

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., Рудометов А.П., Ильичёв А.А., Карпенко Л.И.

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

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

Приложение 1 | Supplementary material 1

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

Дополнение к разделу «Материалы и методы»

Трансфекция клеток НЕК293 мРНК

Клетки НЕК293 выращивали в 24-луночных культуральных планшетах (Corning, США) с питательной средой DMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% FBS (HyClone, США) и 50 мкг/мл гентамицина. Монослой 70–80% конфлюэнтных клеток трансфицировали мРНК, кодирующей белок GFP, с использованием набора (BIOSPECIFICA, Россия; кат. № PEI-01). Трансфицирующий агент смешивали с 1 мкг мРНК, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и добавляли к клеткам. Затем клеточные планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч. Уровень флуоресценции GFP оценивали с помощью микроскопа Olympus CKX53 (Olympus, Япония) и с помощью проточного цитометра ZE5 (Bio-Rad, США). Анализ данных проточной цитометрии проводили по единой стратегии гейтирования для всех образцов (*рис. S1*). На первом этапе по параметрам FSC-A/SSC-A исключали клеточный дебрис и отбирали основную популяцию клеток НЕК293. Далее по соотношению FSC-A/FSC-N исключали агрегаты и анализировали одиночные клетки. Порог GFP-позитивности устанавливали по нетрансфицированным клеткам НЕК293 таким образом, чтобы в отрицательном контроле доля событий в GFP-положительной области не превышала 0,5–1,0%, примерно ниже значения 1×10^2 по шкале GFP-Area. После установки порога одинаковый гейт применяли ко всем образцам внутри эксперимента.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Специфические IgG-антитела в сыворотках крови мышей определяли методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве антигена использовали эукариотический рекомбинантный белок гемагглютинины H1 (A/Wisconsin/67/2022(H1N1)pdm09), либо H3 (A/Darwin/9/2021(H3N2)), либо HВ (В/Austria/1359417/2021), ранее полученные ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. В качестве вторичных антител использовали кроличьи антимышьиные IgG-антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich). В качестве хромогенного субстрата использовали субстрат ТМВ (Amresco LLC, США). После инкубации реакцию останавливали 1М HCl и измеряли оптическую

плотность растворов при длине волны 450 нм на планшетном ридере Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific, США).

Оценка клеточного иммунного ответа методом ELISpot

Спленоциты выделяли путем индивидуального последовательного прессования образцов селезенки через нейлоновые клеточные фильтры с диаметром пор 70 и 40 мкм (Jet BIOFIL, КНР). Эритроциты удаляли с помощью буфера для лизиса эритроцитов (Sigma-Aldrich, США; кат. № 11814389001). Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли с помощью метода иммуноферментных пятен для выявления клеток, секретирующих интерферон- γ , (IFN- γ ELISpot) по числу спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию пептидами белков вируса гриппа. Анализ проводили с использованием наборов ELISpot Plus: Mouse IFN- γ (ALP) (MABTECH, Швеция; кат. № 3321-4AST-10) согласно инструкции производителя. Для стимуляции клеток использовали смесь специфических пептидов, по 5 на каждый антиген, длиной 10–20 а.о., соответствующих консервативным Т-клеточным эпитопам белков гемагглютинаина вирусов гриппа A/Wisconsin/67/2022(H1N1)pdm09, A/Darwin/9/2021(H3N2) и B/Austria/1359417/2021, синтезированных в AtaGenix Laboratories (КНР). Концентрация каждого пептида составляла 20 мкг/мл. Подсчет количества продуцирующих IFN- γ клеток осуществляли с помощью ELISpot-ридера Carl Zeiss KS ELISPOT Compact (Carl Zeiss, Германия).

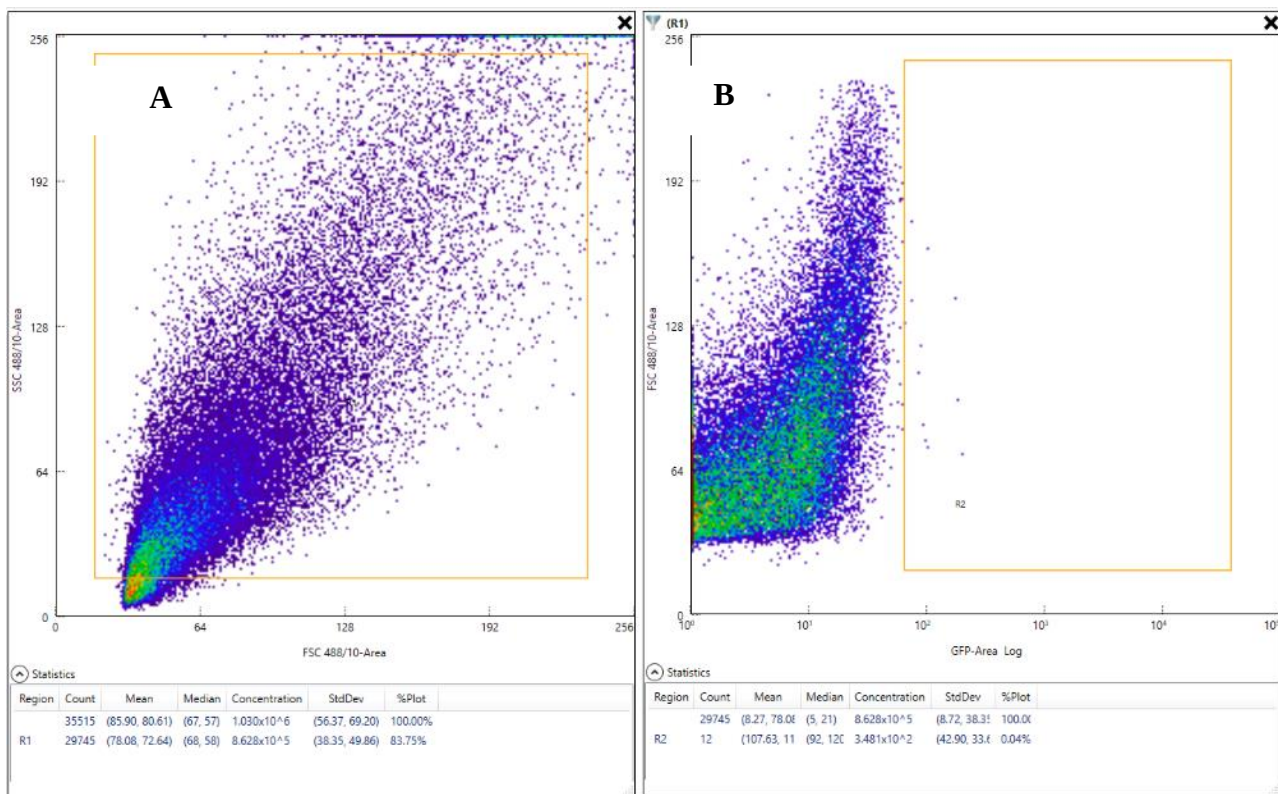


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. S1. Стратегия гейтирования GFP-положительных HEK293 клеток. А – диаграмма рассеяния HEK293 клеток; В – нетрансфицированные HEK293 клетки (отрицательный контроль). GFP – зеленый флуоресцентный белок.

Fig. S1. Gating strategy for GFP-positive HEK293 cells. A, scatter plot of HEK293 cells; B, untransfected HEK293 cells (negative control). GFP, green fluorescent protein.

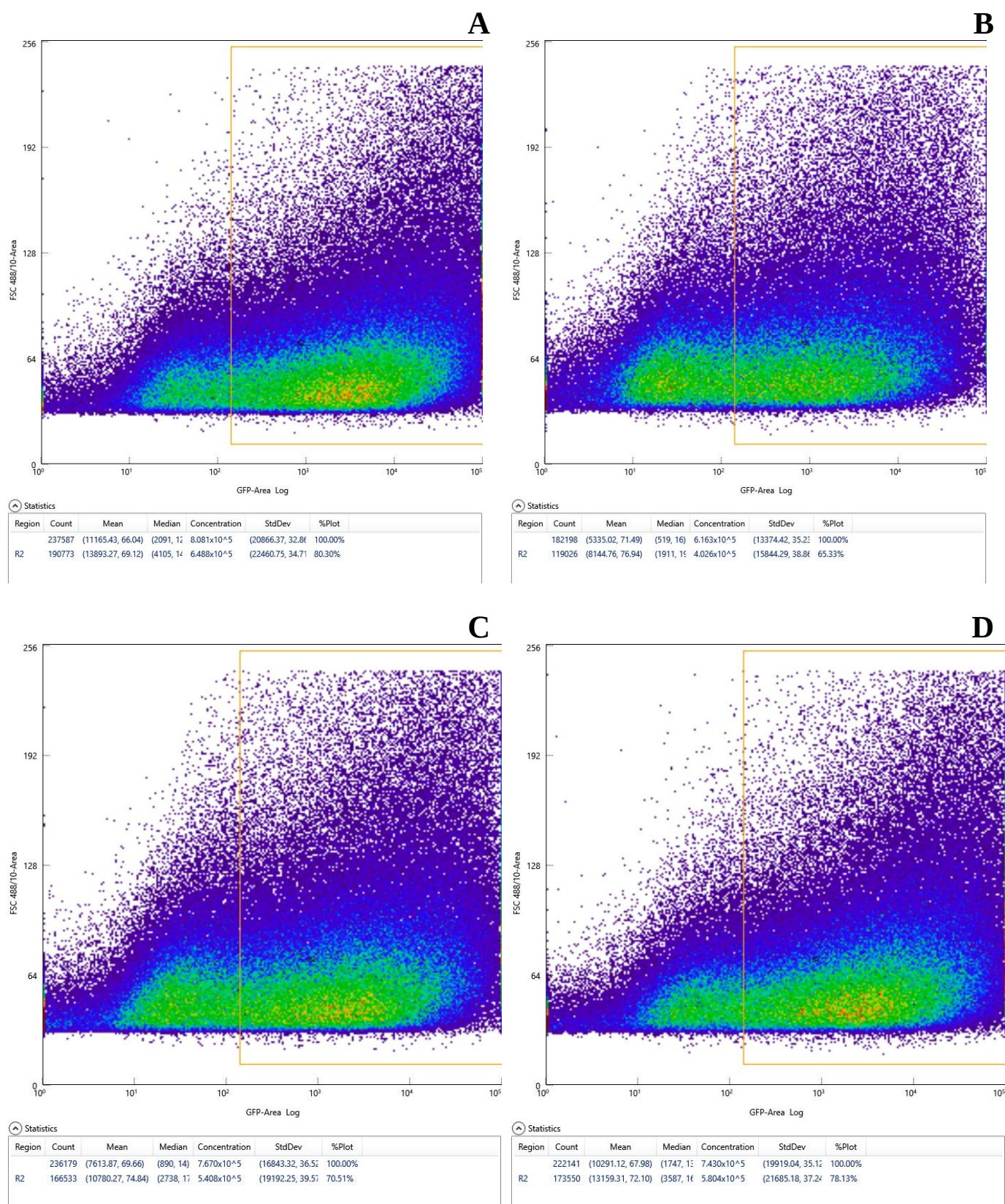


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. S2. Результаты проточной цитофлуориметрии (интенсивность свечения клеток HEK293). А – интактный контроль (нативная нелиофилизированная мРНК-GFP); В – мРНК-GFP, лиофилизированная с криопротектором № 1 (сахароза); С – мРНК-GFP, лиофилизированная с криопротектором № 2 (манноза); D – мРНК-GFP, лиофилизированная с криопротектором № 3 (трегалоза). GFP – зеленый флуоресцентный белок.

Fig. S2. Results of flow cytometry (fluorescence intensity of HEK293 cells). A, intact control (native nonlyophilized GFP mRNA); B, GFP mRNA lyophilized with cryoprotectant No. 1 (sucrose); C, GFP mRNA lyophilized with cryoprotectant No. 2 (mannose); D, GFP mRNA lyophilized with cryoprotectant No. 3 (trehalose). GFP, green fluorescent protein.

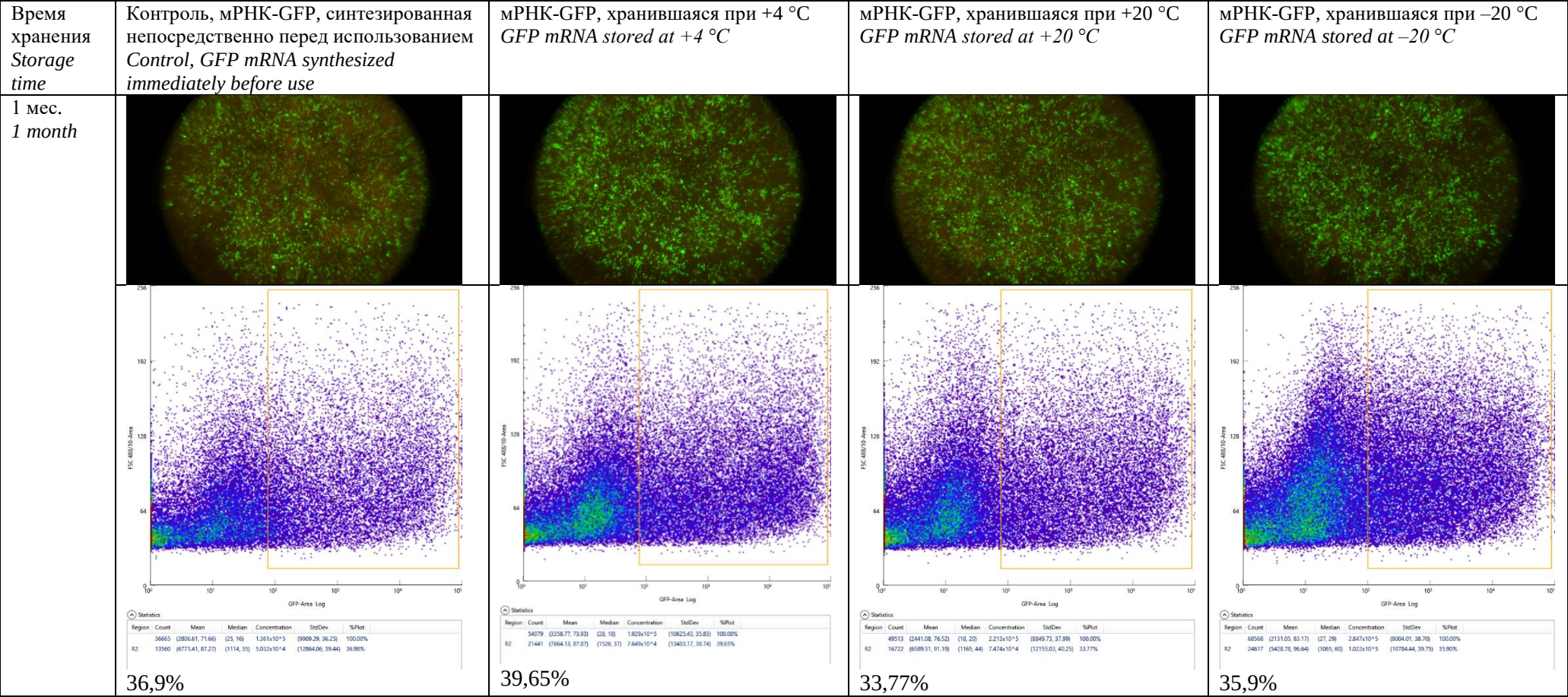


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. S3. Оценка эффективности синтеза белка GFP в клетках HEK293, трансфицированных лиофилизированной мРНК-GFP. Представлены микрофотографии клеток HEK293, трансфицированных различными препаратами мРНК-GFP, объектив $\times 10$, а также данные проточной цитометрии. GFP – зеленый флуоресцентный белок.

Fig. S3. Evaluation of the efficiency of GFP protein synthesis in HEK293 cells transfected with lyophilized GFP mRNA. Micrographs of HEK293 cells transfected with various preparations of GFP mRNA are presented, objective magnification $\times 10$, along with flow cytometry data. GFP, green fluorescent protein.

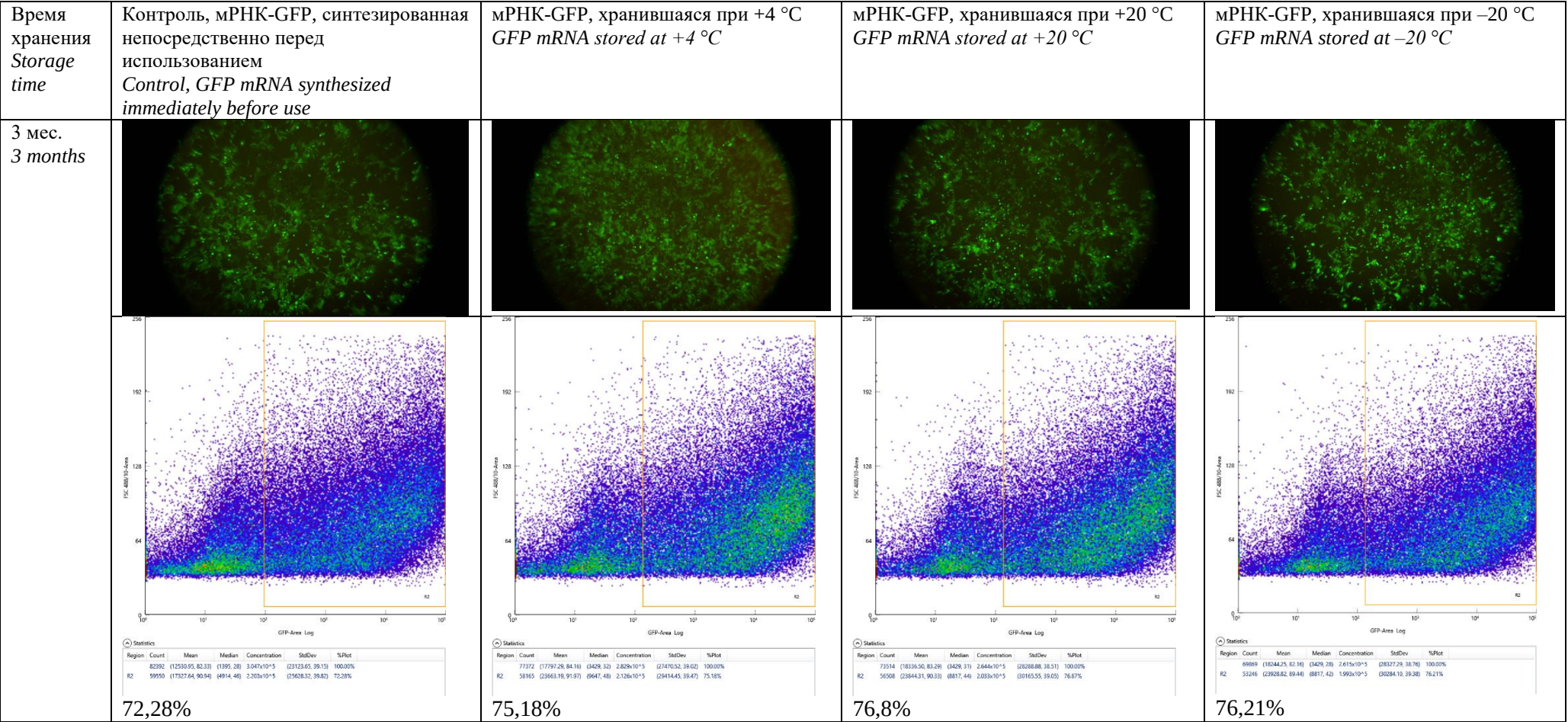


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. S3. Оценка эффективности синтеза белка GFP в клетках HEK293, трансфицированных лиофилизированной мРНК-GFP. Представлены микрофотографии клеток HEK293, трансфицированных различными препаратами мРНК-GFP, объектив $\times 10$, а также данные проточной цитометрии. GFP – зеленый флуоресцентный белок.

Fig. S3. Evaluation of the efficiency of GFP protein synthesis in HEK293 cells transfected with lyophilized GFP mRNA. Micrographs of HEK293 cells transfected with various preparations of GFP mRNA are presented, objective magnification $\times 10$, along with flow cytometry data. GFP, green fluorescent protein.

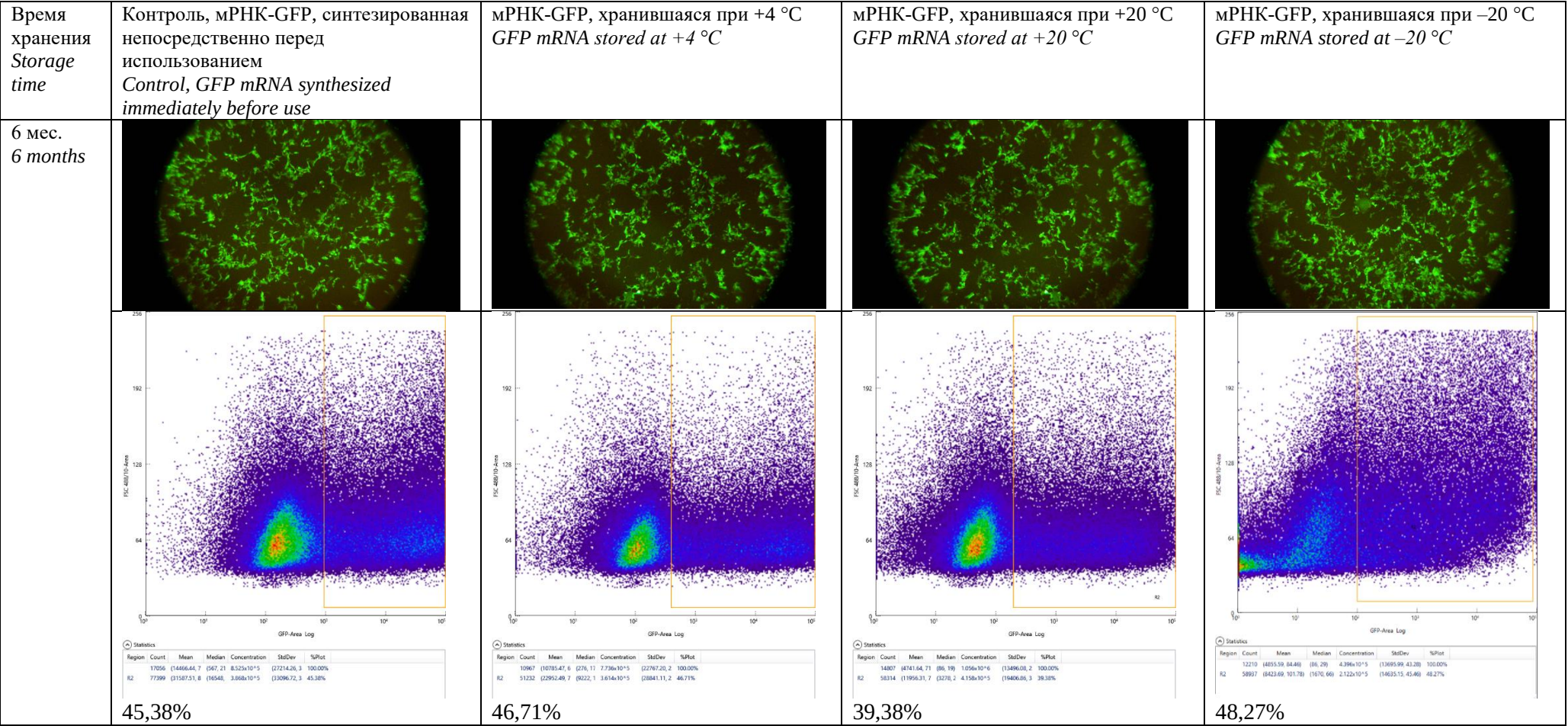
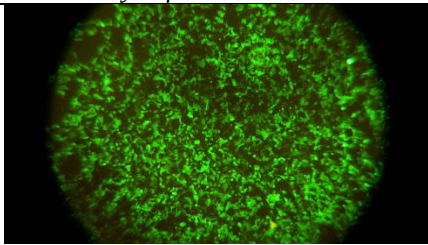
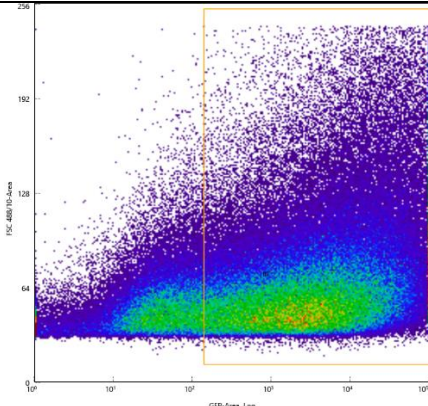
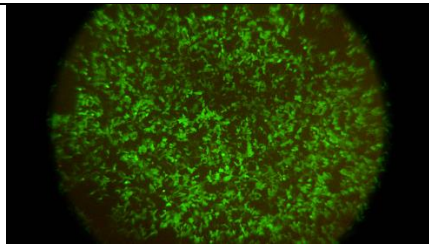
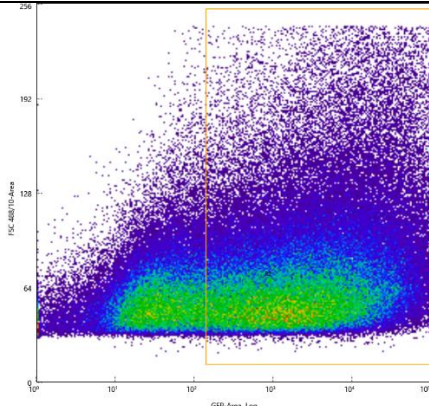
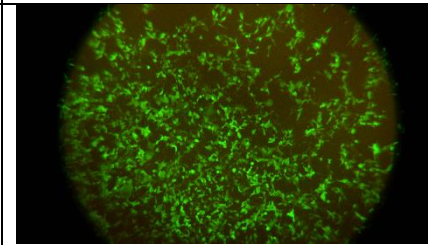
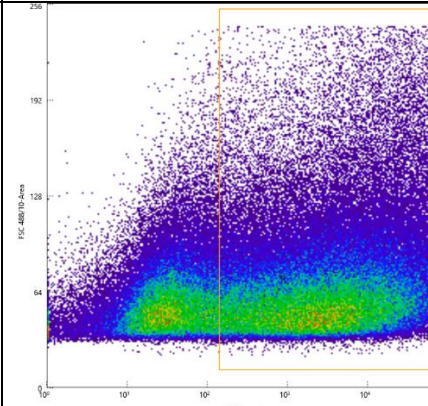
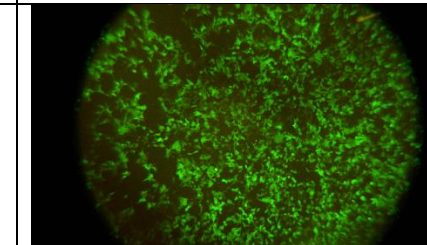
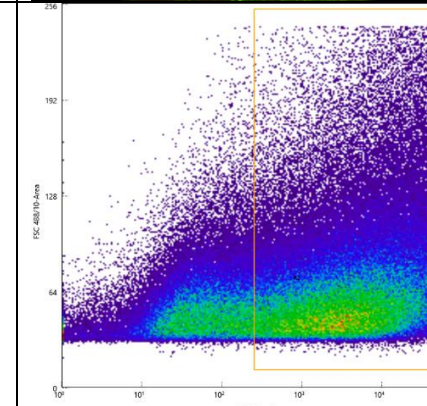


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. S3. Оценка эффективности синтеза белка GFP в клетках HEK293, трансфицированных лиофилизированной мРНК-GFP. Представлены микрофотографии клеток HEK293, трансфицированных различными препаратами мРНК-GFP, объектив ×10, а также данные проточной цитометрии. GFP – зеленый флуоресцентный белок.

Fig. S3. Evaluation of the efficiency of GFP protein synthesis in HEK293 cells transfected with lyophilized GFP mRNA. Micrographs of HEK293 cells transfected with various preparations of GFP mRNA are presented, objective magnification ×10, along with flow cytometry data. GFP, green fluorescent protein.

Время хранения Storage time	Контроль, мРНК-GFP, синтезированная непосредственно перед использованием Control, GFP mRNA synthesized immediately before use	мРНК-GFP, хранившаяся при +4 °C GFP mRNA stored at +4 °C	мРНК-GFP, хранившаяся при +20 °C GFP mRNA stored at +20 °C	мРНК-GFP, хранившаяся при –20 °C GFP mRNA stored at –20 °C																																																																																
12 мес. 12 months	 <table><thead><tr><th>Region</th><th>Count</th><th>Mean</th><th>Median</th><th>Concentration</th><th>StdDev</th><th>%Plot</th></tr></thead><tbody><tr><td>222141</td><td>(10291.12, 67.98)</td><td>(1747, 1)</td><td>7.430e+10⁻⁵</td><td>(19919.04, 33.1)</td><td>100.00%</td></tr><tr><td>R2</td><td>179390</td><td>(15199.31, 72.10)</td><td>(3507, 1)</td><td>5.804e+10⁻⁵</td><td>(21685.18, 37.2)</td><td>78.13%</td></tr></tbody></table>	Region	Count	Mean	Median	Concentration	StdDev	%Plot	222141	(10291.12, 67.98)	(1747, 1)	7.430e+10 ⁻⁵	(19919.04, 33.1)	100.00%	R2	179390	(15199.31, 72.10)	(3507, 1)	5.804e+10 ⁻⁵	(21685.18, 37.2)	78.13%	 <table><thead><tr><th>Region</th><th>Count</th><th>Mean</th><th>Median</th><th>Concentration</th><th>StdDev</th><th>%Plot</th></tr></thead><tbody><tr><td>196446</td><td>(7518.42, 71.02)</td><td>(895, 18)</td><td>6.256e+10⁻⁵</td><td>(16691.05, 34.6)</td><td>100.00%</td></tr><tr><td>R2</td><td>140572</td><td>(10468.77, 73.32)</td><td>(2618, 1)</td><td>4.478e+10⁻⁵</td><td>(18658.90, 37.7)</td><td>71.56%</td></tr></tbody></table>	Region	Count	Mean	Median	Concentration	StdDev	%Plot	196446	(7518.42, 71.02)	(895, 18)	6.256e+10 ⁻⁵	(16691.05, 34.6)	100.00%	R2	140572	(10468.77, 73.32)	(2618, 1)	4.478e+10 ⁻⁵	(18658.90, 37.7)	71.56%	 <table><thead><tr><th>Region</th><th>Count</th><th>Mean</th><th>Median</th><th>Concentration</th><th>StdDev</th><th>%Plot</th></tr></thead><tbody><tr><td>193531</td><td>(8707.01, 68.62)</td><td>(873, 14)</td><td>6.153e+10⁻⁵</td><td>(18825.12, 33.1)</td><td>100.00%</td></tr><tr><td>R2</td><td>133248</td><td>(12440.34, 72.31)</td><td>(3278, 1)</td><td>4.300e+10⁻⁵</td><td>(21215.62, 35.8)</td><td>69.83%</td></tr></tbody></table>	Region	Count	Mean	Median	Concentration	StdDev	%Plot	193531	(8707.01, 68.62)	(873, 14)	6.153e+10 ⁻⁵	(18825.12, 33.1)	100.00%	R2	133248	(12440.34, 72.31)	(3278, 1)	4.300e+10 ⁻⁵	(21215.62, 35.8)	69.83%	 <table><thead><tr><th>Region</th><th>Count</th><th>Mean</th><th>Median</th><th>Concentration</th><th>StdDev</th><th>%Plot</th></tr></thead><tbody><tr><td>243740</td><td>(11360.12, 68.74)</td><td>(1999, 1)</td><td>7.747e+10⁻⁵</td><td>(21418.30, 35.8)</td><td>100.00%</td></tr><tr><td>R2</td><td>179459</td><td>(15401.56, 73.43)</td><td>(4698, 1)</td><td>5.704e+10⁻⁵</td><td>(23688.15, 38.5)</td><td>73.63%</td></tr></tbody></table>	Region	Count	Mean	Median	Concentration	StdDev	%Plot	243740	(11360.12, 68.74)	(1999, 1)	7.747e+10 ⁻⁵	(21418.30, 35.8)	100.00%	R2	179459	(15401.56, 73.43)	(4698, 1)	5.704e+10 ⁻⁵	(23688.15, 38.5)	73.63%
Region	Count	Mean	Median	Concentration	StdDev	%Plot																																																																														
222141	(10291.12, 67.98)	(1747, 1)	7.430e+10 ⁻⁵	(19919.04, 33.1)	100.00%																																																																															
R2	179390	(15199.31, 72.10)	(3507, 1)	5.804e+10 ⁻⁵	(21685.18, 37.2)	78.13%																																																																														
Region	Count	Mean	Median	Concentration	StdDev	%Plot																																																																														
196446	(7518.42, 71.02)	(895, 18)	6.256e+10 ⁻⁵	(16691.05, 34.6)	100.00%																																																																															
R2	140572	(10468.77, 73.32)	(2618, 1)	4.478e+10 ⁻⁵	(18658.90, 37.7)	71.56%																																																																														
Region	Count	Mean	Median	Concentration	StdDev	%Plot																																																																														
193531	(8707.01, 68.62)	(873, 14)	6.153e+10 ⁻⁵	(18825.12, 33.1)	100.00%																																																																															
R2	133248	(12440.34, 72.31)	(3278, 1)	4.300e+10 ⁻⁵	(21215.62, 35.8)	69.83%																																																																														
Region	Count	Mean	Median	Concentration	StdDev	%Plot																																																																														
243740	(11360.12, 68.74)	(1999, 1)	7.747e+10 ⁻⁵	(21418.30, 35.8)	100.00%																																																																															
R2	179459	(15401.56, 73.43)	(4698, 1)	5.704e+10 ⁻⁵	(23688.15, 38.5)	73.63%																																																																														

78,13%

71,56%

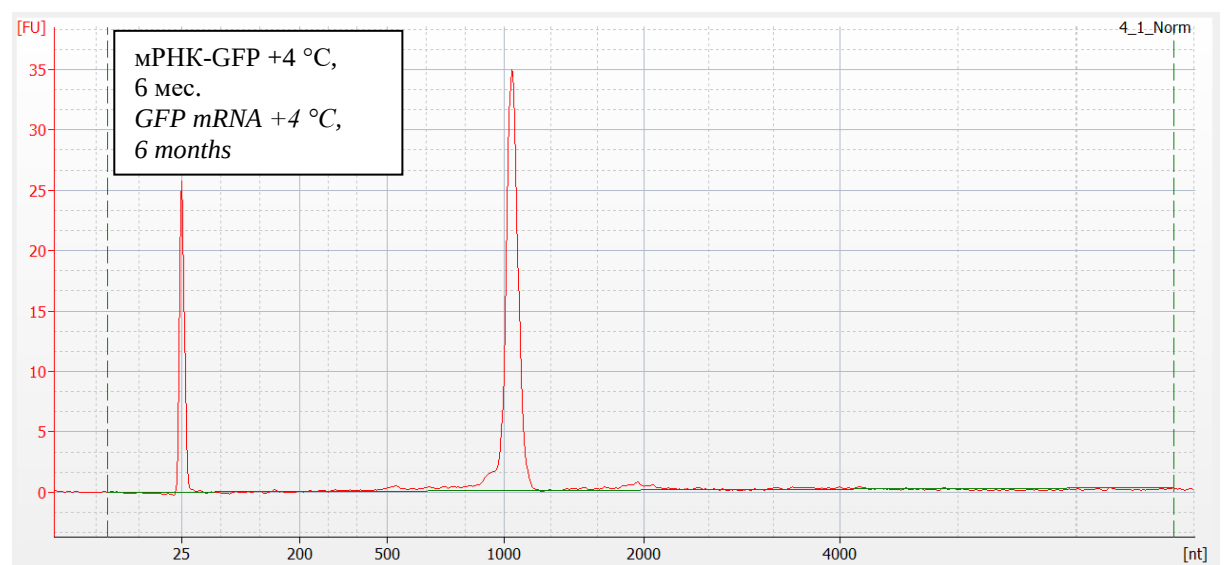
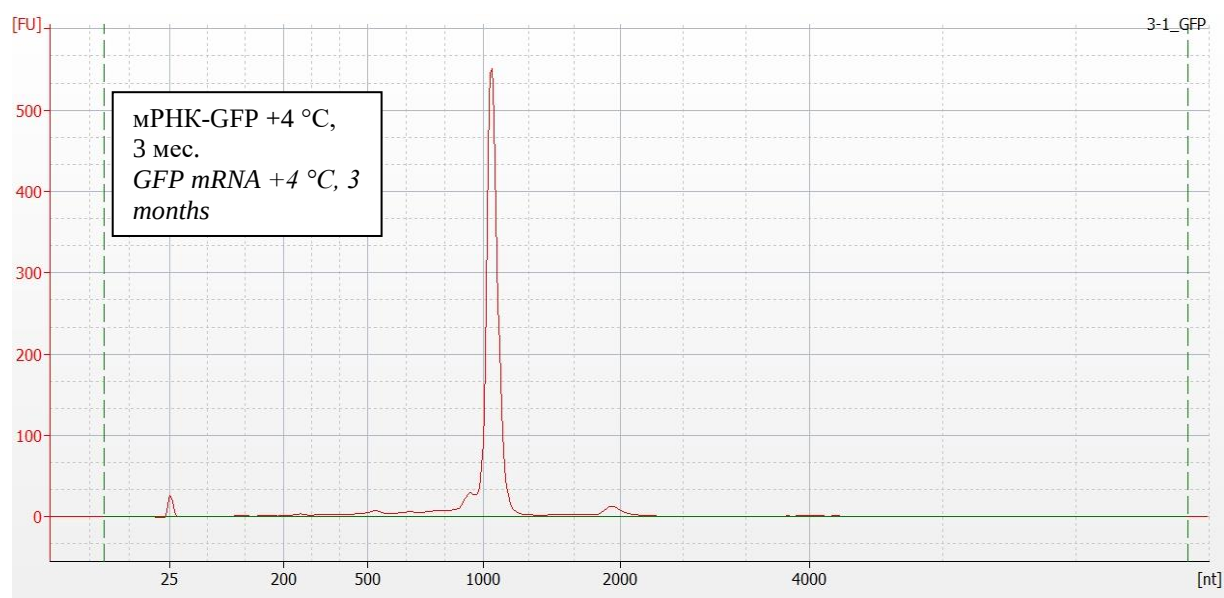
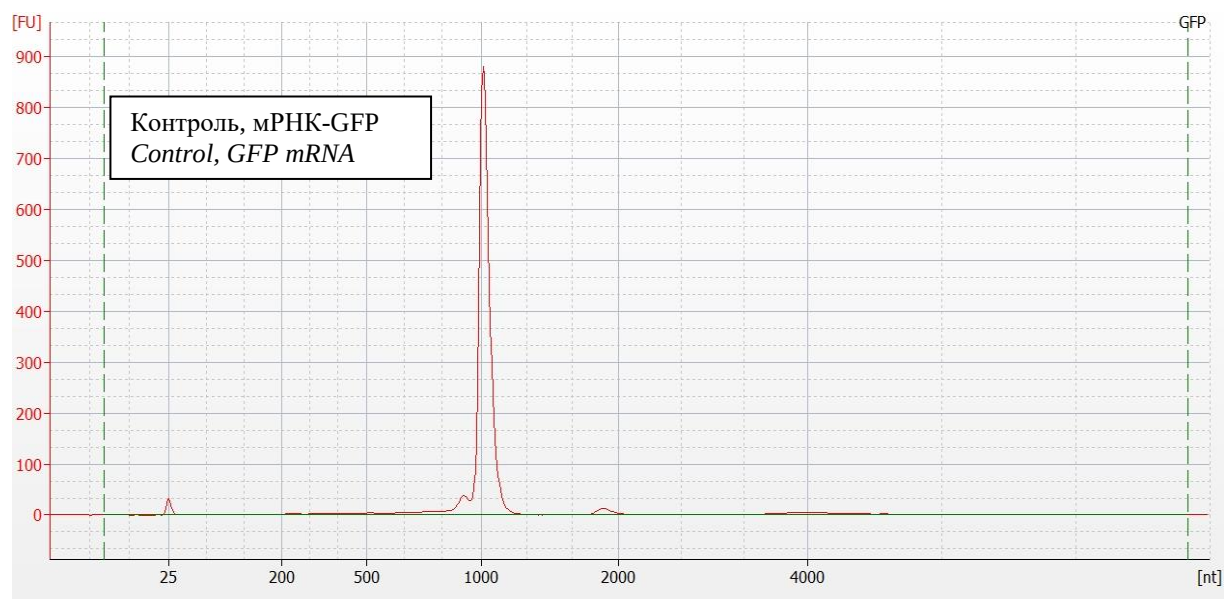
69,83%

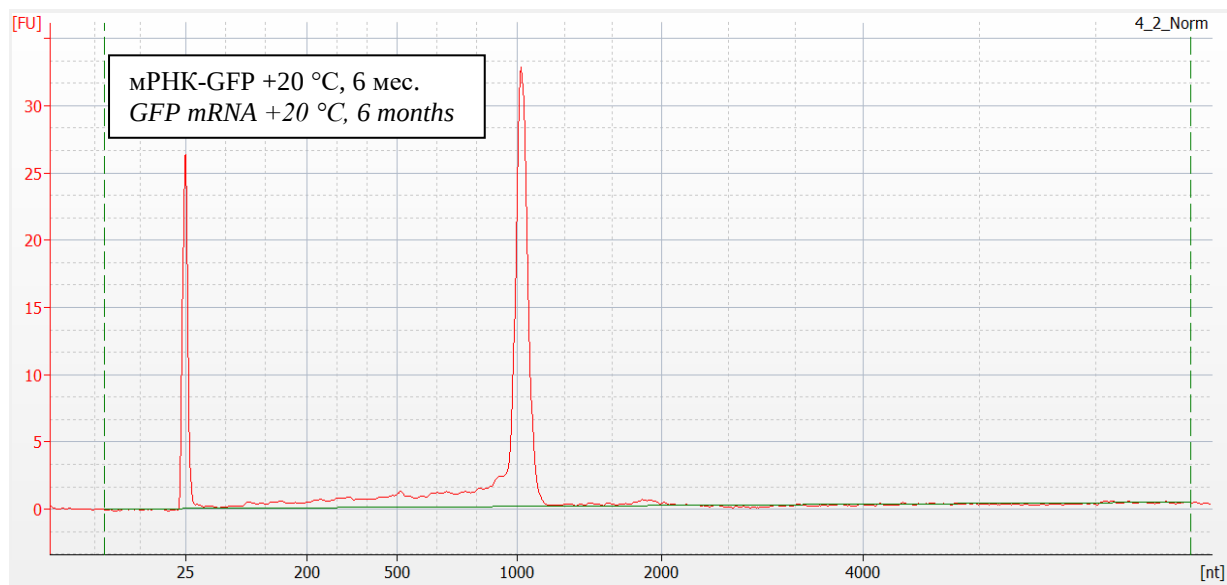
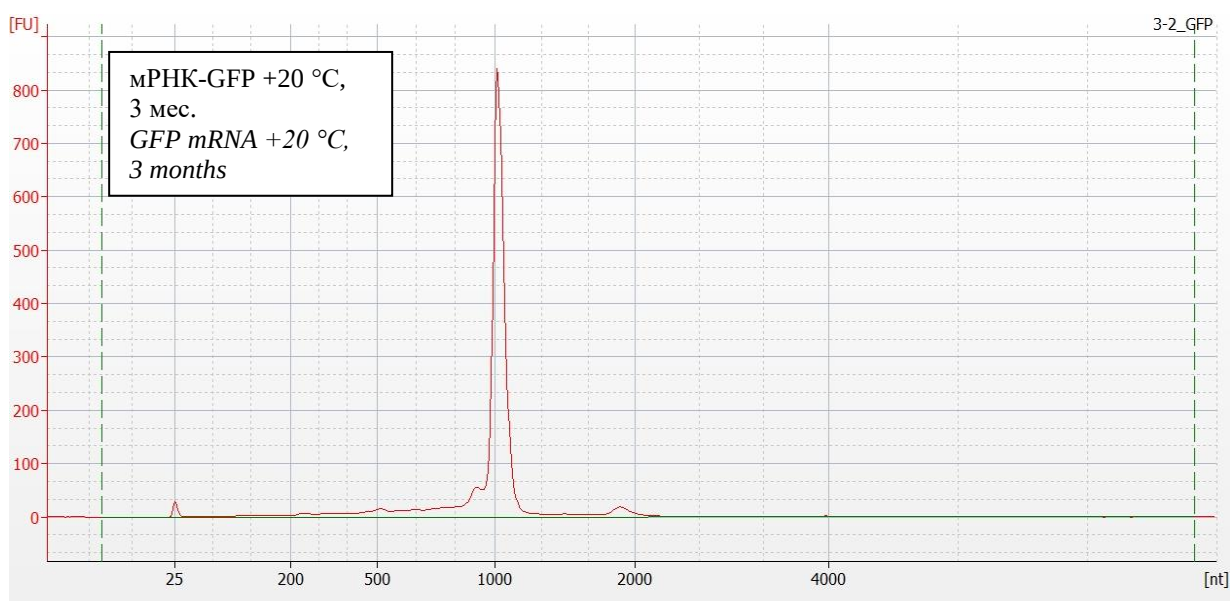
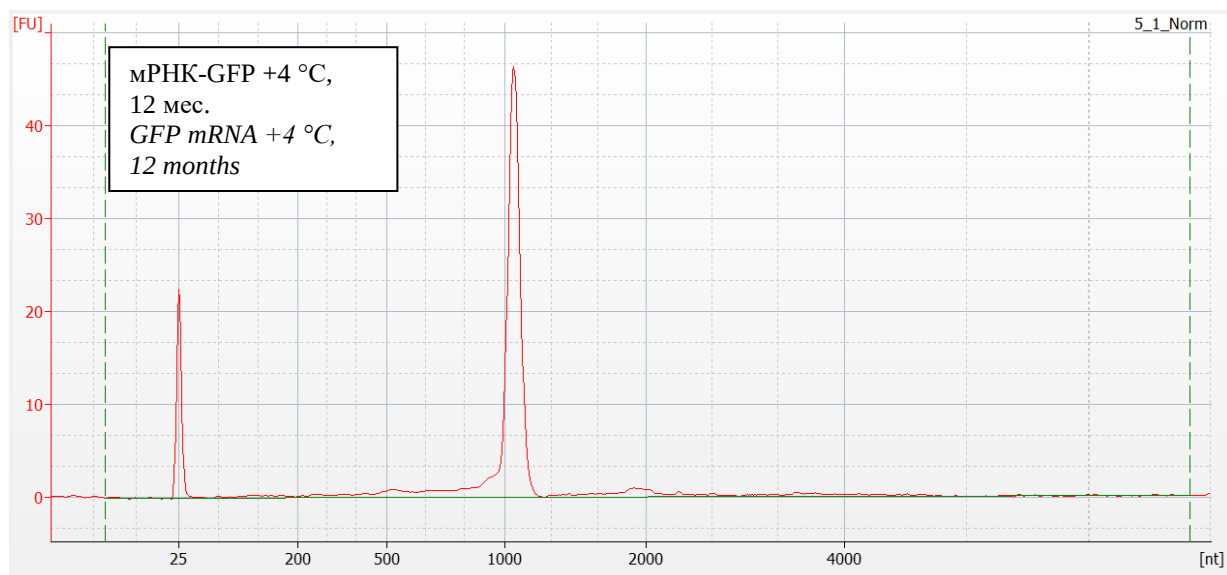
73,63%

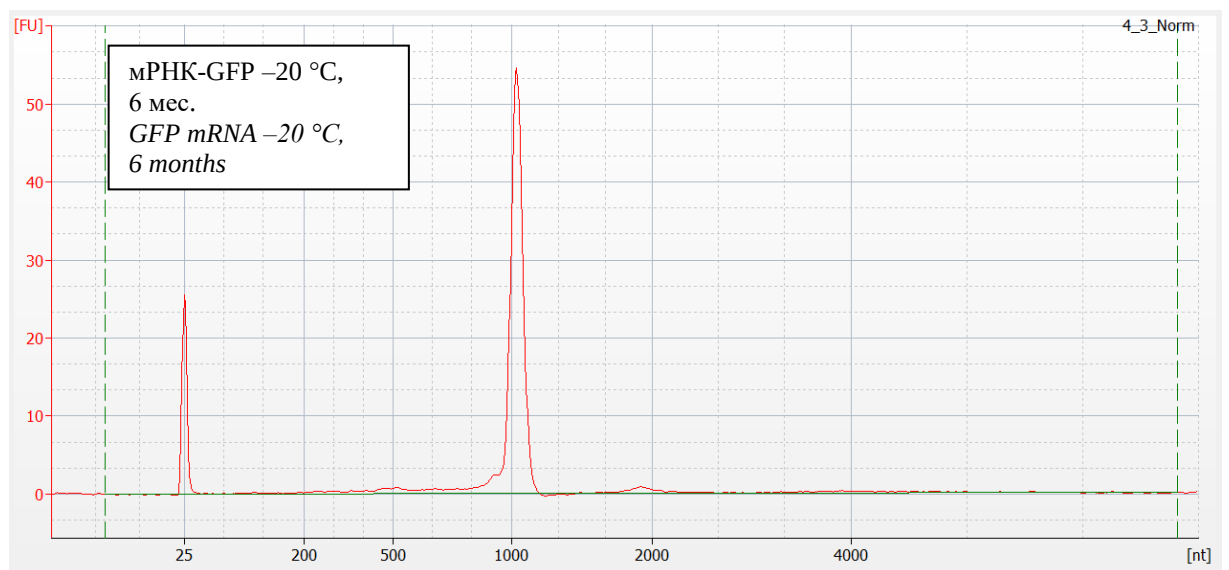
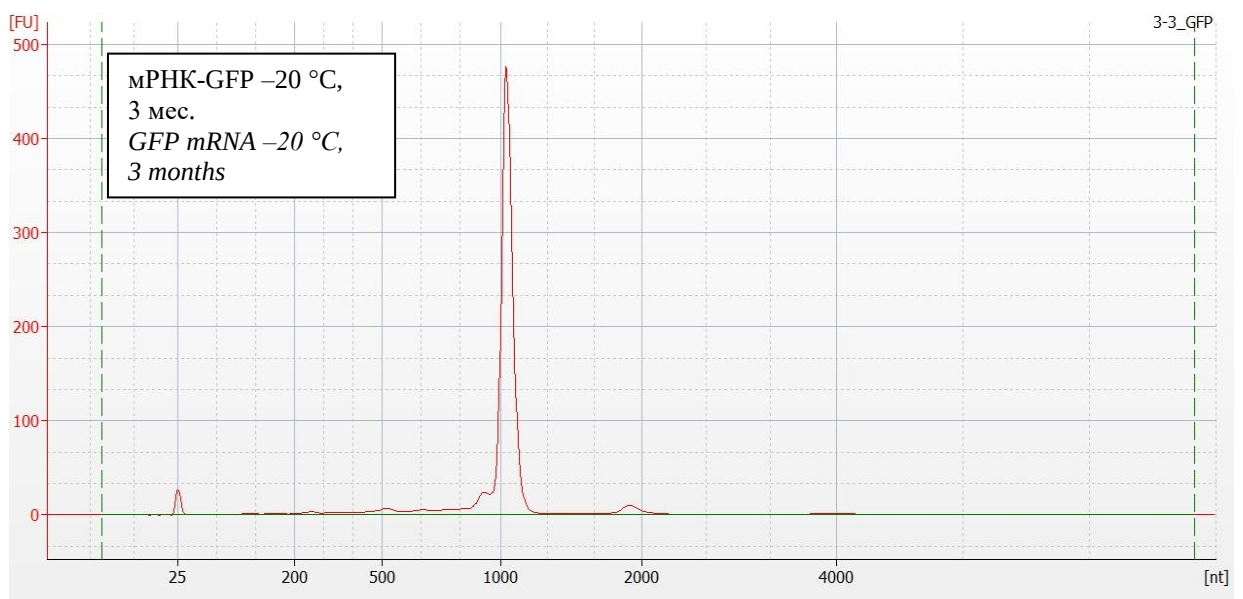
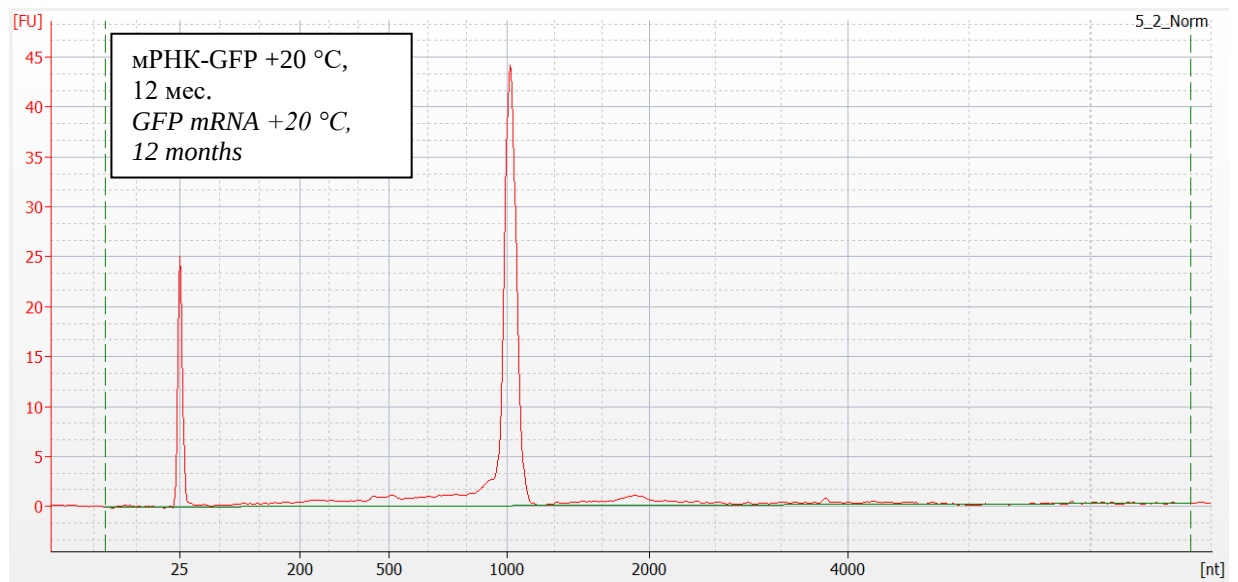
Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. S3. Оценка эффективности синтеза белка GFP в клетках HEK293, трансфицированных лиофилизированной мРНК-GFP. Представлены микрофотографии клеток HEK293, трансфицированных различными препаратами мРНК-GFP, объектив $\times 10$, а также данные проточной цитометрии. GFP – зеленый флуоресцентный белок.

Fig. S3. Evaluation of the efficiency of GFP protein synthesis in HEK293 cells transfected with lyophilized GFP mRNA. Micrographs of HEK293 cells transfected with various preparations of GFP mRNA are presented, objective magnification $\times 10$, along with flow cytometry data. GFP, green fluorescent protein.







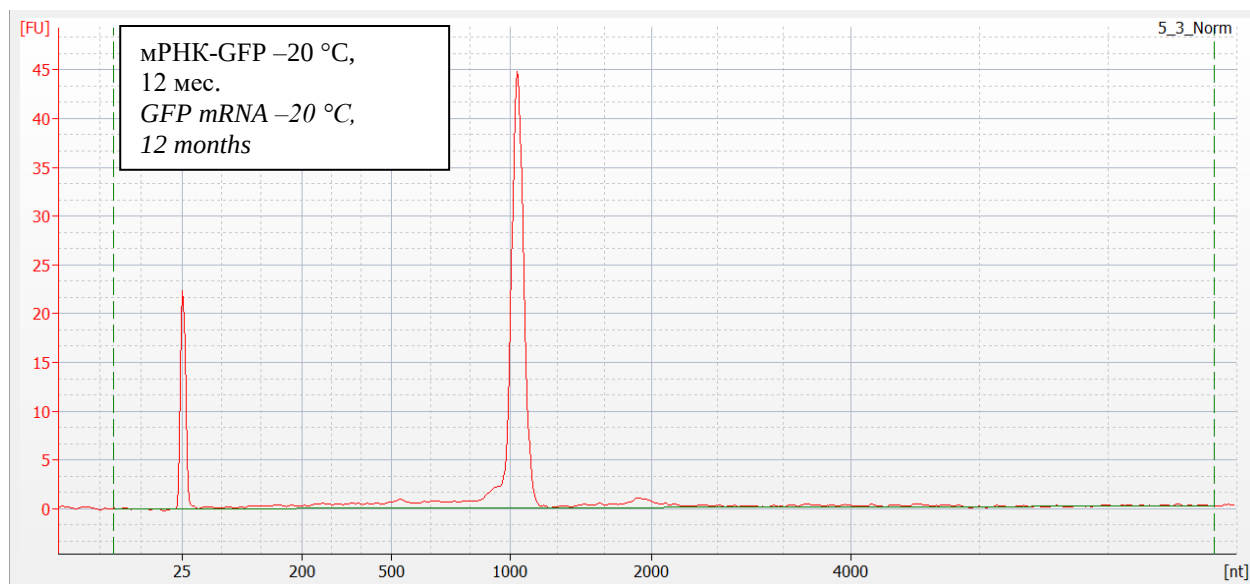


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. S4. Электрофореграмма лиофилизированной мРНК-GFP после хранения в течение 3, 6 и 12 мес., полученная методом капиллярного электрофореза.

Контроль, мРНК-GFP – мРНК-GFP, синтезированная непосредственно перед использованием;

мРНК-GFP +4 °C – лиофилизированная мРНК-GFP, хранившаяся при +4 °C;

мРНК-GFP +20 °C – лиофилизированная мРНК-GFP, хранившаяся при +20 °C;

мРНК-GFP –20 °C – лиофилизированная мРНК-GFP, хранившаяся при –20 °C.

GFP – зеленый флуоресцентный белок.

Fig. S4. Electropherogram of lyophilized GFP mRNA after storage for 3, 6, and 12 months, obtained using capillary electrophoresis.

Control, GFP mRNA: GFP mRNA synthesized immediately before use;

GFP mRNA +4 °C: lyophilized GFP mRNA stored at +4 °C;

GFP mRNA +20 °C: lyophilized GFP mRNA stored at +20 °C;

GFP mRNA –20 °C: lyophilized GFP mRNA stored at –20 °C.

GFP, green fluorescent protein.