакциной характеризовался высоким уровнем продукции IFN-γ: количество IFN-γ-продуцирующих лимфоцитов — 660 SFUs/млн (ELISpot); концентрация IFN-γ в культуре спленоцитов — 990 пкг/мл (ИФА), что значительно превышало показатели группы с введением mRNA-RBD (343 SFUs/млн и 60 пкг/мл соответственно). Внутриклеточное окрашивание показало повышение доли цитокин-продуцирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (IFN-γ, IL-2, TNF-α) во всех иммунизированных группах.

ВЫВОДЫ. Сочетание В- и Т-клеточных иммуногенов в двухкомпонентной мРНК-вакцине способствует усилению гуморального ответа и формированию широкого Т-клеточного ответа, что обеспечивает эффективное распознавание новых вариантов SARS-CoV-2. Полученные данные обосновывают перспективность данной платформы для создания вакцин против высокоизменяемых вирусных инфекций.

Ключевые слова: мРНК-вакцины; комбинированные вакцины; мультиэпитопный иммуноген; рецепторсвязывающий домен S-белка; RBD; нейтрализующие антитела; Т-клеточный иммунитет; перекрестно-реактивный Т-клеточный ответ; SARS-CoV-2

Для цитирования: Боргоякова М.Б., Рудомётов А.П., Шарабрин С.В., Старостина Е.В., Яковлев В.А., Яковлева Е.В., Вахитов Д.И., Зайковская А.В., Кисакова Л.А., Кисаков Д.Н., Макарова К.П., Дмитриенко Е.В., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А. Двухкомпонентная мРНК-вакцина, сочетающая В- и Т-клеточные иммуногены вируса SARS-CoV-2, индуцирует гуморальный и клеточный иммунный ответ у мышей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2026;26(3):287–298. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-287-298>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

A two-component mRNA vaccine combining B-cell and T-cell immunogens of SARS-CoV-2 induces humoral and cellular immune responses in mice

Mariya B. Borgoyakova^{1,✉} , Andrey P. Rudometov¹ , Sergei V. Sharabrin¹ ,
Ekaterina V. Starostina¹ , Vladimir A. Yakovlev¹ , Elena V. Yakovleva¹ ,
Danil I. Vahitov¹ , Anna V. Zaykovskaya¹ , Lyubov A. Kisakova¹ ,
Denis N. Kisakov¹ , Kristina P. Makarova¹ , Elena V. Dmitrienko² ,
Larisa I. Karpenko¹ , Alexander A. Ilyichev¹ 

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8 Academician Lavrentyev Ave., Novosibirsk 630090, Russian Federation

✉ Mariya B. Borgoyakova; borgoyakova_mb@vector.nsc.ru, borgoyakova.mb@gmail.com

ABSTRACT

INTRODUCTION. Despite the effectiveness of existing COVID-19 vaccines, the emergence of new SARS-CoV-2 variants necessitates the development of immunogens capable of eliciting a broad, cross-reactive immune response. A promising approach is the development of mRNA vaccines that induce both humoral and T-cell responses, which could provide protection against viral variants that evade neutralizing antibodies.

AIM. This study aimed to investigate the immunogenicity of an experimental two-component mRNA vaccine encoding an artificial multi-epitope T-cell immunogen and the receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 spike protein, to demonstrate the potential of this vaccine to elicit a broad, cross-reactive response required for effective protection against highly variable viruses.

MATERIALS AND METHODS. The mRNAs were synthesized *in vitro*: mRNA-RBD encoded the RBD, and mRNA-BSI encoded the multi-epitope T-cell immunogen. The vaccine mRNA was encapsulated in lipid nanoparticles (LNPs); particle size was assessed using dynamic light scattering. BALB/c mice (24 females) were divided into 4 groups of 6 animals each. For immunization, 10 µg of mRNA-LNP (either alone or as a mixture of the two constructs) was administered intramuscularly twice, 3 weeks apart. Humoral response was evaluated by titers of virus-specific and neutralizing antibodies; T-cell response was assessed by ELISpot (spot-forming units, SFUs), sandwich ELISA, intracellular cytokine staining, and flow cytometry.

RESULTS. The LNPs encapsulating the vaccine mRNA had a size of 115.4–123.7 nm and a low polydispersity index (0.165–0.211). The two-component vaccine (mRNA-RBD + mRNA-BSI) induced high titers of RBD-specific antibodies (1:131,322) and neutralizing antibodies against the Wuhan-Hu-1 strain (1:3,620) and the Omicron BA.5.2 strain (1:718). The T-cell response in the two-component vaccine group was characterized by high IFN-γ production: the number of IFN-γ-producing lymphocytes and the IFN-γ concentration in splenocyte culture were 660 SFUs/million cells (ELISpot) and 990 pg/mL (ELISA), respectively; both significantly exceeded the corresponding values in the mRNA-RBD group (343 SFUs/million and 60 pg/mL, respectively). Intracellular staining revealed an increased proportion of cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells (IFN-γ, IL-2, TNF-α) in all immunized groups.

CONCLUSIONS. The combination of B-cell and T-cell immunogens in a two-component mRNA vaccine enhances the humoral response and promotes a broad T-cell response, ensuring effective recognition of emerging SARS-CoV-2 variants. The data support the potential of this platform for the development of vaccines against highly variable viral infections.

Keywords: mRNA vaccines; combined vaccines; multi-epitope immunogen; receptor-binding domain of the spike protein; RBD; neutralizing antibodies; T-cell immunity; cross-reactive T-cell response; SARS-CoV-2

For citation: Borgoyakova M.B., Rudometov A.P., Sharabrin S.V., Starostina E.V., Yakovlev V.A., Yakovleva E.V., Vahitov D.I., Zaykovskaya A.V., Kisakova L.A., Kisakov D.N., Makarova K.P., Dmitrienko E.V., Karpenko L.I., Ilyichev A.A. A two-component mRNA vaccine combining B-cell and T-cell immunogens of SARS-CoV-2 induces humoral and cellular immune responses in mice. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(3):287–298. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-287-298>

Funding. The study was funded under the state assignment of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.

Disclosure. The authors declare no conflicts of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19 стимулировала разработку новых подходов к созданию вакцин, в том числе с использованием рекомбинантных технологий [1–3]. Основным антигеном SARS-CoV-2, на основе которого создавались вакцины, являлся S-белок, обеспечивающий проникновение в клетку-мишень [4, 5], и большинство нейтрализующих антител нацелены на его рецепторсвязывающий домен (receptor binding domain, RBD) [6–11]. Индуцируемые при вакцинации нейтрализующие специфические антитела являются признанным коррелятом защиты [12–14], однако эффективность антител, сформированных к антигенам вакцинного штамма, существенно снижается

в отношении новых вариантов вируса из-за мутаций в S-белке [15–18].

T-клеточный ответ, в отличие от гуморального, направлен на более консервативные эпитопы внутренних белков и дольше сохраняет активность против новых вариантов вируса. Однако длительная циркуляция SARS-CoV-2 в человеческой популяции привела к появлению вариантов, уклоняющихся от цитотоксического T-клеточного ответа [19–23]. Защитная роль T-клеток подтверждена у переболевших SARS-CoV и MERS-CoV, а также у пациентов с COVID-19 без детектируемых антител [24–26]. Показано, что поствакцинальный T-клеточный ответ, индуцируемый зарегистрированными вакцинами, является перекрестно-реактивным и устойчивым

к мутациям омикрон-подобного штамма (B.1.1.529) [27]. В связи с этим все большее внимание уделяется разработке иммуногенов, способных индуцировать Т-клеточный ответ.

Одним из подходов является использование мультиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, состоящих из консервативных CTL- и Th-эпитопов различных вирусных белков. Эффективность таких конструкций была продемонстрирована в исследованиях вакцин для профилактики инфекций, вызываемых вирусами гриппа, Эбола и ВИЧ [28–32]. Однако комбинация таких конструкций с В-клеточными иммуногенами изучена мало. Для их доставки оптимальна мРНК-платформа, обеспечивающая эндогенный процессинг и презентацию антигена в комплексе с МНС I и МНС II (главный комплекс гистосовместимости I/II типа, major histocompatibility complex I/II).

В настоящей работе впервые представлены результаты доклинического исследования двухкомпонентной мРНК-вакцины, состоящей из конструкций mRNA-RBD (В-клеточный иммуноген) и mRNA-BSI (Т-клеточный иммуноген), с оценкой гуморальных (титры антител, вируснейтрализация) и Т-клеточных (ELISpot, цитокиновый профиль) показателей иммунного ответа.

Цель работы — исследование иммуногенности экспериментальной двухкомпонентной мРНК-вакцины, кодирующей искусственный мультиэпитопный Т-клеточный иммуноген и рецепторсвязывающий домен (RBD) S-белка вируса SARS-CoV-2, для обоснования возможности обеспечения широкого перекрестно-реактивного ответа, необходимого для эффективной защиты от высокоизменчивых вирусов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн иммуногенов

Иммуноген, кодирующий RBD S-белка SARS-CoV-2, конструировали на основе последовательности Ухань-подобного штамма (Wuhan-Hu-1) (GenBank MN908947)¹. К N-концу RBD добавляли сигнальный пептид для усиления секреции белка [33].

Для дизайна мультиэпитопного иммуногена (BSI) последовательности белков S, M, N и E (штамм Wuhan-Hu-1, GenBank MN908947) анализировали на содержание Т-клеточных эпитопов, рестриктируемых МНС I и II человека и мыши, с помощью инструментов IEDB (версия 2.22)². Дополнительными источниками эпитопов служили экспериментальные работы по Т-клеточному ответу у лиц, переболевших COVID-19 (табл. S1,

Приложение 1 размещено на сайте журнала³). Блилежащие или перекрывающиеся эпитопы группировали в фрагменты, сохраняя их нативное расположение. Фрагменты последовательно объединяли без линкеров; к N-концу добавляли убиквитин как сигнал для внутриклеточного процессинга [34]. Консервативность фрагментов оценивали сравнением с последовательностями линий B.1.1.7 (альфа, OL752444), B.1.351 (бета, OQ439760), B.1.1.248 (гамма, MT947548), B.1.617.2 (дельта, PX393515), BA.5.2, XBB.1.5, JN.1, NB.1.8.1, LP.8.1.1 и XFG (омикрон, PP847684, PX120540, PP832908, PX467497, PX105736, PX471381), доступными в GenBank.

Целевые гены оптимизировали для экспрессии в клетках млекопитающих, синтезировали (ООО «ДНК-синтез», Россия) и клонировали в рекомбинантную плазмиду pVAX-Cas1CC [35]. Структуру полученных конструкций подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

Синтез мРНК

ДНК-матрицы нарабатывали, очищали с использованием набора HiPure Plasmid Mini Kit (Magen, Китай) и линейаризовали с использованием эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* (ООО «СибЭнзайм», Россия).

мРНК синтезировали с использованием коммерческого набора (Yeasen, Китай) по ранее описанному протоколу [36], включающему ферментативный синтез, обработку ДНКазой (ООО «Биолабмикс», Россия) и очистку продукта. Полученные мРНК обозначали как mRNA-RBD и mRNA-BSI.

Получение и оценка мРНК-липидных комплексов

Протокол получения липидных наночастиц (ЛНЧ) с инкапсулированной мРНК (мРНК-ЛНЧ) описан ранее [35]. Компоненты липидного состава (SM-102, DSPC, холестерин, DMG-PEG2000) растворяли в этаноле, смешивали с водным раствором мРНК в микрофлюидном смесителе Automated NP System (Dolomite Microfluidics, Великобритания), диализовали против фосфатно-солевого буфера (PBS), концентрировали и доводили до нужной концентрации PBS. Итоговые композиции стерилизовали, пропустив через фильтр 0,22 мкм (Jet Biofil, Китай). ЛНЧ хранили при температуре 4 °С. Полученные комплексы мРНК-ЛНЧ обозначали как mRNA-RBD-LNP и mRNA-BSI-LNP.

Размер частиц определяли методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS Plus (Malvern Instruments,

¹ GenBank. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

² <https://www.iedb.org>

³ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-287-298-annex1>

Великобритания). Для каждого образца использовали кюветы ZEN0040 и измеряли гидродинамический размер частиц (Z-average) и индекс полидисперсности (Pdl) в трех повторах при температуре 25 °C.

Иммунизация животных

Эксперименты проводили в соответствии с национальными и международными нормативными требованиями⁴. Протокол исследований был одобрен Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол БЭК № 4 от 11.04.2025). Самок мышей линии BALB/c (4–6 нед., 16–18 г, $n=24$) получали из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Животных случайно распределяли по четырем группам (по 6 особей) и содержали в стандартных условиях вивария.

Иммунизацию проводили внутримышечно дважды с интервалом 3 нед. Группа 1 получала 10 мкг mRNA-RBD-LNP, группа 2 – 10 мкг mRNA-BSI-LNP, группа 3 – смесь 10 мкг mRNA-RBD-LNP и 10 мкг mRNA-BSI-LNP (в пересчете на дозу мРНК). Объем инъекции – 100 мкл (по 50 мкл в каждую заднюю бедренную мышцу). Интактные мыши служили отрицательным контролем.

Подготовка образцов сывороток и спленоцитов

Кровь и селезенки мышей забирали через 14 сут после второй иммунизации и обрабатывали по ранее описанному протоколу [37].

Иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА проводили по протоколу, описанному ранее [37]. В качестве сорбента использовали рекомбинантный RBD (1 мкг/мл в 2М мочевины), полученный в клетках CHO-K1. IgG выявляли козьими антителами к мышиным IgG, конъюгированными с пероксидазой (Invitrogen, США). Оптическую плотность (ОП) измеряли при 450 нм с помощью планшетного спектрофотометра Feyond-A300/A400 (Hangzhou Allsheng Instruments Co. Ltd., Китай). Титр определяли как наибольшее разведение сыворотки, при котором ОП превышала фоновый уровень не менее чем в 2 раза.

Анализ вируснейтрализующей активности

Нейтрализующую активность антител в сыворотках определяли в тесте ингибирования цитопатического действия (ЦПД) вируса на куль-

туре клеток Vero E6 (Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Использовали штаммы hCov-19/Australia/VIC01/2020 (Ухань-подобный, EPI_ISL_16613436) и hCov-19/Russia/Moscow-49415/2022 (омикрон-подобный BA.5.2, EPI_ISL_406844), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Исследование проводили по протоколу, описанному ранее [37]. Титр нейтрализующих антител рассчитывали по формуле Рида–Менча.

Анализ Т-клеточного ответа

Т-клеточный ответ оценивали методами ELISpot и внутриклеточного окрашивания цитокинов с проточной цитометрией по протоколу, описанному ранее [37]. При проведении ELISpot использовали набор Mabtech ELISpot Plus: Mouse IFN-gamma (ALP) Pre-coated (MABTECH, Швеция) и систему визуализации на базе стереомикроскопии (Carl Zeiss, Германия). Уровень Т-клеточного ответа оценивали по количеству IFN- γ -продуцирующих лимфоцитов, выраженному в количестве спотообразующих единиц (SFUs) на 1 млн спленоцитов. Для детекции маркеров лимфоцитов и цитокинов использовали антитела: anti-CD3 Alexa Fluor 700 (клон 500A2), anti-CD4 BV785 (клон GK1.5), anti-CD8 FITC (клон 53-6.7), anti-IFN- γ APC (клон XMGI.2), anti-IL-2 BV421 (клон JES6-5H4), anti-TNF- α BV650 (клон MP6-XT22) (все – BioLegend, США). Анализ проводили с помощью цитофлюориметра ZE5 (Bio-Rad, США).

Определение концентрации цитокинов

Спленоциты культивировали в среде RPMI-1640 с L-глутамином («ПанЭко», Россия), 10% фетальной бычьей сывороткой и гентамицином (50 мкг/мл) («БиолоТ», Россия). Для стимуляции добавляли пул пептидов [34], или митоген (30 мкл конканавалина А, «ПанЭко», Россия) – положительный контроль, или среду – отрицательный контроль. Спленоциты инкубировали при температуре 37 °C в 5% CO₂. Через 48 ч собирали культуральную среду, центрифугировали при 2500 g 10 мин и отбирали аликвоты для анализа.

Концентрацию цитокинов IFN- γ , IL-2, IL-4 и TNF- α определяли с использованием наборов ABclonal (Китай) согласно инструкции производителя. Образцы анализировали в двух повторностях; результаты представлены как средние

⁴ ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур.

Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. https://ruslasa.ru/wp-content/uploads/2017/06/Directive_201063_rus.pdf

значения. Измерения выполняли с использованием программного обеспечения для спектрофотометра Feyond-A300/A400.

Статистический анализ

Данные обрабатывали с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с последующим апостериорным анализом по критерию Данна в программе GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США)⁵. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дизайн мультиэпитопного Т-клеточного иммуногена

Для создания искусственного Т-клеточного иммуногена использовали подход, основанный на последовательном объединении иммунодоминантных фрагментов белков S, E, M и N в одну конструкцию. Фрагменты выбраны

по наличию в их составе наибольшего количества эпитопов, рестриктурируемых МНС I и МНС II человека и мыши. К N-концу добавляли универсальный Th-эпитоп PADRE (Pan HLA-DR-binding epitope), а к карбоксильному концу – репортерный эпитоп для оценки экспрессии целевого гена в культуре клеток (табл. 1). К N-концу также присоединяли убиквитин для усиления протеасомного процессинга [38].

Консервативность эпитопов иммуногена варьировала от 81,25 до 100% для широкого спектра штаммов, включая актуальные в 2025 г. XFG, LP.8.1.1. и NB.1.8.1 (рис. S1, Приложение 2 размещено на сайте журнала⁶). Наименьшую консервативность показал фрагмент, перекрывающийся с RBD: 81,25–97,92% для 7 из 10 штаммов. Для фрагмента M1 консервативность составила 96,67% также для 7 из 10 штаммов. Фрагменты S2, E, N1 и N2 имели по одной

Таблица 1. Аминокислотные последовательности в составе искусственного Т-клеточного иммуногена BSI

Table 1. Amino acid sequences included in the artificial T-cell immunogen BSI

Аминокислотная последовательность <i>Amino acid sequence</i>	Название <i>Name</i>	Локализация в белке <i>Protein localization</i>
MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGV	Убиквитин <i>Ubiquitin</i>	–
MAKFVAAWTLKAAA	Эпитоп PADRE <i>PADRE epitope</i>	–
IADYNYKLPPDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNYNYLYRLFRKSNLKPFE	S1 фрагмент <i>S1 fragment</i>	418–465
SIIAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTI	S2 фрагмент <i>S2 fragment</i>	691–720
GLTVLPPLLTDEIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAA	S3 фрагмент <i>S3 fragment</i>	857–893
HLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEK	S4 фрагмент <i>S4 fragment</i>	1048–1073
NLNESLIDLQELGKYEYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMTIM	S5 фрагмент <i>S5 fragment</i>	1192–1233
SLVKPSFYVYSRVKNLNSRRVPDLLV	E фрагмент <i>E fragment</i>	50–75
TLACFVLAAYRINWITGGIAIAMACLVGL	M1 фрагмент <i>M1 fragment</i>	61–90
KEITVATSRTLSTYYKLGASQVRVAGDSGFAAY	M2 фрагмент <i>M2 fragment</i>	166–196
FPRGQGVPIINTSSPDDQIGYYRRATRIRRGDGK	N1 фрагмент <i>N1 fragment</i>	66–100
WPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKDKKKK	N2 фрагмент <i>N2 fragment</i>	301–375
EPFRDYVDRFYKTLR	Маркерный эпитоп <i>Marker epitope</i>	–

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors based on their own data

⁵ <https://cdn.graphpad.com/docs/prism/6/Prism-6-User-Guide.pdf>

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-287-298-annex2>

замене (96,15–98,67% гомологии) в разных штаммах.

Характеристика мРНК-конструкций

мРНК-конструкции mRNA-RBD и mRNA-BSI, кодирующие RBD S-белка SARS-CoV-2 и мультиэпитопный Т-клеточный иммуноген, получены матричным синтезом *in vitro*. Гены были фланкированы 3'- и 5'-UTR из гена α -глобина человека и содержали поли(А)-хвост длиной ~110 нуклеотидов (рис. 1).

Целостность синтезированных мРНК подтверждена электрофорезом в 2% агарозном геле (рис. S2, Приложение 2). Полосы соответствовали теоретической длине (1025 оснований – mRNA-RBD, 1766 оснований – mRNA-BSI); примеси отсутствовали.

Характеристика мРНК-липидных комплексов

По данным динамического светорассеяния (табл. S2, рис. S3–S5, Приложение 2) частицы mRNA-RBD-LNP имели размер $123,7 \pm 2,6$ нм, mRNA-BSI-LNP – $121,0 \pm 2,0$ нм, mRNA-RBD-LNP + mRNA-BSI-LNP – $115,4 \pm 1,4$ нм; Pdl составил $0,165 \pm 0,006$, $0,172 \pm 0,024$, $0,211 \pm 0,020$ соответственно.

Гуморальный иммунный ответ

Мышам внутримышечно вводили мРНК-ЛНЧ по схеме, представленной на рисунке 2. В конечной точке эксперимента методом ИФА выявлено формирование RBD-специфического гуморального ответа у животных, получавших mRNA-RBD или смесь мРНК. Титры антител составили 1:79543 (группа, получавшая mRNA-RBD) и 1:131322 (группа, получавшая двухкомпонентную вакцину), что указывает на двукратное повышение уровня антител при иммунизации смесью мРНК (рис. 3A). Сыворотки этих групп также проявили нейтрализующую активность против Ухань-подобного и омикрон-подобного (BA.5.2) штаммов. В группе, получавшей mRNA-RBD, титры нейтрализующих антител составили 1:1140 (Ухань-подобный штамм) и 1:113 (омикрон-подобный BA.5.2 штамм); в группе, получавшей двухкомпонентную вакцину – 1:3620 и 1:718 соответственно (рис. 3A–C). Высокие титры перекрестно-реактивных нейтрализующих антител выявлены в сыворотках мышей, получавших mRNA-RBD и двухкомпонентную мРНК-вакцину, причем титры в группе с комбинацией мРНК-конструкций были выше,

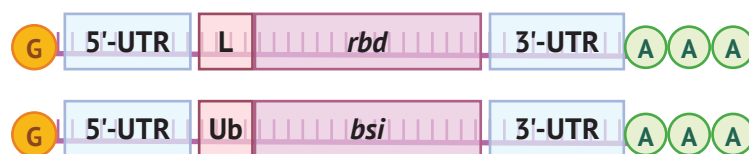


Рисунок подготовлен авторами с использованием ресурса BioRender.com / The figure was prepared by the authors using BioRender.com

Рис. 1. Схема строения мРНК-конструкций mRNA-RBD (A) и mRNA-BSI (B). G – аналог кэпа m7GmAmG; 5'- и 3'-UTR – нетранслируемые области α -глобина человека; L – химерная лидерная последовательность; Ub – убиквитин; AAA – поли(А)-хвост.

Fig. 1. Schematic structures of mRNA-RBD (A) and mRNA-BSI (B) constructs. G, cap analog of m7GmAmG; 5'- and 3'-UTRs, untranslated regions from the human α -globin; L, chimeric leader sequence; Ub, ubiquitin; AAA, poly(A) tail.

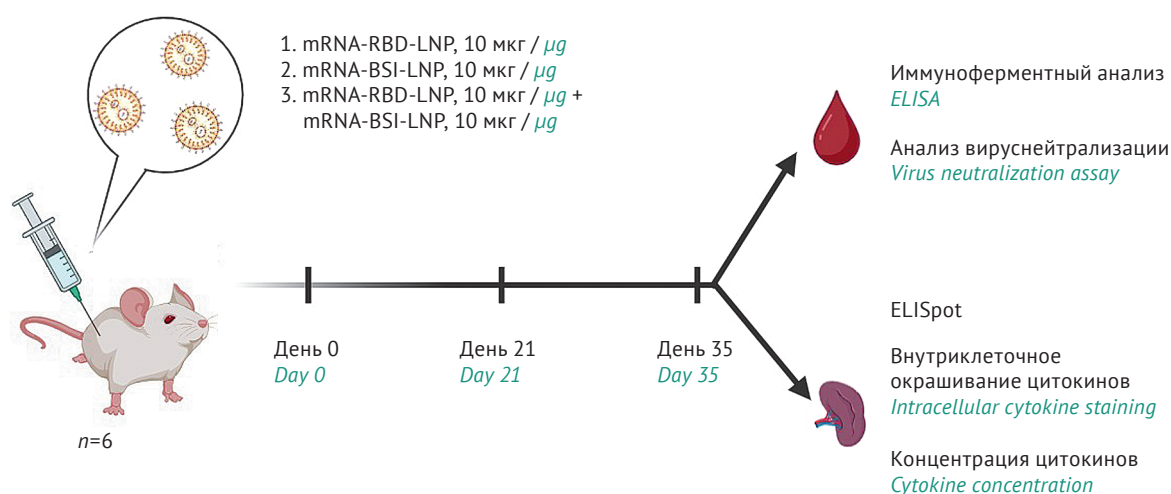


Рисунок подготовлен авторами с использованием ресурса biorender.com / The figure was prepared by the authors using BioRender.com

Рис. 2. Схема эксперимента по оценке иммуногенности мРНК-вакцин.

Fig. 2. Schematic representation of the experiment to assess the immunogenicity of mRNA vaccines.

что подтверждает усиление функционального гуморального ответа.

Клеточный иммунный ответ

ELISpot подтвердил формирование Т-клеточного ответа у мышей всех групп с введением мРНК-вакцин. Среднее количество IFN- γ -продуцирующих клеток на 10^6 спленоцитов составило: в группе mRNA-BSI – 104 SFUs, в группе mRNA-RBD – 343 SFUs, в группе mRNA-RBD + mRNA-BSI – 660 SFUs, в контрольной группе – 3 SFUs (рис. 4А, 4В). В супернатантах спленоцитов (через 48 ч инкубации) максимальная продукция цитокинов IFN- γ , IL-2 и TNF- α зафиксирована в группе с двухкомпонентной мРНК-вакциной (рис. 4С–Е). IL-4 не обнаружен.

Данные проточной цитометрии после внутриклеточного окрашивания цитокинов показали формирование Т-клеточного ответа во всех экспериментальных группах – доля цитокин-продуцирующих Т-клеток превышала показатели отрицательного контроля (рис. S6, Приложение 2). Статистически значимых различий между группами не обнаружено.

Таким образом, иммунизация мышей линии BALB/c мРНК-вакциной mRNA-RBD индуцировала специфический гуморальный (включая вируснейтрализующий) и клеточный ответ. Добавление mRNA-BSI приводило к усилению иммунного ответа: повышались титры специ-

ческих и нейтрализующих антител, а также интенсивность Т-клеточного ответа.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основная проблема вакцин для профилактики COVID-19 – снижение эффективности нейтрализующих антител в отношении новых штаммов, в то время как Т-клеточный иммунитет, направленный на консервативные эпитопы, сохраняет возможность обеспечивать перекрестную защиту.

Показано, что у лиц, перенесших заболевания, вызванные SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2, формировался Т-клеточный ответ против внутренних белков вируса, сохранявший реактивность при появлении новых штаммов [24, 25]. Мультиэпитопные Т-клеточные иммуногены фокусируют клеточный иммунный ответ на консервативных эпитопах, что критически важно при создании вакцин против вирусов с высокой изменчивостью. В то же время представление о строгой консервативности Т-клеточных эпитопов дискуссионно: под давлением Т-клеточного ответа SARS-CoV-2 может приобретать мутации, что позволяет вирусу уклоняться от ответа цитотоксических лимфоцитов [22, 23]. Тем не менее разработка искусственных мультиэпитопных конструкций остается активной областью исследований [39–43].

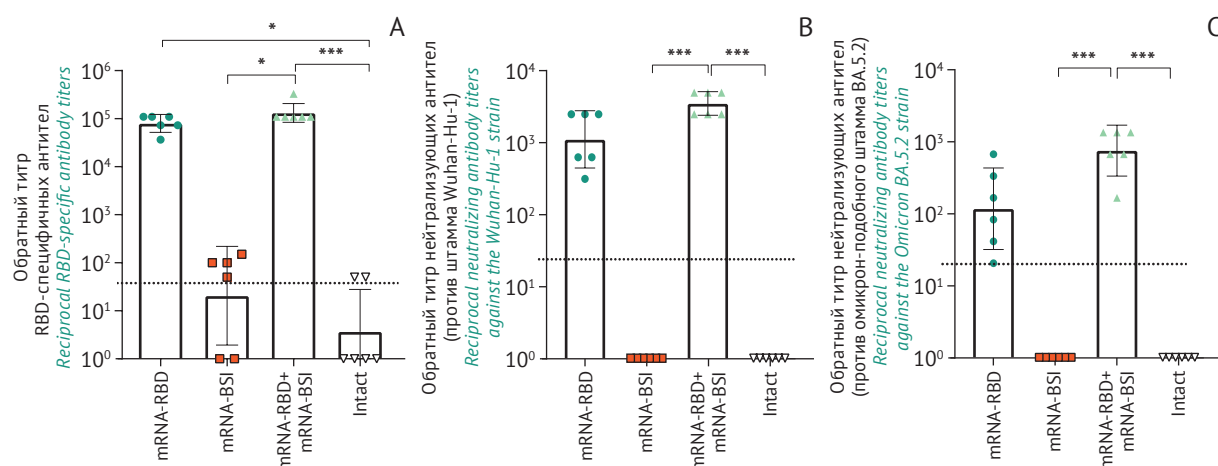


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors based on their own data

Рис. 3. Гуморальный ответ у мышей, иммунизированных мРНК-конструкциями mRNA-RBD, mRNA-BSI и их смесью. А – обратные титры RBD-специфических антител (ИФА). Обратные титры антител в реакции нейтрализации: В – против штамма Wuhan-Hu-1. С – против омикрон-подобного штамма BA.5.2. Данные представлены как средние геометрические $\pm$ стандартное отклонение; индивидуальные значения отмечены точками. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным анализом по Данну). Пунктирной линией обозначен предел обнаружения метода: 50 (ИФА), 20 (вируснейтрализация). Intact – отрицательный контроль.

Fig. 3. Humoral immune response in mice immunized with mRNA-RBD, mRNA-BSI, and their combination. A. Reciprocal titers of RBD-specific antibodies (ELISA). Reciprocal titers of neutralizing antibodies: B, against the Wuhan-Hu-1 strain; C, against the Omicron BA.5.2 strain. Data are presented as geometric means $\pm$ standard deviation; individual values are shown as dots. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Kruskal–Wallis test with Dunn's *post hoc* analysis). The dashed line indicates the detection limit: 50 (ELISA), 20 (virus neutralization). Intact, negative control.

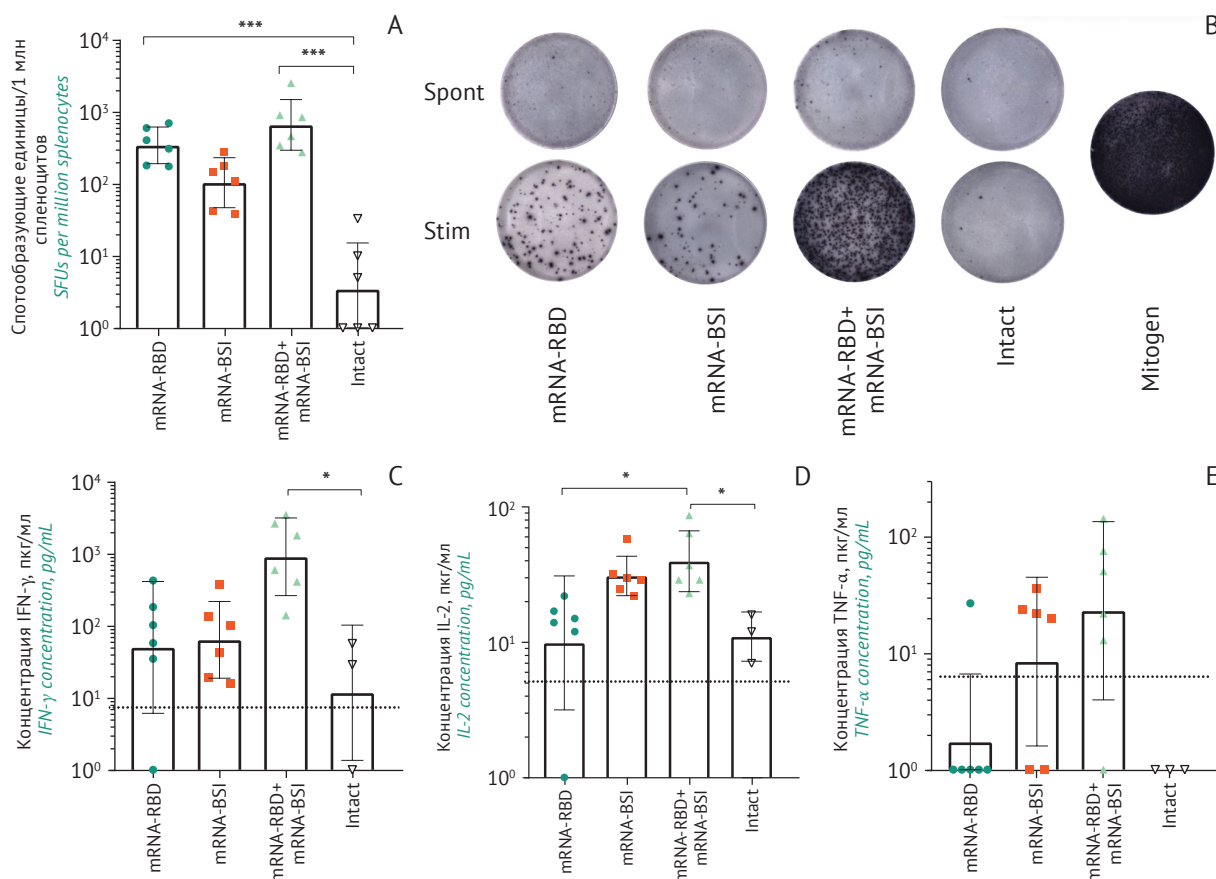


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors based on their own data

Рис. 4. Клеточный иммунный ответ у мышей, иммунизированных мРНК-конструкциями mRNA-RBD, mRNA-BSI и их смесью. А – число IFN-γ-продуцирующих клеток (ELISpot). В – изображения репрезентативных лунок ELISpot: Spont – без стимуляции; Stim – стимуляция пулом вирус-специфических пептидов; Mitogen – стимуляция конканавалином А; Intact – контроль. С–Е – концентрация цитокинов IFN-γ (С), IL-2 (D), TNF-α (E) в супернатантах спленоцитов иммунизированных животных. Данные представлены как средние геометрические ± стандартное отклонение; индивидуальные значения отмечены точками. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным анализом по Данну). Пунктирной линией обозначен предел обнаружения метода: IFN-γ 7 пкг/мл, IL-2 – 4 пкг/мл, TNF-α – 6,5 пкг/мл.

Fig. 4. Cellular immune response in mice immunized with mRNA-RBD, mRNA-BSI, and their combination. A. Number of IFN-γ-producing cells, SFUs (ELISpot). B. Representative images of ELISpot wells: Spont, unstimulated; Stim, stimulation with a pool of virus-specific peptides; Mitogen, stimulation with concanavalin A; Intact, control. C–E. Concentration of cytokines IFN-γ (C), IL-2 (D), and TNF-α (E) in supernatants of splenocytes from immunized animals. Data are presented as geometric means ± standard deviation; individual values are shown as dots. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Kruskal-Wallis test with Dunn's *post hoc* analysis). The dashed line indicates the detection limit of the method: IFN-γ, 7 pg/mL, IL-2, 4 pg/mL, TNF-α, 6.5 pg/mL.

В нашей работе получена конструкция mRNA-BSI, кодирующая искусственный мульти-эпитопный иммуноген из фрагментов белков SARS-CoV-2 (рис. 2B), обладающих консервативностью более 81% относительно штаммов 2020–2025 гг. (рис. S1). Мы использовали уникальную стратегию для сборки антигена: определяли фрагменты вирусных белков, содержащие множество перекрывающихся эпитопов, рестриктируемых MHC I и II человека и мыши, объединяли их в одну конструкцию и дополняли универсальным Th-эпитопом PADRE, убиквитином и маркерным эпитопом (табл. 1). Иммуноген BSI ранее был получен в формате ДНК-вакцины и показал способность

индуцировать Т-клеточный ответ как при индивидуальном введении, так и в сочетании с ДНК-вакциной, кодирующей В-клеточный иммуноген, и с белком RBD [34, 44, 45].

Наиболее эффективное усиление иммунного ответа достигается комбинацией двух иммуногенов – В-клеточного (стимулирующего гуморальный иммунитет) и Т-клеточного. В нашей работе реализован подход создания двухкомпонентной мРНК-вакцины из смеси двух мРНК: mRNA-RBD, кодирующей В-клеточный иммуноген RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, являющийся мишенью нейтрализующих антител (штамм Wuhan-Hu-1), и mRNA-BSI, кодирующей мультиэпитопный Т-клеточный иммуноген (рис. 1A, B).

Липидные наночастицы являются стандартным средством доставки мРНК-вакцин и были использованы в данной работе. Контроль размеров частиц методом динамического светорассеяния подтвердил нахождение размера частиц в оптимальном диапазоне с низким разбросом значений [46, 47].

Исследование гуморального иммунного ответа у мышей линии BALB/c после иммунизации показало, что в группах с введением mRNA-RBD и смеси вакцин формировались высокие титры RBD-специфических антител с нейтрализующей активностью против Ухань-подобного и омикрон-подобного штаммов SARS-CoV-2 (рис. 3). Добавление Т-клеточного иммуногена приводило к повышению нейтрализующих титров не только против исходного штамма, но и против омикрон-подобного.

При оценке клеточного ответа (IFN- γ -ELISpot и ИФА культуральных сред) в группе с введением смеси мРНК-вакцин показан повышенный уровень секреции IFN- γ по сравнению с другими группами (рис. 4А, В). В целом Т-клеточный ответ свидетельствует об индукции вирус-специфических цитотоксических лимфоцитов и Т-хелперов у животных, иммунизированных всеми типами вакцин (рис. 4, 5б). Наблюдаемые расхождения между методами, вероятно, обусловлены различиями в аналитических возможностях каждого подхода, сложностью Т-клеточного ответа и условиями стимуляции.

В отличие от ДНК-вакцин, которые часто индуцируют более сильный Т-клеточный, но слабый гуморальный ответ [48, 49], мРНК-вакцина обеспечивала быстрое нарастание высоких титров антител [34, 45]. Наблюдаемое усиление нейтрализующей активности при комбинации вакцин обусловлено антиген-специфическим Т-клеточным ответом, а также возможной неспецифической стимуляцией врожденного иммунитета липидными наночастицами [46, 50, 51].

Ограничением данного исследования является отсутствие данных о защитных свойствах вакцины в экспериментах на лабораторных животных, что позволило бы более полноценно оценить эффективность.

Таким образом, разработанная двухкомпонентная мРНК-вакцина обеспечивает мощный гуморальный иммунитет и широкий Т-клеточный ответ, превосходящий таковой при использовании только В-клеточного компонента. Предложенный подход перспективен для платформенных вакцин, позволяя быстро актуализировать В-клеточный компонент и сохранять перекрестную защиту за счет консервативного Т-клеточного иммуногена. Эта стратегия также может быть применена для создания вакцин для профилактики заболеваний, вызываемых другими высокоизменчивыми вирусами, такими как грипп и ВИЧ.

ВЫВОДЫ

1. Сконструирован мультиэпитопный Т-клеточный иммуноген BSI, состоящий из фрагментов белков S, M, N, E вируса SARS-CoV-2, обладающих консервативностью более 81% среди штаммов, циркулировавших в 2020–2025 гг.
2. Получены липидные наночастицы с инкапсулированными мРНК-вакцинами с размером 115,4–123,7 нм и низким индексом полидисперсности (0,165–0,211).
3. Двухкомпонентная мРНК-вакцина (mRNA-RBD + mRNA-BSI) индуцирует высокие титры RBD-специфических (1:131322) и нейтрализующих антител против Ухань-подобного (1:3620) и омикрон-подобного BA.5.2 (1:718) штаммов.
4. Добавление Т-клеточного компонента (mRNA-BSI) к В-клеточному (mRNA-RBD) повышает титры нейтрализующих антител против омикрон-подобного штамма более чем в 6 раз.
5. В группе с двухкомпонентной вакциной уровень секреции IFN- γ был выше (в ELISpot – 660 SFUs; в ИФА – 919 пкг/мл), чем при введении только mRNA-RBD (343 SFUs и 60 пкг/мл соответственно), что свидетельствует о более сильном Т-клеточном ответе.
6. Во всех иммунизированных группах с помощью внутриклеточного окрашивания и проточной цитометрии выявлена индукция вирус-специфических цитотоксических лимфоцитов и Т-хелперов, продуцирующих IFN- γ , IL-2 и TNF- α .

Литература/References

1. Park JW, Lagniton PNP, Liu Y, Xu RH. mRNA vaccines for COVID-19: What, why and how. *Int J Biol Sci*. 2021;17(6):1446–60. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59233>
2. Deng S, Liang H, Chen P, et al. Viral vector vaccine development and application during the COVID-19 pandemic. *Microorganisms*. 2022;10(7):1450. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071450>
3. Yadav T, Srivastava N, Mishra G, et al. Recombinant vaccines for COVID-19. *Hum Vaccin Immunother*. 2020;16(12):2905–12. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1820808>
4. Yan R, Zhang Y, Li Y, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*. 2020;367(6485):1444–8. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>
5. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281–92.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058> Erratum in: *Cell*. 2020;183(6):1735. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.032>
6. Shi R, Shan C, Duan X, et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. *Nature*. 2020;584(7819):120–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2381-y>

7. Chi X, Yan R, Zhang J, et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science*. 2020;369(6504):650–5. <https://doi.org/10.1126/science.abc6952>
8. Yi C, Sun X, Ye J, et al. Key residues of the receptor binding motif in the spike protein of SARS-CoV-2 that interact with ACE2 and neutralizing antibodies. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(6):621–30. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0458-z>
9. Salvatori G, Luberto L, Maffei M, et al. SARS-CoV-2 SPIKE PROTEIN: An optimal immunological target for vaccines. *J Transl Med*. 2020;18(1):222. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02392-y>
10. Montgomerie I, Bird TW, Palmer OR, et al. Incorporation of SARS-CoV-2 spike NTD to RBD protein vaccine improves immunity against viral variants. *iScience*. 2023;26(4):106256. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106256>
11. Wang Y, Wang L, Cao H, Liu C. SARS-CoV-2 S1 is superior to the RBD as a COVID-19 subunit vaccine antigen. *J Med Virol*. 2021;93(2):892–8. <https://doi.org/10.1002/jmv.26320>
12. Yu HQ, Sun BQ, Fang ZF, et al. Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients. *Eur Respir J*. 2020;56(2):2001526. <https://doi.org/10.1183/13993003.01526-2020>
13. Paces J, Strizova Z, Smrz D, Cerny J. COVID-19 and the immune system. *Physiol Res*. 2020;69(3):379–88. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934492>
14. Gruell H, Vanshylla K, Weber T, et al. Antibody-mediated neutralization of SARS-CoV-2. *Immunity*. 2022;55(6):925–44. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.05.005>
15. Weisblum Y, Schmidt F, Zhang F, et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife*. 2020;9:e61312. <https://doi.org/10.7554/elife.61312>
16. Mellis IA, Wu M, Hong H, et al. Antibody evasion and receptor binding of SARS-CoV-2 LP.8.1.1, NB.1.8.1, XFG, and related subvariants. *Cell Rep*. 2025;44(10):116440. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.116440>
17. Triveri A, Serapian SA, Marchetti F, et al. SARS-CoV-2 spike protein mutations and escape from antibodies: A computational model of epitope loss in variants of concern. *J Chem Inf Model*. 2021;61(9):4687–700. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00857>
18. Luan B, Huynh T. Insights into SARS-CoV-2's mutations for evading human antibodies: Sacrifice and survival. *J Med Chem*. 2022;65(4):2820–6. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00311>
19. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020;584(7821):457–62. <https://doi.org/10.1038/s41590-024-02051-0>
20. Geers D, Shamier MC, Bogers S, et al. SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccines. *Sci Immunol*. 2021;6(59):eabj1750. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abj1750>
21. Ahmed SF, Quadeer AA, McKay MR. SARS-CoV-2 T cell responses elicited by COVID-19 vaccines or infection are expected to remain robust against Omicron. *Viruses*. 2022;14(1):79. <https://doi.org/10.3390/v14010079>
22. Tian J, Shang B, Zhong H, et al. T cell immune evasion by SARS-CoV-2 JN.1 escapees targeting two cytotoxic T cell epitope hotspots. *Nat Immunol*. 2025;26(2):265–78. <https://doi.org/10.1038/s41590-024-02051-0>
23. Stanevich OV, Alekseeva EI, Sergeeva M, et al. SARS-CoV-2 escape from cytotoxic T cells during long-term COVID-19. *Nat Commun*. 2023;14(1):149. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34033-x>
24. Channappanavar R, Fett C, Zhao J, et al. Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Virol*. 2014;88(19):11034–44. <https://doi.org/10.1128/jvi.01505-14>
25. Zhao J, Alshukairi AN, Baharoon SA, et al. Recovery from the Middle East respiratory syndrome is associated with antibody and T-cell responses. *Sci Immunol*. 2017;2(14):eaan5393. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan5393>
26. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*. 2022;23(2):186–93. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01122-w>
27. Keeton R, Tincho M.B., Ngomti A, et al. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron. *Nature*. 2022;603(7901):488–92. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04460-3>
Erratum in: *Nature*. 2022;604(7907):E25. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04708-y>
28. Bazhan SI, Antonets DV, Starostina EV, et al. In silico design of influenza A virus artificial epitope-based T-cell antigens and the evaluation of their immunogenicity in mice. *J Biomol Struct Dyn*. 2022;40(7):3196–212. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1845978>
29. Bazhan SI, Antonets DV, Karpenko LI, et al. In silico designed Ebola virus T-cell multi-epitope DNA vaccine constructions are immunogenic in mice. *Vaccines (Basel)*. 2019;7(2):34. <https://doi.org/10.3390/vaccines7020034>
30. Reguzova A, Antonets D, Karpenko L, et al. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens. *PLoS One*. 2015;10(3):e0116412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116412>
31. Reguzova A, Müller M, Pagallies F, et al. A multiantigenic Orf virus-based vaccine efficiently protects hamsters and nonhuman primates against SARS-CoV-2. *NPJ Vaccines*. 2024;9(1):191. <https://doi.org/10.1038/s41541-024-00981-2>
32. Alhashimi M, Sayedahmed EE, Elakashif A, et al. A multi-antigen-based SARS-CoV-2 vaccine provides higher immune responses and protection against SARS-CoV-2 variants. *NPJ Vaccines*. 2025;10(1):159. <https://doi.org/10.1038/s41541-025-01198-7>
33. Borgoyakova MB, Karpenko LI, Rudometov AP, et al. Immunogenic properties of the DNA construct encoding the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein. *Mol Biol*. 2021;55(6):889–98. <https://doi.org/10.1134/s0026893321050046>
34. Borgoyakova MB, Karpenko LI, Rudometov AP, et al. Artificial COVID-19 T-Cell immunogen. *Bull Exp Biol Med*. 2023;175(6):804–9. <https://doi.org/10.1007/s10517-023-05951-7>
35. Yakovlev VA, Litvinova VR, Rudometova NB, et al. Immunogenic and protective properties of mRNA vaccine encoding hemagglutinin of Avian influenza A/H5N8 virus, delivered by lipid nanoparticles and needle-free jet injection. *Vaccines (Basel)*. 2025;13(8):883. <https://doi.org/10.3390/vaccines13080883>
36. Kisakov DN, Karpenko LI, Kisakova LA, et al. Jet injection of naked mRNA encoding the RBD of the SARS-CoV-2 spike protein induces a high level of a specific immune response in mice. *Vaccines (Basel)*. 2025;13(1):65. <https://doi.org/10.3390/vaccines13010065>
37. Borgoyakova MB, Karpenko LI, Rudometov AP, et al. Self-assembled particles combining SARS-CoV-2 RBD protein and RBD DNA vaccine induce synergistic enhancement of the humoral response in mice. *Int J Mol Sci*. 2022;23(4):2188. <https://doi.org/10.3390/ijms23042188>
38. Andersson HA, Barry MA. Maximizing antigen targeting to the proteasome for gene-based vaccines. *Mol Ther*. 2004; 10(3):432–46. <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2004.05.035>
39. Vega Rojas LJ, Ruiz-Manzano RA, Velasco-Elizondo MA, et al. An evaluation of the cellular and humoral response of a multi-epitope vaccine candidate against COVID-19 with different alum adjuvants. *Pathogens*. 2024;13(12):1081. <https://doi.org/10.3390/pathogens13121081>
40. Di Y, Zhang C, Ren Z, et al. The self-assembled nanoparticle-based multi-epitope influenza mRNA vaccine elicits protective immunity against H1N1 and B influenza viruses in mice. *Front Immunol*. 2024;15:1483720. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1483720>
41. Prakash S, Dhanushkodi NR, Zayou L, et al. Cross-protection induced by highly conserved human B, CD4+, and CD8+ T-cell epitopes-based vaccine against severe infection, disease, and death caused by multiple SARS-CoV-2 variants of concern. *Front Immunol*. 2024;15:1328905. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1328905>
42. Chanda C, Kibengo F, Mutua M, et al. Safety and broad immunogenicity of HIVconserved mosaic candidate T-cell vaccines vectored by ChAdOx1 and MVA in HIV-CORE 006: A double-blind, randomised, placebo-controlled phase 1 trial in healthy adults living without HIV-1 in Eastern and Southern Africa. *Lancet Microbe*. 2025;6(6):101041. <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.101041>
43. Ibragimova AA, Fedorov AA, Kirilenko KM, et al. mRNA-based personalized cancer vaccines: Opportunities, challenges and outcomes. *Acta Naturae*. 2025;17(4):17–37. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27707>
44. Borgoyakova MB, Rudometov AP, Starostina EV, et al. Immunogenicity of DNA vaccines against COVID-19 that encode B- and T-Cell immunogens after combined injection. *Bull Exp Biol Med*. 2025;179(2):217–22. <https://doi.org/10.1007/s10517-025-06461-4>
45. Боргоякова МБ, Рудометов АП, Старостина ЕВ. Комбинированная ДНК-белковая вакцина, содержащая полиэпитопный Т-клеточный иммуноген и рецептор-связывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2025;102(5):571–82. Borgoyakova MB, Rudometov AP, Starostina EV, et al. DNA-protein COVID-19 combination vaccine containing multi-epitope T-cell immunogen and receptor binding domain of the SARS-CoV-2 S protein. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2025;102(5):571–82 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-691>
46. Hassett KJ, Higgins J, Woods A, et al. Impact of lipid nanoparticle size on mRNA vaccine immunogenicity. *J Control Release*. 2021;335:237–46. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.021>
47. Rocas CB, Lou G, Jain N, et al. Manufacturing considerations for the development of lipid nanoparticles using microfluidics. *Pharmaceutics*. 2020;12(11):1095. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111095>
48. Tamming L, Lansdell C, Zhang W, et al. Durability of DNA-LNP

- and mRNA-LNP vaccine-induced immunity against SARS-CoV-2 XBB.1.5. *NPJ Vaccines*. 2026;11:115. <https://doi.org/10.1038/s41541-026-01382-3>
49. Andrade VM, Maricic I, Kalia R, et al. Delineation of DNA and mRNA COVID-19 vaccine-induced immune responses in preclinical animal models. *Hum Vaccin Immunother*. 2023;19(3):2281733. <https://doi.org/10.1080/21645515.2023.2281733>
50. Igyártó BZ, Qin Z. The mRNA-LNP vaccines – The good, the bad and the ugly? *Front Immunol*. 2024;15:1336906. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1336906>
51. Ndeupen S, Qin Z, Jacobsen S, et al. The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience*. 2021;24(12):103479. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103479>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены Приложения 1 (таблица S1) и 2 (рисунки S1–S6, таблица S2).

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-287-298-annex1>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-287-298-annex2>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.Б. Боргоякова** – концепция работы, дизайн иммуногенов, ИФА, Т-клеточные реакции, анализ результатов исследований, статистическая обработка данных, написание текста рукописи, формулировка выводов; **Л.И. Карпенко, А.А. Ильичёв, А.П. Рудомётов** – концепция работы, редактирование текста рукописи, утверждение окончательной версии статьи для публикации; **С.В. Шарабрин** – синтез мРНК; **Е.В. Старостина** – постановка ELISpot; **В.А. Яковлев** – получение мРНК-липидных комплексов, иммунизация; **Е.В. Яковлева** – иммунизация, анализ внутриклеточного окрашивания; **Д.И. Вахитов, Л.А. Кисакова, К.П. Макарова** – иммунизация, подготовка образцов; **А.В. Зайковская** – анализ вирус-нейтрализации; **Д.Н. Кисаков** – получение мРНК-липидных комплексов; **Е.В. Дмитриенко** – оценка размеров липидных наночастиц.

Соответствие принципам этики. Исследование проводилось в соответствии с национальными и международными нормативными требованиями. Протокол исследования утвержден Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 4 от 11.04.2025).

Использование генеративного искусственного интеллекта. Авторы заявляют, что при подготовке рукописи использовали генеративный ИИ (DeepSeek V3 исключительно для языкового редактирования рукописи, не влиявшего на научное содержание) в строгом соответствии с положениями политики журнала в отношении ИИ.

Supplementary information. Supplementary materials 1 (Table S1) and 2 (Figures S1–S6, Table S2) are available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-287-298-annex1>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-287-298-annex2>

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **M.B. Borgoyakova** conceptualized the study, designed the immunogens, performed ELISA, assessed T-cell responses, analyzed the results, performed statistical analysis, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **L.I. Karpenko, A.A. Ilyichev, A.P. Rudometov** conceptualized the study, edited the manuscript, and approved the final version for publication. **S.V. Sharabrin** performed mRNA synthesis. **E.V. Starostina** performed the ELISpot assay. **V.A. Yakovlev** prepared the mRNA-LNP complexes and performed immunizations. **E.V. Yakovleva** performed immunizations and intracellular cytokine staining analysis. **D.I. Vahitov, L.A. Kisakova, K.P. Makarova** performed immunizations and prepared samples. **A.V. Zaykovskaya** performed the virus neutralization assay. **D.N. Kisakov** prepared the mRNA-LNP complexes. **E.V. Dmitrienko** assessed the LNP size.

Ethics approval. The study was conducted in accordance with national and international regulatory requirements. The study protocol was approved by the Bioethics Committee of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” (Protocol No. 4 dated April 11, 2025).

Use of generative artificial intelligence. The authors declare that they used generative AI (DeepSeek V3) solely for language editing of the manuscript, which did not affect the scientific content, in strict compliance with the journal policy on AI.

Об авторах / Authors

Боргоякова Мария Борисовна, канд. биол. наук / Mariya B. Borgoyakova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0768-1561>

Рудомётов Андрей Павлович, канд. биол. наук / Andrey P. Rudometov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2808-4309>

Шарабрин Сергей Валерьевич, канд. биол. наук / Sergei V. Sharabrin, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0664-3587>

Старостина Екатерина Владимировна, канд. биол. наук / Ekaterina V. Starostina, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1733-9524>

Яковлев Владимир Андреевич / Vladimir A. Yakovlev

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-4563-2099>

Яковлева Елена Витальевна / Elena V. Yakovleva

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-5203-2130>

Вахитов Данил Игоревич / Danil I. Vahitov

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-0706-8119>

Зайковская Анна Владимировна, канд. биол. наук / Anna V. Zaykovskaya, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>

Кисакова Любовь Александровна / Lyubov A. Kisakova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7214-1855>

Кисаков Денис Николаевич / Denis N. Kisakov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4889-6865>

Макарова Кристина Петровна / Kristina P. Makarova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-2309-0137>

Дмитриенко Елена Владимировна, канд. хим. наук / Elena V. Dmitrienko, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2295-6455>

Карпенко Лариса Ивановна, д-р биол. наук, доц. / Larisa I. Karpenko, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4365-8809>

Ильичёв Александр Алексеевич, д-р биол. наук, проф. / Alexander A. Ilyichev, Dr. Sci. (Biol.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5356-0843>

Поступила 19.04.2026

После доработки 05.08.2026

Принята к публикации 25.09.2026

Received April 19, 2026

Revised August 5, 2026

Accepted September 25, 2026