

УДК: 615.371

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-299-310>

Оригинальная статья | Original article



Структурная и функциональная стабильность лиофилизированной неинкапсулированной мРНК, синтезированной *in vitro*, при длительном хранении

С.В. Шарабрин¹, С.И. Красникова¹, Д.Н. Кисаков¹,
Л.А. Кисакова¹, Е.В. Старостина¹, М.Б. Боргоякова¹,
В.Р. Литвинова¹, В.А. Яковлев¹, Е.В. Яковлева¹, К.И. Иванова¹,
А.А. Бондарь², К.П. Макарова¹, Д.И. Вахитов¹, Е.А. Волосникова¹,
А.П. Рудомётов¹, А.А. Ильичёв¹, Л.И. Карпенко¹

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

✉ Шарабрин Сергей Валерьевич; sharabrin.sv@gmail.com, sharabrin_sv@vector.nsc.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Низкая физико-химическая стабильность мРНК и зависимость современных мРНК-вакцин от успешности инкапсуляции в липидные наночастицы и соблюдения обязательных условий холодовой цепи ограничивают их хранение и транспортировку. Перспективным подходом является лиофилизация неинкапсулированной мРНК с последующей доставкой методом струйной инъекции. Однако сохранение ее структуры и функциональной активности при длительном хранении изучено недостаточно.

ЦЕЛЬ. Оценка структурной и функциональной стабильности лиофилизированной неинкапсулированной мРНК при длительном хранении и ее иммуногенности в составе трехвалентной мРНК-вакцины против сезонного гриппа, вводимой мышам методом струйной инъекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. мРНК-GFP (мРНК, кодирующую зеленый флуоресцентный белок (GFP)) лиофилизировали с различными криопротекторами и хранили при -20, 4 и 20 °С. Функциональную активность определяли после трансфекции клеток HEK293 по экспрессии GFP, целостность мРНК – методом микроципового электрофореза. Иммуногенность лиофилизированной и нелиофилизированной вакцины «мРНК-Вектор-Флю» оценивали на самках инбредных мышей BALB/c после двукратной струйной иммунизации методами ИФА (иммуноферментный анализ), РТГА (реакция торможения гемагглютинации), вируснейтрализации и IFN-γ ELISpot (метод иммуноферментных пятен для выявления клеток, секретирующих интерферон-γ).

РЕЗУЛЬТАТЫ. По результатам предварительного скрининга для дальнейших исследований была выбрана композиция с 10% трегалозы, обеспечивавшая сохранение функциональной активности мРНК-GFP на уровне, наиболее близком к контрольному препарату. Леофилизированная мРНК-GFP сохраняла функциональную активность после 12 мес. хранения

при всех исследованных температурах; статистически значимых различий с мРНК, синтезированной непосредственно перед применением, не выявлено ($p > 0,05$). Основная фракция мРНК сохранялась, хотя после 6–12 мес., особенно при 20 °С, выявлялись минорные фракции частично деградированной мРНК. После 3 мес. хранения вакцины при 4 °С средние геометрические титры антител к гемагглютиниnam вирусом гриппа H1, H3 и H5 составили 1:382 000, 1:628 000 и 1:273 000 против 1:710 000, 1:628 000 и 1:328 000 в группе нелиофилизированной вакцины. Титры в РТГА составляли 1:37–1:80, вируснейтрализующих антител — 1:50–1:90; число IFN- γ -секретирующих клеток — 440 и 500 SFC (пятнообразующих клеток) на 1×10^6 спленоцитов. Значимых межгрупповых различий не выявлено.

ВЫВОДЫ. Лيوфилизация с 10% трегалозы обеспечивала сохранение функциональной активности неинкапсулированной мРНК в течение 12 мес., несмотря на признаки частичной деградации при 20 °С. После 3 мес. хранения при 4 °С трехвалентная вакцина сохраняла способность индуцировать гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ у мышей. Полученные данные подтверждают перспективность сочетания лиофилизации и струйной инъекции для разработки стабильных мРНК-вакцин.

Ключевые слова: мРНК-вакцины; лиофилизация; вирус гриппа человека; струйная инъекция; иммуногенность; ИФА; вируснейтрализация; трегалоза; мыши; липидные наночастицы; микроциповой электрофорез

Для цитирования: Шарабрин С.В., Красникова С.И., Кисаков Д.Н., Кисакова Л.А., Старостина Е.В., Боргоякова М.Б., Литвинова В.Р., Яковлев В.А., Яковлева Е.В., Иванова К.И., Бондарь А.А., Макарова К.П., Вахитов Д.И., Волосникова Е.А., Рудомётов А.П., Ильичёв А.А., Карпенко Л.И. Структурная и функциональная стабильность лиофилизированной неинкапсулированной мРНК, синтезированной *in vitro*, при длительном хранении. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(3):299–310. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-299-310>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН «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.

Structural and functional stability of lyophilized nonencapsulated mRNA synthesized *in vitro* during long-term storage

Sergei V. Sharabrin¹, Svetlana I. Krasnikova¹, Denis N. Kisakov¹, Lyubov A. Kisakova¹, Ekaterina V. Starostina¹, Mariya B. Borgoyakova¹, Victoria R. Litvinova¹, Vladimir A. Yakovlev¹, Elena V. Yakovleva¹, Ksenia I. Ivanova¹, Alexander A. Bondar², Kristina P. Makarova¹, Danil I. Vahitov¹, Ekaterina A. Volosnikova¹, Andrey P. Rudometov¹, Alexander A. Ilyichev¹, Larisa I. Karpenko¹

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

✉ Sergei V. Sharabrin; sharabrin.sv@gmail.com, sharabrin_sv@vector.nsc.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The low physicochemical stability of mRNA and the dependence of current mRNA vaccines on the successful encapsulation into lipid nanoparticles and adherence to mandatory cold chain requirements limit their storage and transportation. A promising approach is the lyophilization of nonencapsulated mRNA with its subsequent delivery by jet injection.

However, the preservation of its structure and functional activity during long-term storage has been insufficiently studied.

AIM. To evaluate the structural and functional stability of lyophilized nonencapsulated mRNA during long-term storage and its immunogenicity as a component of a trivalent mRNA vaccine against seasonal influenza administered to mice by jet injection.

MATERIALS AND METHODS. mRNA encoding green fluorescent protein (GFP) was lyophilized with various cryoprotectants and stored at -20 , 4 , and 20 °C. Its functional activity was determined by GFP expression after transfection of HEK293 cells, and its integrity was analyzed by microchip electrophoresis. The immunogenicity of the lyophilized and nonlyophilized mRNA-Vector-Flu vaccine was evaluated in female inbred BALB/c mice after two jet immunizations by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), hemagglutination inhibition (HAI) assay, virus neutralization assay, and interferon gamma (IFN- γ) enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay.

RESULTS. Based on the results of a preliminary screening, a 10% trehalose formulation was selected for further studies because it preserved the functional activity of GFP mRNA at the level closest to that of the control preparation. The lyophilized GFP mRNA retained its functional activity after 12 months of storage at all tested temperatures; no statistically significant differences were found compared with the mRNA synthesized immediately before use ($p>0.05$). The major mRNA fraction was preserved, although minor fractions of partially degraded mRNA were detected after 6–12 months, particularly at 20 °C. After 3 months of storage of the vaccine at 4 °C, the geometric mean antibody titers against hemagglutinin subtype 1 (H1), hemagglutinin subtype 3 (H3), and influenza B hemagglutinin (HB) were 1:382,000, 1:628,000, and 1:273,000, respectively, compared with 1:710,000, 1:628,000, and 1:328,000 in the nonlyophilized vaccine group. HAI titers were 1:37–1:80, virus-neutralizing antibody titers were 1:50–1:90; and the numbers of IFN- γ -secreting cells were 440 and 500 spot-forming cells (SFC) per 1×10^6 splenocytes. No significant between-group differences were identified.

CONCLUSIONS. Lyophilization with 10% trehalose preserved the functional activity of nonencapsulated mRNA for 12 months despite signs of partial degradation at 20 °C. After 3 months of storage at 4 °C, the trivalent vaccine retained its ability to induce humoral and T-cell immune responses in mice. These findings support the potential of combining lyophilization and jet injection for the development of stable mRNA vaccines.

Keywords: mRNA vaccines; lyophilization; human influenza virus; jet injection; immunogenicity; ELISA; virus neutralization; trehalose; mice; lipid nanoparticles; microchip electrophoresis

For citation: Sharabrin S.V., Krasnikova S.I., Kisakov D.N., Kisakova L.A., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Litvinova V.R., Yakovlev V.A., Yakovleva E.V., Ivanova K.I., Bondar A.A., Makarova K.P., Vahitov D.I., Volosnikova E.A., Rudometov A.P., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. Structural and functional stability of lyophilized nonencapsulated mRNA synthesized *in vitro* during long-term storage. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(3):299–310. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-299-310>

Funding. The study was conducted under the state assignment of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”.
Disclosure. The authors declare no conflicts of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Матричная РНК (мРНК) является перспективной платформой для быстрой разработки вакцинных препаратов и получения конструкций, кодирующих антигены различных патогенов, включая сезонные и потенциально пандемические варианты вируса гриппа [1, 2]. Вместе с тем практическое применение мРНК-препаратов ограничивается физико-химической нестабильностью РНК, ее чувствительностью к гидролизу рибонуклеазами и необходимостью соблюдения строгих условий хранения и транспортировки, что осложняет широкое применение, создание резервов и логистику [3].

В настоящее время большинство мРНК-вакцинных платформ основано на использовании липидных наночастиц, которые обеспечивают защиту мРНК и ее доставку в иммунокомпетентные клетки. Однако системы доставки, основанные на липидных наночастицах, имеют ряд технологических ограничений, таких как сложность состава, чувствительность к условиям замораживания и размораживания, необходимость контроля размера частиц, полидисперсности и стабильности липидных компонентов [4–7]. В связи с этим сохраняется интерес к альтернативным подходам, позволяющим упростить состав мРНК-препарата и одновременно повысить его стабильность при хранении.

За последние три года была продемонстрирована эффективность применения струйной инъекции для введения мРНК-вакцин [8–12], при котором препараты вводятся с помощью инжектора высокоскоростной струи через небольшое сопло под высоким давлением. В данном случае используется неинкапсулированная молекула мРНК, не упакованная в липидные наночастицы или другие носители. Известно, что молекулы мРНК представляют собой высоколабильные макромолекулы, вследствие чего создание препаратов на их основе требует разработки эффективных подходов к их хранению. Особый интерес представляет лиофилизация, позволяющая перевести препарат мРНК в сухую форму. Применение лиофилизации приводит к снижению деградации мРНК, упрощает состав препарата, повышает устойчивость мРНК к температурным колебаниям и, как следствие, может потенциально повысить безопасность и снизить стоимость конечного продукта [13–16].

Сезонный грипп остается одной из наиболее значимых респираторных инфекций, требующих регулярного обновления вакцинных штаммов и быстрой адаптации состава вакцин к изменяющейся эпидемиологической ситуации. мРНК-платформа позволяет в короткие сроки создавать вакцинные конструкции, кодирующие актуальные варианты гемагглютинаина. Ранее нами была разработана экспериментальная трехвалентная мРНК-вакцина «мРНК-Вектор-Флю», содержащая мРНК, кодирующие гемагглютинины вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, A(H3N2) и гриппа В, и продемонстрирована ее иммуногенность при введении методом струйной инъекции [17]. Следующим этапом разработки является оценка стабильности такой вакцины при хранении, в том числе возможности сохранения функциональной активности мРНК после лиофилизации, а затем проведение доклинических исследований.

Цель работы – оценка структурной и функциональной стабильности лиофилизированной неинкапсулированной мРНК при длительном хранении и ее иммуногенность в составе трехвалентной мРНК-вакцины против сезонного гриппа, вводимой мышам методом струйной инъекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Культуры клеток и плазмиды. В качестве матриц для синтеза мРНК использовали плазмиды pVAX-C3-H1-24, pVAX-C3-H3-24 и pVAX-C3-HB-24, кодирующие антигены штаммов вирусов сезонного гриппа A/Wisconsin/67/2022(H1N1)pdm09,

A/Darwin/9/2021(H3N2) и B/Austria/1359417/2021 соответственно, а также pVAX-C3-GFP, кодирующую ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). Все плазмиды были получены ранее в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора [17]. Для анализа функциональности мРНК *in vitro* была использована перевиваемая клеточная линия почки эмбриона человека HEK293 (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). В реакции вирусной нейтрализации использовали штаммы вирусов сезонного гриппа A/Buryatia/106-6V/2022 (H1N1), A/Darwin/9/2021 (H3N2) и B/Austria/1359417/2021 (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). В исследованиях использовали культуру клеток MDCK-SIAT1 (Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, р.п. Кольцово).

Методы

Синтез мРНК *in vitro* проводили с использованием линеаризованных матриц pVAX-C3-H1-24, pVAX-C3-H3-24, pVAX-C3-HB-24 и pVAX-C3-GFP и коммерческого набора T7 High Yield RNA Synthesis Kit (Yeasen, KHP). Реакционная смесь содержала 1 мкг линеаризованной плазмидной ДНК, полимеразу T7 с буфером, аналог AG-Cap (аналог кэпа m⁷GmAmG (Biolabmix, Россия) (10 мМ), смесь рибонуклеотидтрифосфатов (10 мМ) с заменой уридина на N1-метилпсевдоуридин (Biolabmix), ингибитор РНКазы (БелБиоЛаб, Россия) и воду, свободную от нуклеаз. Протокол синтеза был описан нами ранее [11]. Полученные мРНК были названы мРНК-H1, мРНК-H3, мРНК-HB (кодируют гемагглютинин вирусов гриппа H1N1, H3N2 и гриппа В соответственно) и мРНК-GFP. мРНК-H1, мРНК-H3 и мРНК-HB смешивали в эквимольных соотношениях и получали трехвалентную мРНК-вакцину против гриппа, условно обозначенную как «мРНК-Вектор-Флю».

Чистоту, однородность и молекулярный размер синтетических мРНК оценивали с использованием прибора Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, США). Анализ проводили методом микроципового электрофореза с применением набора Agilent RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies) в соответствии с инструкциями производителя.

Лиофилизацию растворов мРНК проводили в лиофильной сушильной камере ED-DF21A-K (ERSTVAK Ltd., KHP) в автоматическом режиме с функцией пневматической укупорки. Для лиофилизации использовали три технологические композиции криопротекторов: на основе сахарозы (№ 1); на основе маннозы (№ 2); на основе трегалозы (№ 3). Для лиофилизации использовали 10% (масса/объем) водные растворы

криопротекторов. Другие вспомогательные компоненты в состав композиций не входили. Перед лиофилизацией водный раствор очищенной мРНК доводили до 500 мкл раствором одного из криопротекторов до конечной концентрации криопротектора 10% (масса/объем). Стерильный препарат мРНК с одним из трех криопротекторов дозировали по 0,5 мл во флаконы инсулиновые 2R объемом 3 мл (SCHOTT Forma Vitrum, Венгрия). В случае мРНК-GFP количество мРНК составляло 100 мкг на флакон, мРНК-Вектор-Флю – во флаконе смешивали по 150 мкг мРНК-Н1, мРНК-Н3, мРНК-НВ (суммарно 450 мкг мРНК). Затем проводили лиофилизацию в течение 24 ч. Процесс лиофилизации включал заморозку до температуры минус 50 °С в течение 10,5 ч (давление 10–13 Па), затем постепенное повышение температуры до 15 °С со скоростью 10 °С в час, после чего проводили сублимацию в течение 7 ч при температуре 25±2 °С и давлении 1,2 Па. По окончании сушки флаконы закрывали пробками опусканием прижимной полки и фиксировали пробки алюминиевыми колпачками. Лиофилизированная масса представляла собой белую таблетку. Высушенную мРНК хранили при температурах минус 20, 4 и 20 °С.

Трансфекция клеток HEK293 мРНК. Клетки HEK293 выращивали в 24-луночных культуральных планшетах (Corning, США) с питательной средой DMEM (Sigma-Aldrich, США), содержащей 10% FBS (HyClone, США) и 50 мкг/мл гентамицина (более подробно методика описана в Приложении 1, размещено на сайте журнала¹). Уровень флуоресценции белка GFP оценивали с помощью микроскопа Olympus CKX53 (Olympus, Япония) и проточного цитометра ZE5 (Bio-Rad, США). Анализ данных проточной цитометрии проводили по единой стратегии гейтирования для всех образцов (рис. S1, Приложение 1 размещено на сайте журнала²).

Иммунизация мышей BALB/c. Работа с животными проводилась в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных³. Мыши были получены из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Новосибирская область, р.п. Кольцово) и содержались в условиях 12-часового светового дня со свободным доступом к пище и воде. Исследование проводили на инбредных мышцах-самках BALB/c с исходным весом 16–18 г. Препараты мРНК-Н1, мРНК-Н3, мРНК-НВ и мРНК-Вектор-Флю, растворенные в 50 мкл

физиологического раствора, вводили в левую заднюю лапу методом струйной инъекции [11]. Иммунизацию проводили методом безыгольной струйной инъекции с использованием инжектора Comfort-In (MIKA Medical, Корея). Перед введением препарат восстанавливали в стерильном физиологическом растворе, перемешивали до полного растворения лиофилизата и набирали в одноразовый картридж-насадку инжектора. Иммунизацию проводили при следующих параметрах: скорость инъекции 220 м/с, давление 6,5 бар, длительность инъекции 0,33 с.

Для оценки иммуногенности использовали два варианта трехвалентной мРНК-вакцины «мРНК-Вектор-Флю»: лиофилизированный вариант, полученный в присутствии 10% трегалозы и хранившийся в течение 3 мес. при 4 °С, и нелиофилизированный вариант того же состава, синтезированный непосредственно перед введением. Далее по тексту используются обозначения «лиофилизированная вакцина» и «нелиофилизированная вакцина» соответственно.

Животных разделили на 3 группы по 8 особей в каждой. Размер групп выбран по результатам предшествующих исследований на мышах BALB/c, аналогичных мРНК-вакцинных конструкций и сопоставимой схемы иммунизации. Иммунизацию проводили в День 0 и 21: животным группы 1 вводили лиофилизированную вакцину; животным группы 2 – нелиофилизированную вакцину, животным контрольной группы 3 – 50 мкл физиологического раствора. Каждая доза вакцины содержала по 15 мкг мРНК-Н1, мРНК-Н3 и мРНК-НВ, суммарно 45 мкг мРНК. Перед введением лиофилизированную вакцину восстанавливали в 500 мкл стерильного физиологического раствора. Все препараты вводили методом струйной инъекции. На 35-й день для оценки гуморального ответа забирали кровь из ретроорбитальной пазухи глаза. Для анализа Т-клеточного ответа животных гуманно умерщвляли методом цервикальной дислокации, после чего извлекали селезенку.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Специфические IgG-антитела в сыворотках крови мышей определяли методом непрямого иммуноферментного анализа (более подробно методика описана в Приложении 1).

Оценка клеточного иммунного ответа методом ELISpot. Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли с помощью метода иммуноферментных пятен для выявления клеток, секретирующих

¹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-299-310-annex>

² Там же.

³ <https://docs.cntd.ru/document/1200157968>

интерферон- γ (IFN- γ ELISpot) по числу спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию пептидами белков вируса гриппа (более подробно методика описана в Приложении 1).

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) проводили в соответствии с протоколом РТГА, основанным на рекомендациях ВОЗ и Минздрава России⁴. Перед постановкой РТГА полученные образцы сыворотки крови мышей обрабатывали ферментом RDE II (Denka Seiken Co., Япония, кат. № 370013) в течение 18–20 ч согласно инструкции производителя для удаления неспецифических термостабильных ингибиторов. Затем образцы сывороток прогревали на водяной бане при 56 °С для удаления неспецифических термолабильных ингибиторов и инактивации ферментативной активности RDE. Конечное разведение сыворотки 1:10 получали добавлением фосфатно-солевого буфера (рН 7,2). Сыворотки исследовали в РТГА против 4 гемагглютинирующих единиц антигена, соответствующего серотипу вируса. Для определения титра РТГА использовали 0,5% эритроциты индейки и U-образные планшеты (Nest, Китай, кат. № 701111). Титр антител в РТГА определяли как величину, обратную максимальному разведению сыворотки, при котором наблюдалось полное торможение гемагглютинации. Минимальное исследованное разведение сыворотки составляло 1:10, поэтому нижний предел определения титра был равен 10. Образцам, в которых торможение гемагглютинации отсутствовало при разведении 1:10, при расчете средних геометрических титров условно присваивали значение 5, соответствующее половине нижнего предела определения метода. В качестве антигенов использовали инактивированные β -пропиолактоном вирусы гриппа A/Buryatia/106-6V/2022 (H1N1), A/Darwin/9/2021 (H3N2) и B/Austria/1359417/2021.

Анализ микронейтрализации *in vitro* проводили с вирусами гриппа A/Buryatia/106-6V/2022 (H1N1), A/Darwin/9/2021 (H3N2) и B/Austria/1359417/2021 по методике, описанной ранее в работе [18], с отличием, которое заключалось в способе визуализации конечного результата: через 2 сут после инфицирования клетки окрашивали раствором кристаллического фиолетового красителя (Sigma-Aldrich, США; кат. № C0775) — 1,3 г красителя растворяли в 50 мл 96% этанола, доводили объем до 700 мл дистиллированной водой и добавляли 300 мл 40% формалина. Результаты анализировали с использованием системы Agilent BioTek Cytation 5

(Thermo Fisher Scientific). Титр нейтрализации определяли как наибольшее разведение сыворотки, при котором достигалась нейтрализация вируса $\geq 50\%$, что соответствовало сохранению жизнеспособности $\geq 50\%$ клеток.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 10.0 (GraphPad Software, США). Количественные данные представляли в виде медианы и диапазона значений от минимального до максимального, если не указано иное. Для титров антител рассчитывали среднее геометрическое значение титра и указывали диапазон от минимального до максимального значения. Межгрупповые различия оценивали с помощью критерия Краскела–Уоллиса с последующим *post hoc* тестом Данна для множественных сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нами были разработаны три криопротектора для лиофилизации мРНК: первый криопротектор — на основе сахарозы, второй — на основе маннозы, а третий — на основе трегалозы. Для отработки процедуры лиофилизации использовали мРНК-GFP. Образцы хранили при температуре 4 °С в течение одного месяца. Затем лиофилизированную мРНК растворяли в безнуклеазной воде и использовали для трансфекции клеток НЕК293.

Установлено, что после одного месяца хранения все препараты продемонстрировали высокую эффективность синтеза белка GFP (рис. 1 и рис. S2, Приложение 1). Композиция № 3 на основе трегалозы обеспечивала сохранение функциональной активности мРНК-GFP на уровне, наиболее близком к синтезированной непосредственно перед применением нелиофилизированной мРНК в данной серии экспериментов. С учетом этих данных и данных о способности трегалозы стабилизировать биомолекулы при высушивании такая композиция была выбрана для дальнейшего исследования длительного хранения. Для оценки температурного диапазона условий хранения и длительности хранения были получены лиофилизированные мРНК-GFP, которые хранились в течение 12 мес. при температуре минус 20, 4 и 20 °С. Проверку биологической активности проводили через 1, 3, 6 и 12 мес. Из хранилища брали ампулу с образцом, растворяли в воде и проводили трансфекцию клеток НЕК293. Интенсивность свечения клеток оценивали с помощью проточного цитофлуориметра. Полученные данные представлены на рисунке 2. Уровень флуоресценции клеток

⁴ <https://docs.cntd.ru/document/1200040123>

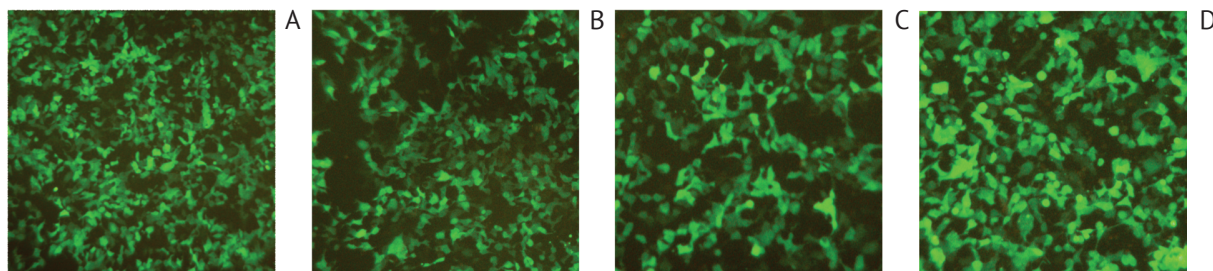


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Анализ стабильности мРНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP), после лиофильной сушки в присутствии различных криопротекторов. Микрофотографии клеток HEK293, трансфицированных образцами мРНК-GFP. А — интактный контроль (нативная нелиофилизированная мРНК-GFP) — доля GFP-положительных клеток составила 80,3%; В — мРНК-GFP, лиофилизированная с криопротектором № 1 (сахароза) — 65,3%; С — мРНК-GFP, лиофилизированная с криопротектором № 2 (манноза) — 70,5%; D — мРНК-GFP, лиофилизированная с криопротектором № 3 (трегалоза) — 78,5%. GFP — зеленый флуоресцентный белок.

Fig. 1. Stability analysis of mRNA encoding green fluorescent protein (GFP) after lyophilization in the presence of various cryoprotectants. Micrographs of HEK293 cells transfected with GFP mRNA samples. A, intact control (native nonlyophilized GFP mRNA): percentage of GFP-positive cells was 80.3%; B, GFP mRNA lyophilized with cryoprotectant No. 1 (sucrose): 65.3%; C, GFP mRNA lyophilized with cryoprotectant No. 2 (mannose): 70.5%; D, GFP mRNA lyophilized with cryoprotectant No. 3 (trehalose): 78.5%. GFP, green fluorescent protein.

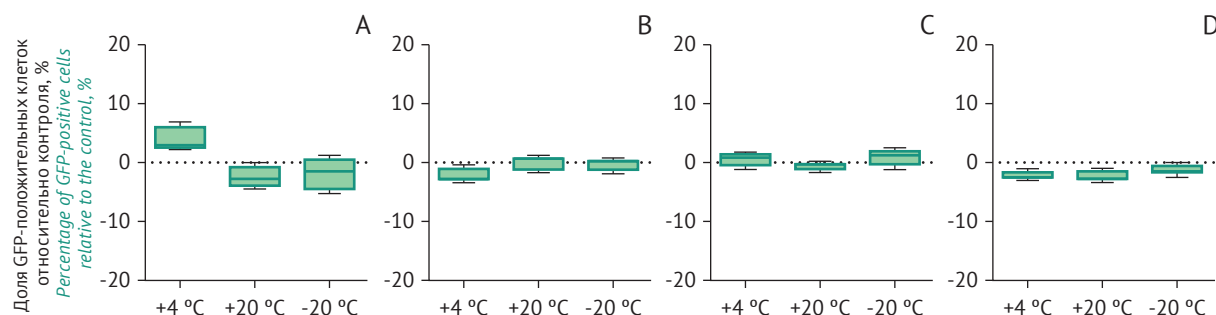


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Оценка эффективности трансляции мРНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP), в клетках HEK293 после хранения в лиофилизированном виде. Динамика сохранности функциональной активности оценивалась через А — 1 мес., В — 3 мес., С — 6 мес. и D — 12 мес. Ось Y — относительное изменение уровня экспрессии целевого белка по сравнению с контрольной, синтезированной непосредственно перед применением нелиофилизированной мРНК-GFP (уровень экспрессии контрольной мРНК-GFP принят за 0). Ось X — температура хранения мРНК-GFP. GFP — зеленый флуоресцентный белок.

Fig. 2. Evaluation of the translation efficiency of mRNA encoding green fluorescent protein (GFP) in HEK293 cells after storage in lyophilized form. The dynamics of functional activity retention were assessed after: A, 1 month; B, 3 months; C, 6 months; D, 12 months. The y-axis represents the relative change in the expression level of the target protein compared with the control nonlyophilized GFP mRNA synthesized immediately before use (the expression level of the control GFP mRNA was set to 0). The x-axis represents the storage temperature of GFP mRNA. GFP, green fluorescent protein.

HEK293, трансфицированных препаратами, хранившимися 1, 3, 6 и 12 мес. при разных температурах, был сравним с контрольной нелиофилизированной мРНК-GFP, синтезированной перед экспериментом. Достоверного различия по уровню флуоресценции между исследованными препаратами не было обнаружено (рис. 2). На рисунке S3 представлены результаты микроскопии и проточной цитофлуориметрии (Приложение 1).

Функциональная активность мРНК-GFP после хранения при комнатной температуре указывает на потенциальную устойчивость лиофилизированной формы к температурным отклонениям, которые могут возникать при транспортировке

или временном хранении препарата. Именно оценка биологической активности мРНК, восстанавливаемой из лиофильно высушенного препарата, имеет первостепенное значение, так как этот параметр определяет эффективность последующего использования терапевтической формы мРНК-вакцины.

Важную роль в поддержании биологической активности мРНК может играть криопротектор. Так, мРНК-GFP, лиофилизированная в присутствии трегалозы, сохраняла высокую трансляционную способность в клетках HEK293 после 12 мес. хранения. В отдельных экспериментальных точках уровень экспрессии GFP после трансфекции восстановленными лиофилизированными

препаратами был сопоставим с показателями синтезированной непосредственно перед применением мРНК-GFP или незначительно превышал их (рис. S3). При этом статистически достоверных различий между группами выявлено не было, поэтому полученные результаты следует интерпретировать в пользу поддержания функциональной активности мРНК после лиофилизации и хранения, а не как повышение ее трансляционной активности. Полученные результаты согласуются с данными о способности трегалозы снижать деградацию РНК в сухом состоянии и способствовать сохранению функциональной активности мРНК-содержащих препаратов после лиофилизации и восстановления [19–21]. Тем не менее обнаруженный эффект следует дополнительно верифицировать в строго контролируемых сравнительных тестах, поскольку на эффективность экспрессии репортерного белка существенно влияют параметры трансфекции, исходное качество матрицы, состав буфера и физиологическое состояние клеточной линии.

Мы также проанализировали лиофилизированную мРНК с помощью микрочипового электрофореза для оценки сохранности мРНК (рис. S4, Приложение 1). В течение 3 мес. хранения целостность мРНК после высушивания практически не изменилась по сравнению с контрольной мРНК, синтезированной непосредственно перед применением. Анализ всех образцов лиофилизированной мРНК-GFP, хранившейся в течение 12 мес., выявил преобладание целевого пика в области ожидаемого размера мРНК. Данные обработки электрофореграмм указывают на низкий уровень фонового сигнала и отсутствие выраженного накопления низкомолекулярных фрагментов, особенно на отсутствие выраженного низкомолекулярного шлейфа, что свидетельствует о сохранении целостности основной фракции мРНК после длительного хранения. Незначительные дополнительные сигналы меньшей интенсивности, которые более выражены в условиях хранения при комнатной температуре, могут отражать минорные фракции укороченных молекул или частично деградированной мРНК. Теоретически такие низкомолекулярные фрагменты мРНК способны вносить вклад в неспецифическую активацию клеточных сенсоров врожденного иммунитета. В настоящей работе прямая оценка активации соответствующих сигнальных путей не проводилась, что является ограничением исследования. Вместе с тем основная фракция мРНК сохранялась, выраженного накопления низкомолекулярного шлейфа не наблюдалось,

а функциональная активность мРНК подтверждалась экспрессией GFP *in vitro*.

Для проверки способности лиофилизированной мРНК сохранять иммуногенные свойства мы выбрали в качестве модели разработанную нами ранее экспериментальную трехвалентную вакцину против гриппа «мРНК-Вектор-Флю» [17]. Сравнивали лиофилизированную вакцину «мРНК-Вектор-Флю» с использованием криопротектора на основе трегалозы, хранившуюся в течение 3 мес. при 4 °С, и нелиофилизированную вакцину того же состава.

По данным ИФА, обе формы вакцины индуцировали выраженный гуморальный иммунный ответ, при этом статистически значимых различий между группами не выявлено. Средние геометрические титры антител к H1 составили 1:382 000 в группе лиофилизированной вакцины и 1:710 000 в группе нелиофилизированной вакцины; к H3 — 1:628 000 в обеих группах; к HВ — 1:273 000 и 1:328 000 соответственно. При использовании в качестве антигена смеси рекомбинантных гемагглютининов H1, H3 и HВ средние геометрические титры антител составили 1:984 000 в группе лиофилизированной и 1:1 310 000 в группе нелиофилизированной вакцины (рис. 3).

Результаты РТГА по оценке ингибирования гемагглютинации сыворотками крови иммунизированных мышей приведены на рисунке 4А. В сыворотках крови мышей, иммунизированных лиофилизированной трехвалентной мРНК-вакциной, средние титры антител, ингибирующих гемагглютинацию, в отношении штаммов A/Darwin/9/2021 (H3N2), A/Buryatia/106-6V/2022 (H1N1) и B/Austria/1359417/2021 составили 1:45, 1:37 и 1:80 соответственно. В группе животных, иммунизированных нелиофилизированной мРНК-вакциной, средние титры составили 1:60, 1:47 и 1:80 соответственно.

Важным критерием эффективности вакцины является ее способность индуцировать антитела, способные нейтрализовать вирус. В сыворотках крови мышей, иммунизированных как лиофилизированной, так и нелиофилизированной мРНК-вакцинами против гриппа, были выявлены вируснейтрализующие антитела к вирусам гриппа A/Buryatia/106-6V/2022 (H1N1), A/Darwin/9/2021 (H3N2) и B/Austria/1359417/2021, определенные в культуре клеток MDCK (рис. 4В). Средние титры вируснейтрализующих антител составили около 1:90 для всех исследованных штаммов, за исключением группы животных, иммунизированных лиофилизированной вакциной, где в отношении вируса A/Buryatia/106-6V/2022 (H1N1) средний титр составил 1:50.

Результаты IFN- γ ELISpot показали, что через 2 нед. после второй иммунизации у мышей, иммунизированных как лиофилизированной, так и нелиофилизированной вакциной, сформировался Т-клеточный ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов гемагглютининов вирусов гриппа (рис. 4С). Среднее количество IFN- γ -секретирующих клеток составило 440 на 1 млн клеток в группе лиофилизированной вакцины и 500 на 1 млн клеток в группе нелиофилизированной вакцины.

Таким образом, лиофилизированная трехвалентная мРНК-вакцина против сезонного гриппа после хранения в течение 3 мес. при температуре 4 °С индуцировала гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ, сопоставимый с ответом на нелиофилизированную вакцину того же состава. При этом отсутствие статистически значимых различий не является доказательством эквивалентности препаратов, поскольку дизайн исследования и размер выборки не позволяют сделать вывод о формальной эквивалентности двух вариантов вакцины.

Принципиальным преимуществом предлагаемой платформы является разделение задач стабилизации и доставки мРНК. В традиционных системах на основе липидных наночастиц они одновременно выполняют функции защиты мРНК от деградации и ее доставки в клетки. В предлагаемом подходе стабилизация достигается за счет перевода неинкапсулированной мРНК в лиофилизированную форму в присутствии криопротектора, тогда как доставка обеспечивается физическим методом – струйной инъекцией. Предлагаемый подход может упростить состав препарата, снизить зависимость стабильности готовой вакцины от сохранности липидных компонентов и обеспечить ее продолжительное хранение.

Полученные данные согласуются с результатами исследований, в которых показана способность лиофилизации и криопротекторов на основе сахаров сохранять стабильность мРНК-содержащих препаратов [13–16, 19–21]. В настоящей работе неинкапсулированная мРНК-GFP сохраняла функциональную активность после 12 мес. хранения при температуре минус 20, 4 и 20 °С, хотя при длительном хранении, особенно при 20 °С, выявлялись признаки частичной деградации. Это свидетельствует о сохранении основной функционально активной фракции мРНК, но не исключает накопления отдельных продуктов деградации.

Полученные результаты подтверждают возможность разделения функций стабилизации и доставки мРНК: стабильность препарата

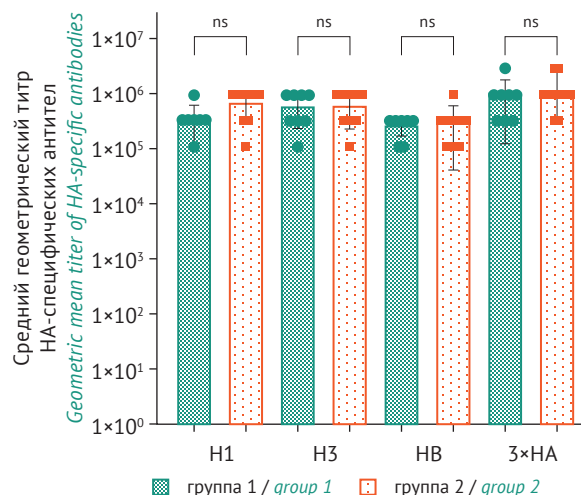


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Оценка гуморального иммунитета у мышей после применения лиофилизированной вакцины «мРНК-Вектор-Флю», хранившейся в течение трех месяцев при температуре 4 °С. Ось X – антигены для иммуноферментного анализа (ИФА): рекомбинантные гемагглюнины подтипа H1, подтипа H3 и вируса гриппа В (HB) и их смесь (3×HA). Столбцы отображают средние геометрические титры, планки погрешностей – диапазон от минимального до максимального значения; точки – индивидуальные значения. Зеленый цвет – группа 1 (лиофилизированная вакцина «мРНК-Вектор-Флю»); оранжевый цвет – группа 2 (нелиофилизированная вакцина «мРНК-Вектор-Флю»). ns – различия статистически незначимы, $p > 0,05$.

Fig. 3. Evaluation of the humoral immune response in mice after administration of the lyophilized mRNA-Vector-Flu vaccine stored for three months at 4 °C. The x-axis represents antigens for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): recombinant hemagglutinin subtype 1 (H1), subtype 3 (H3), and influenza B hemagglutinin (HB), and their mixture (3×HA). Bars represent geometric mean titers; error bars indicate the minimum-to-maximum range; points represent individual values. Green: group 1 (lyophilized mRNA-Vector-Flu vaccine); orange: group 2 (nonlyophilized mRNA-Vector-Flu vaccine). ns, not significant; $p > 0.05$.

обеспечивается лиофилизацией в присутствии криопротектора, тогда как введение неинкапсулированной мРНК осуществляется методом струйной инъекции. Такой подход позволяет потенциально уменьшить зависимость препарата от стабильности липидных компонентов и упростить его состав.

Исследование имеет ряд ограничений. Иммуногенность оценивали только на мышах, длительность хранения вакцинного препарата составляла 3 мес., защитную эффективность после хранения не исследовали, а возможную активацию врожденных иммунных сенсоров продуктами деградации мРНК не определяли. Дальнейшие исследования будут нацелены на оптимизацию состава и цикла лиофилизации, увеличение срока хранения

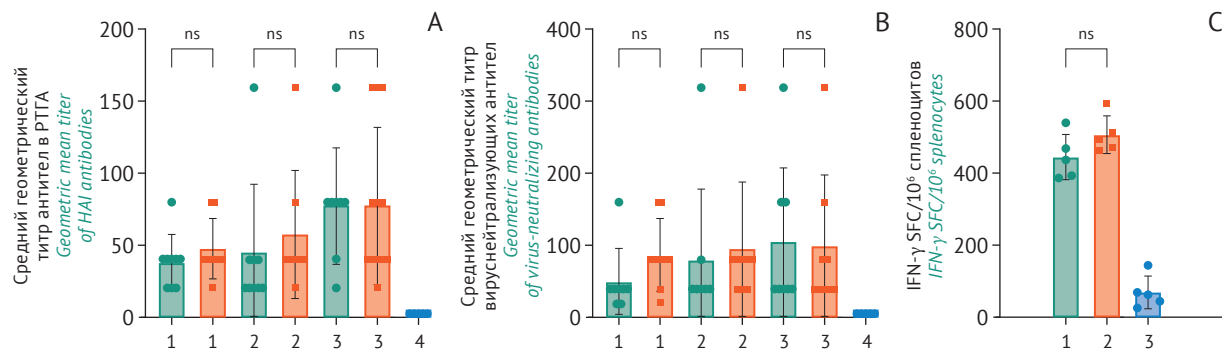


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Показатели иммуногенности лиофилизированной вакцины «мРНК-Вектор-Флю» на мышах. А – результаты реакции торможения гемагглютинации (РТГА) со штаммами вирусов гриппа. В – титры вируснейтрализующих антител к аналогичным штаммам вирусов гриппа. Ось X: 1 – A/Buryatia/106-6V/2022 (H1N1), 2 – A/Darwin/9/2021 (H3N2), 3 – B/Austria/1359417/2021, 4 – отрицательный контроль. На рисунках А и В столбцы отображают средние геометрические титры, планки погрешностей – диапазон от минимального до максимального значения; точки – индивидуальные значения. С – оценка Т-клеточного ответа методом иммуноферментного спот-анализа (ELISpot). Ось X: 1 – группа 1 (лиофилизированная вакцина «мРНК-Вектор-Флю»), 2 – группа 2 (нелиофилизированная вакцина «мРНК-Вектор-Флю»), 3 – группа 3 (отрицательный контроль). Данные представлены как среднее количество интерферон-гамма (IFN-γ)-продуцирующих клеток (пятнообразующих клеток, SFC) на 1×10^6 спленоцитов после стимуляции пулом специфических пептидов. Зеленый цвет – группа 1 (лиофилизированная вакцина «мРНК-Вектор-Флю»); оранжевый цвет – группа 2 (нелиофилизированная вакцина «мРНК-Вектор-Флю»); синий цвет – группа 3 (отрицательный контроль). ns – различия статистически незначимы, $p > 0,05$.

Fig. 4. Immunogenicity parameters of the lyophilized mRNA-Vector-Flu vaccine. A, results of the hemagglutination inhibition (HAI) assay against influenza virus strains. B, virus-neutralizing antibody titers against the corresponding influenza virus strains. The x-axis: 1, A/Buryatia/106-6V/2022 (H1N1); 2, A/Darwin/9/2021 (H3N2); 3, B/Austria/1359417/2021; 4, negative control. In panels A and B, bars represent geometric mean titers, error bars indicate the minimum-to-maximum range, and points represent individual values. C, evaluation of the T-cell response by enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay. The x-axis: 1, group 1 (lyophilized mRNA-Vector-Flu vaccine); 2, group 2 (nonlyophilized mRNA-Vector-Flu vaccine); 3, group 3 (negative control). Data are presented as the mean number of interferon gamma (IFN-γ)-secreting cells (spot-forming cells, SFC) per 1×10^6 splenocytes after stimulation with a pool of specific peptides. Green, group 1 (lyophilized mRNA-Vector-Flu vaccine); orange, group 2 (nonlyophilized mRNA-Vector-Flu vaccine); blue, group 3 (negative control). ns, not significant; $p > 0.05$.

вакцины, проведение исследований с вирусным заражением, а также оценку воспроизводимости и безопасности струйной доставки на более крупных животных моделях.

ВЫВОДЫ

1. Лيوфилизация в присутствии 10% трегалозы обеспечивала сохранение функциональной активности неинкапсулированной мРНК-GFP при хранении в течение 12 мес. при минус 20, 4 и 20 °C, хотя при 20 °C выявлялись незначительные признаки частичной деградации.

2. Трехвалентная лиофилизированная мРНК-вакцина после хранения в течение 3 мес. при 4 °C сохраняла способность индуцировать гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ, статистически не отличавшийся от ответа на нелиофилизированную вакцину.

3. Дальнейшие исследования должны включать количественную характеристику продуктов деградации, увеличение срока хранения вакцинного препарата и оценку его защитной эффективности.

Литература/References

- Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines – A new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261–79. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(11):817–38. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>
- Chheda U, Pradeepan S, Esposito E, et al. Factors affecting stability of RNA – Temperature, length, concentration, pH, and buffering species. *J Pharm Sci.* 2024;113(2):377–85. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.11.023>
- Hou X, Zaks T, Langer R, Dong Y. Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater.* 2021;6(12):1078–94. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>
- Crommelin DJA, Anchordoquy TJ, Volkin DB, et al. Addressing the cold reality of mRNA vaccine stability. *J Pharm Sci.* 2021;110(3):997–1001. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.12.006>
- Oude Blenke E, Ørnskov E, Schöneich C, et al. The storage and in-use stability of mRNA vaccines and therapeutics: Not a cold case. *J Pharm Sci.* 2023;112(2):386–403. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.11.001>
- Packer M, Gyawali D, Yerabolu R, et al. A novel mechanism for the loss of mRNA activity in lipid nanoparticle delivery systems. *Nat Commun.* 2021;12(1):6777. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26926-0>
- Wang C, Tang X, Jiang C, et al. Intradermal delivery of SARS-CoV-2 RBD3-Fc mRNA vaccines via a needle-free injection system induces robust immune responses in rats. *Front Immunol.*

- 2025;16:1530736. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1530736>
9. Abbasi S, Matsui-Masai M, Yasui F, et al. Carrier-free mRNA vaccine induces robust immunity against SARS-CoV-2 in mice and non-human primates without systemic reactogenicity. *Mol Ther*. 2024;32(5):1266–83. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2024.03.022>
 10. 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>
 11. Sharabrin SV, Ilyichev AA, Kisakov DN, et al. Needle-free jet-delivered mRNA-vaccine encoding influenza A(H1N1)pdm09 hemagglutinin protects mice from lethal virus infection. *Mol Biol*. 2025;59(3):376–89. <https://doi.org/10.1134/S0026893325700062>
 12. 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>
 13. Muramatsu H, Lam K, Bajusz C, et al. Lyophilization provides long-term stability for a lipid nanoparticle-formulated, nucleoside-modified mRNA vaccine. *Mol Ther*. 2022;30(5):1941–51. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.02.001>
 14. Suzuki Y, Miyazaki T, Muto H, et al. Design and lyophilization of lipid nanoparticles for mRNA vaccine and its robust immune response in mice and nonhuman primates. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022;30:226–40. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.09.017>
 15. Khan MFH, Baudin F, Sudalaiyadum Perumal A, Kamen AA. Freeze-drying of mRNA-LNPs vaccines: A review. *Vaccines (Basel)*. 2025;13(8):853. <https://doi.org/10.3390/vaccines13080853>
 16. Arte KS, Chen M, Patil CD, et al. Recent advances in drying and development of solid formulations for stable mRNA and siRNA lipid nanoparticles. *J Pharm Sci*. 2025;114(2):805–15. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2024.12.013>
 17. Sharabrin SV, Krasnikova SI, Kisakov DN, et al. A naked lyophilized mRNA vaccine against seasonal influenza, administered by jet injection, provides a robust response in immunized mice. *Vaccines (Basel)*. 2026;14(1):56. <https://doi.org/10.3390/vaccines14010056>
 18. Gross FL, Bai Y, Jefferson S, et al. Measuring influenza neutralizing antibody responses to A(H3N2) viruses in human sera by microneutralization assays using MDCK-SIAT1 cells. *J Vis Exp*. 2017;(129):56448. <https://doi.org/10.3791/56448>
 19. Gonzalez TJ, Boothby TC. Properties governing dry-state stability of RNA in amorphous sugar formulations. *Commun Mater*. 2025;6:129. <https://doi.org/10.1038/s43246-025-00850-y>
 20. Liu XH, Song HP, Tao LL, et al. Trehalose-loaded LNPs enhance mRNA stability and bridge the in vitro–in vivo efficacy gap. *npj Vaccines*. 2025;10:201. <https://doi.org/10.1038/s41541-025-01253-3>
 21. Khan MFH, Sudalaiyadum Perumal A, Kamen AA. Investigation on a freeze-drying process for long-term stability of mRNA-LNPs. *Vaccines (Basel)*. 2026;14(3):242. <https://doi.org/10.3390/vaccines14030242>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещено Приложение 1.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-299-310-annex>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **С.В. Шарабрин, С.И. Красникова, А.А. Ильичёв, Л.И. Карпенко** — концепция работы, написание текста рукописи, формулировка выводов; **Е.В. Старостина, М.Б. Боргоякова, Е.В. Яковлева, К.И. Иванова** — проведение иммунологических исследований; **Л.А. Кисакова, К.П. Макарова** — работа с клеточными культурами; **В.А. Яковлев, Д.И. Вахитов** — получение мРНК; **А.А. Бондарь** — проведение микропипетного электрофореза; **Е.А. Волосникова** — лиофилизация мРНК; **Д.Н. Кисаков, В.Р. Литвинова, А.П. Рудомётов** — участие в формулировке выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено на заседании биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», протокол заседания от 27.02.2026 № 2.

Использование генеративного искусственного интеллекта. Авторы заявляют, что при подготовке рукописи использовали генеративный ИИ в строгом соответствии с положениями политики журнала в отношении ИИ. ChatGPT 5.3 использовался при итоговой проверке текста и перевода его фрагментов на английский язык.

Supplementary information. *Supplementary material 1* is available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-299-310-annex>

Author contributions. All authors confirm that their authorship meets the ICMJE criteria. The major contributions were distributed as follows. **S.V. Sharabrin, S.I. Krasnikova, A.A. Ilyichev, L.I. Karpenko** conceptualized the study, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **E.V. Starostina, M.B. Borgoyakova, E.V. Yakovleva, K.I. Ivanova** performed immunological tests; **L.A. Kisakova, K.P. Makarova** performed cell culture tests; **V.A. Yakovlev, D.I. Vahitov** synthesized mRNA; **A.A. Bondar** performed microchip electrophoresis test; **E.A. Volosnikova** lyophilized mRNA; **D.N. Kisakov, V.R. Litvinova, A.P. Rudometov** participated in formulating the conclusions and approving the final version of the article for publication.

Ethics approval. The study was approved at a meeting of the Bioethics Committee at the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” (minutes No. 2 dated February 27, 2026).

Use of generative artificial intelligence. The authors declare that they used generative AI during the preparation of this manuscript in strict compliance with the journal's policy on AI. They used ChatGPT 5.3 for the final proof-reading of the manuscript and for translating its fragments into English.

Об авторах / Authors

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

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

Красникова Светлана Игоревна / **Svetlana I. Krasnikova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-1538-5195>

Кисаков Денис Николаевич, канд. биол. наук / **Denis N. Kisakov**, Cand. Sci. (Biol.)

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

Кисакова Любовь Александровна / **Lyubov A. Kisakova**

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

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

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

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

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

Литвинова Виктория Руслановна / **Victoria R. Litvinova**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-6524-3222>

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>

Иванова Ксения Ивановна / Ksenia I. Ivanova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-3191-1360>

Бондарь Александр Анатольевич, канд. хим. наук / **Alexander A. Bondar**, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9181-0487>

Макарова Кристина Петровна / Kristina P. Makarova

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

Вахитов Данил Игоревич / Danil I. Vahitov

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

Волосникова Екатерина Александровна, канд. биол. наук / **Ekaterina A. Volosnikova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

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

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

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

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

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

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

Поступила 10.06.2026

После доработки 03.08.2026

Принята к публикации 25.09.2026

Received June 10, 2026

Revised August 3, 2026

Accepted September 25, 2026