

ISSN 2221-996X (Print)
ISSN 2619-1156 (Online)

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Том / Volume

№ / No.

26

3

2026

ТЕМА НОМЕРА

**мРНК-технологии в биомедицине:
современные достижения и регуляторная практика**



25
ЖУРНАЛУ
ЛЕТ

www.biopreparations.ru



Уважаемые коллеги!

Современная фармацевтическая отрасль переживает период интенсивного развития технологических платформ для терапии и профилактики заболеваний. Вакцины на основе мРНК, обладающие уникальной технологической гибкостью и таргетной специфичностью, открывают принципиально новые горизонты в борьбе с высокопатогенными инфекциями и для лечения социально значимых заболеваний. Создание мРНК-препаратов требует совершенствования ме-

тодологических подходов к оценке их безопасности и эффективности. В данном контексте особую актуальность приобретает гармонизация регуляторных требований Российской Федерации и ЕАЭС с международными стандартами, что важно для ускорения вывода инновационных препаратов на фармацевтический рынок.

Главной проблемой в настоящее время остается адаптация существующей нормативной базы и методологии доклинической оценки к специфике инновационных мРНК-препаратов. Внедрение концепции платформенных технологий и гибкого дизайна доклинических исследований рассматривается как стратегический инструмент оптимизации сроков перехода к фазе клинических исследований.

В рамках главной темы данного выпуска журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение», посвященного мРНК-технологиям в биомедицине, объединены актуальные обзорные и оригинальные исследования. Научно обоснованы принципы применения платформенного подхода для мРНК-вакцин и генотерапевтических лекарственных препаратов, представлен анализ мирового регуляторного ландшафта в области доклинической оценки терапевтических олигонуклеотидов. Особый интерес представляет систематизация опыта клинических исследований мРНК-вакцин против респираторно-синцитиальной и цитомегаловирусной инфекций, гриппа, лихорадки Зика и бешенства. Экспериментальный блок статей содержит результаты доклинического изучения новых терапевтических конструкций на основе мРНК. Читатели смогут ознакомиться с результатами оценки иммуногенности мРНК-вакцин против высокопатогенного гриппа птиц (H5Nx) и сезонного гриппа, инкапсулированных в липидные наночастицы и доставляемых методом струйной инъекции, а также данными по конструированию двухкомпонентной мРНК-вакцины против SARS-CoV-2.

Публикуемые в выпуске материалы представляют несомненный практический интерес как для разработчиков инновационных лекарственных средств, так и для специалистов в области доклинической и клинической фармакологии.

С уважением,
главный редактор
МЕРКУЛОВ Вадим Анатольевич

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

ТОМ 26, № 3, 2026

Научно-практический журнал
Выходит ежеквартально (четыре выпуска в год)
Основан в 2001 году

Учредитель:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Журнал входит в Единый государственный перечень научных изданий (ЕГПНИ) — «Белый список» (уровень 2), а также в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и на соискание ученой степени доктора наук. Журнал принимает статьи по следующим научным специальностям: биотехнология, молекулярная биология, вирусология, микробиология, аллергология и иммунология.

Журнал индексируется в базах данных: Scopus, Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI), RUSMED, Chemical Abstract Service (CAS), BASE, NLM каталог, DOAJ, Ulrichsweb и др.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ (2025): 0,641.

CiteScore Scopus (2025): 0,7 (Q3).

Плата за публикацию статей и рецензирование рукописей не взимается.

Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International CC BY 4.0.

VOLUME 26, NO. 3, 2026

Research and practice journal
Published quarterly (four issues per year)
Founded in 2001

Founder:

Federal State Budgetary Institution “Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products” of the Ministry of Health of the Russian Federation (Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products)

The journal is included in the Unified State List of Scientific Publications (“White List”, level 2) and the List of peer-reviewed scientific publications that the State Commission for Academic Degrees and Titles recommends for publishing the main scientific results of theses for Candidate of Science and Doctor of Science degrees. Articles submitted to the journal should cover the following fields of research: biotechnology, molecular biology, virology, microbiology, allergology and immunology.

The journal is indexed in the following databases: Scopus, Russian Index of Science Citation (RISC), Russian Science Citation Index (RSCI), RUSMED, Chemical Abstract Service (CAS), BASE, NLM Catalog, DOAJ, Ulrichsweb, etc.

Two-year RISC Impact Factor (2025): 0.641.

CiteScore Scopus (2025): 0.7 (Q3).

There is no fee for publishing articles and reviewing manuscripts.

The content is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International licence (CC BY 4.0).

На обложке: Вакцина на основе мРНК и липидных наночастиц, 3D-изображение (лицензированное изображение фотобанка ООО «Фотодженика» <https://photogenica.ru/zoom/PHX610468902/>)

Cover image: Lipid nanoparticle mRNA vaccine, 3D Illustration (a licensed image from the Photogenica image bank <https://photogenica.ru/zoom/PHX610468902/>)

Главный редактор

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва, Россия)

Заместители главного редактора

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия)

Хаитов Муса Рахимович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва, Россия)

Ответственный секретарь

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

В журнале публикуются обзорные, оригинальные, дискуссионные статьи по вопросам разработки регуляторных процедур, стандартизации, контроля качества, производства и применения терапевтических, профилактических и диагностических биологических лекарственных препаратов – иммунобиологических, биотехнологических, генотерапевтических и лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека и животных; а также различных групп иммуномодулирующих лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов.

Редакционная коллегия

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф., ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия)

Агафонов Александр Петрович, д-р биол. наук, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия)

Акоста Бас Кармен, PhD, проф., Latinoамериканский институт биотехнологий «Мечников» (Манагуа, Никарагуа)

Аракелов Сергей Александрович, канд. биол. наук, ФГУП «СПбНИИВС» ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «ЦСП» ФМБА России (Москва, Россия)

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф., ФМБА России (Москва, Россия)

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Брико Николай Иванович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Москва, Россия)

Валента Рудольф, MD, проф., Венский медицинский университет (Вена, Австрия)

Гасич Елена Леонидовна, д-р биол. наук, доц., ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» (Минск, Республика Беларусь)

Гинцбург Александр Леонидович, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Дмитриев Игорь Павлович, канд. биол. наук, Университет Вашингтона в Сент-Луисе (Сент-Луис, штат Миссури, США)

Иванов Вячеслав Борисович, д-р мед. наук, проф., «Филиал ФГБВОУ ВО Военно-медицинской академии в г. Москве» (Москва, Россия)

Климов Владимир Иванович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Коровкин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук, ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия)

Лакота Ян, д-р мед. наук, Институт нормальной и патологической физиологии Центра экспериментальной медицины Словацкой академии наук (Братислава, Словакия)

Логунов Денис Юрьевич, д-р биол. наук, академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Миронов Александр Николаевич, д-р мед. наук, проф., ООО «Национальное агентство лекарственных средств» (Москва, Россия)

Мосягин Вячеслав Дмитриевич, д-р мед. наук, проф., «Филиал ФГБВОУ ВО Военно-медицинской академии в г. Москве» (Москва, Россия)

Свитич Оксана Анатольевна, д-р мед. наук, академик РАН, ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия)

Смит Елена, канд. биол. наук, Центр передовых мРНК-технологий Санофи (Уолтем, штат Массачусетс, США)

Стома Игорь Олегович, д-р мед. наук, проф., Белорусский филиал ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт» (Минск, Республика Беларусь)

Фадейкина Ольга Васильевна, канд. биол. наук, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф., АО «ГЕНЕРИУМ» (пос. Вольгинский, Владимирская область, Россия)

Шустов Александр Вячеславович, канд. биол. наук, Национальный центр биотехнологии (Астана, Казахстан)

Учредитель и издатель
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Шеф-редактор
Федотова Ольга Федоровна
+7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Ответственный редактор тематического выпуска
Меркулов Вадим Анатольевич,
д-р мед. наук, проф.

Научные редакторы
Гукасова Надежда Вадимовна,
канд. биол. наук
Ершов Павел Викторович,
канд. биол. наук

Редактор
Калиничев Сергей Анатольевич,
канд. фарм. наук

Редактор перевода
Малиновская Татьяна Петровна

Менеджер по развитию
Мжелский Александр Анатольевич

Адрес учредителя, издателя и редакции
127051, Москва,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2
тел.: +7 (499) 190-18-18
(доб. 63-42, 63-02, 63-35)
biopreparaty@expmed.ru

Исполнитель
ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва,
ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

Типография
ООО «Издательство «Триада»: 170034,
Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514

Тираж
50 экз. Цена свободная

Подписано в печать
29.09.2026

Дата выхода в свет
12.10.2026

Подписной индекс
в каталоге «Пресса России» — 57941,
в каталоге агентства «Урал-Пресс» — 57941

Журнал зарегистрирован в Федераль-
ной службе по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массо-
вых коммуникаций. Свидетельство
ПИ № ФС77-82918 от 14 марта 2022 г.

© Составление. Оформление.
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,
2026

СОДЕРЖАНИЕ

Тема номера: мРНК-ТЕХНОЛОГИИ В БИОМЕДИЦИНЕ: СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И РЕГУЛЯТОРНАЯ ПРАКТИКА Н.С. Покровский, Е.В. Мельникова, В.А. Меркулов Критерии применения платформенного подхода для мРНК-вакцин и генотерапевтических лекарственных препаратов в регуляторной практике247 Г.Н. Енгальчева, Р.Д. Сюбаев, А.А. Берчатова, О.В. Астапова, Д.В. Горячев, В.А. Меркулов Лекарственные препараты на основе олигонуклеотидов: обзор современных регуляторных требований к доклиническим исследованиям262 В.Р. Литвинова, А.С. Гудымо, В.А. Яковлев, М.Б. Боргоякова, Е.В. Старостина, Е.В. Яковлева, К.И. Иванова, О.Н. Перфильева, К.П. Макарова, Д.И. Вахитов, Н.В. Данильченко, М.Л. Егорова, Н.Н. Васильцова, С.В. Шарабрин, Н.Б. Рудомётова, Д.Н. Кисаков, Л.А. Кисакова, Т.И. Ильичёва, В.Ю. Марченко, Л.И. Карпенко, А.А. Ильичёв, А.П. Рудомётов Введение хорякам мРНК-вакцины mRNA-H5 методом струйной инъекции формирует защитный иммунитет в отношении вируса гриппа подтипа H5N1276 М.Б. Боргоякова, А.П. Рудомётов, С.В. Шарабрин, Е.В. Старостина, В.А. Яковлев, Е.В. Яковлева, Д.И. Вахитов, А.В. Зайковская, Л.А. Кисакова, Д.Н. Кисаков, К.П. Макарова, Е.В. Дмитриенко, Л.И. Карпенко, А.А. Ильичёв Двухкомпонентная мРНК-вакцина, сочетающая В- и Т-клеточные иммуногены вируса SARS-CoV-2, индуцирует гуморальный и клеточный иммунный ответ у мышей287 С.В. Шарабрин, С.И. Красникова, Д.Н. Кисаков, Л.А. Кисакова, Е.В. Старостина, М.Б. Боргоякова, В.Р. Литвинова, В.А. Яковлев, Е.В. Яковлева, К.И. Иванова, А.А. Бондарь, К.П. Макарова, Д.И. Вахитов, Е.А. Волосникова, А.П. Рудомётов, А.А. Ильичёв, Л.И. Карпенко Структурная и функциональная стабильность лиофилизированной неинкапсулированной мРНК, синтезированной <i>in vitro</i>, при длительном хранении299 А.Ю. Бутырский, А.С. Коровкин, Д.В. Горенков, В.А. Меркулов мРНК-вакцины для профилактики инфекционных заболеваний: обзор международного опыта оценки эффективности и безопасности по результатам клинических исследований311
ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ Р.Д. Теодорович, Т.К. Дзагурова, С.С. Курашова, М.С. Егорова, Н.А. Коротина, М.В. Баловнева, А.А. Ишмухаметов Вакцины для профилактики хантавирусных лихорадок: обзор результатов и перспектив разработок324
СТАНДАРТИЗАЦИЯ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА А.И. Желтухина, А.Б. Комиссаров, А.В. Фадеев, Н.Д. Ёлшин, М.М. Писарева, В.А. Едер, М. Коржанова, А.Д. Ксенафонтов, А.А. Передерий, О.В. Охлопкова, Л.А. Саушкина, Е.В. Шведова, Е.А. Гришина, Д.А. Лиознов Генетическая характеристика производственных штаммов вирусов кори, краснухи и паротита методом высокопроизводительного секвенирования336
Н.Н. Савина, М.Ш. Алиев, А.И. Реутский, Т.В. Горохова, О.С. Бабкина, С.В. Панкратов, Н.Ю. Серова Инактивация <i>Mycoplasma gallisepticum</i> и <i>Mycoplasma synoviae</i> при производстве гриппозных вакцин349
РАЗЪЯСНЕНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ТРЕБОВАНИЙ И НОРМАТИВНЫХ АКТОВ Е.В. Мельникова Контроль качества мРНК-вакцин: рекомендации производителям359

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Editor-in-Chief

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Deputy Editors-in-Chief

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russia)

Musa R. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. RAS, National Research Centre "Institute of Immunology" (Moscow, Russia)

Executive Secretary

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

The journal *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* publishes reviews, original articles, and discussion articles on such issues as development of regulatory procedures, standardisation, quality control, production, and use of biological products for disease prevention, diagnosis, and treatment: immunobiological, biotechnological, and gene therapy products, human and animal blood plasma products, as well as various groups of immunomodulatory and cell-based medicinal products.

Editorial Board

Zhanna I. Avdeeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russia)

Alexander P. Agafonov, Dr. Sci. (Biol.), State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector" (Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia)

Carmen Acosta Bas, PhD (Health Sci.), Prof., Latin-American Institute of Biotechnology MECHNIKOV (Managua, Nicaragua)

Sergey A. Arakelov, Cand. Sci. (Biol.), Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations (Saint Petersburg, Russia)

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency (Moscow, Russia)

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal Medical and Biological Agency (Moscow, Russia)

Sergey V. Borisevich, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Acad. RAS, 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

Nikolay I. Briko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Acad. RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Rudolf Valenta, MD, PhD, Prof., Medical University of Vienna (Vienna, Austria)

Elena L. Gasich, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health (Minsk, Republic of Belarus)

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Acad. RAS, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya (Moscow, Russia)

Igor P. Dmitriev, Cand. Sci. (Biol.), Washington University in St. Louis (Saint Louis, Missouri, United States)

Vyacheslav B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch of the Military Medical Academy in Moscow (Moscow, Russia)

Vladimir I. Klimov, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Associate, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Alexey S. Korovkin, Cand. Sci. (Med.), I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russia)

Ján Lakota, MD, PhD, Institute of Normal and Pathological Physiology at the Centre of Experimental Medicine of the Slovak Academy of Sciences (Bratislava, Slovakia)

Denis Y. Logunov, Dr. Sci. (Biol.), Acad. RAS, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya (Moscow, Russia)

Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Aleksandr N. Mironov, Dr. Sci. (Med.), Prof., National Agency of Medicines (Moscow, Russia)

Vyacheslav D. Mosyagin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch of the Military Medical Academy in Moscow (Moscow, Russia)

Oxana A. Svitich, Dr. Sci. (Med.), Acad. RAS, I. Mechnikov Research Institute of Vaccine and Sera (Moscow, Russia)

Elena Smith, Cand. Sci. (Biol.), Sanofi's mRNA Center of Excellence (Waltham, Massachusetts, United States)

Igor O. Stoma, Dr. Sc. (Med.), Prof., Branch of the National Research Centre "Kurchatov Institute" in the Republic of Belarus (Minsk, Republic of Belarus)

Olga V. Fadeikina, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., GENERIUM JSC (Volginsky, Vladimir Region, Russia)

Alexandr V. Shustov, Cand. Sci. (Biol.), National Center for Biotechnology (Astana, Kazakhstan)

Founder and publisher

Federal State Budgetary Institution
"Scientific Centre for Expert Evaluation
of Medicinal Products" of the Ministry
of Health of the Russian Federation

Managing Editor

Olga F. Fedotova
+7 (495) 121-06-00 (63-05)

Fedotovaof@expmed.ru

Guest Editor for the Special Issue

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof.

Science Editors

Nadezhda V. Gukasova, Cand. Sci. (Biol.)
Pavel V. Ershov, Cand. Sci. (Biol.)

Editor

Sergey A. Kalinichev, Cand. Sci. (Pharm.)

Translation Editor

Tatyana P. Malinovskaya

Development Manager

Alexander A. Mzhelsky

Postal address of the founder, publisher, and editorial office

8/2 Petrovsky Blvd., Moscow 127051

Tel.: +7 (499) 190-18-18

(63-42, 63-02, 63-35)

biopreparaty@expmed.ru

Contract publisher

NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St.,
Moscow 115114

Printing office

Triada Publishing House LLC:
9 Tchaikovsky Ave., office 514,
Tver 170034

Print run

50 copies. Free price

Passed for printing

September 29, 2026

Date of publication

October 12, 2026

Subscription codes

Pressa Rossii catalogue: 57941

Ural-Press agency catalogue: 57941

The journal is registered as a mass
medium by the Federal Service for
Supervision of Communications,
Information Technologies and Mass
Communications. Certificate PI
No. FS77-82918 dated March 14, 2022

© Compilation, design. Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal
Products, 2026

CONTENTS

Issue topic

mRNA TECHNOLOGIES IN BIOMEDICINE: CURRENT ADVANCES AND REGULATORY PRACTICE

N.S. Pokrovsky, E.V. Melnikova, V.A. Merkulov

**Criteria for the application of the platform approach
for mRNA vaccines and gene therapy products in regulatory practice247**

G.N. Engalycheva, R.D. Syubaev, A.A. Berchatova, O.V. Astapova,
D.V. Goryachev, V.A. Merkulov

**Oligonucleotide-based medicinal products: A review of current
regulatory requirements for preclinical studies262**

V.R. Litvinova, A.S. Gudymo, V.A. Yakovlev, M.B. Borgoyakova,
E.V. Starostina, E.V. Yakovleva, K.I. Ivanova, O.N. Perfilova, K.P. Makarova,
D.I. Vahitov, N.V. Danilchenko, M.L. Egorova, N.N. Vasiltsova, S.V. Sharabrin,
N.B. Rudometova, D.N. Kisakov, L.A. Kisakova, T.N. Ilyicheva,
V.Yu. Marchenko, L.I. Karpenko, A.A. Ilyichev, A.P. Rudometov

**Administration of the mRNA-H5 vaccine to ferrets via jet injection
provides protective immunity against the H5N1 influenza virus276**

M.B. Borgoyakova, A.P. Rudometov, S.V. Sharabrin, E.V. Starostina,
V.A. Yakovlev, E.V. Yakovleva, D.I. Vahitov, A.V. Zaykovskaya, L.A. Kisakova,
D.N. Kisakov, K.P. Makarova, E.V. Dmitrienko, L.I. Karpenko, A.A. Ilyichev

**A two-component mRNA vaccine combining B-cell and T-cell
immunogens of SARS-CoV-2 induces humoral and cellular immune
responses in mice287**

S.V. Sharabrin, S.I. Krasnikova, D.N. Kisakov, L.A. Kisakova, E.V. Starostina,
M.B. Borgoyakova, V.R. Litvinova, V.A. Yakovlev, E.V. Yakovleva, K.I. Ivanova,
A.A. Bondar, K.P. Makarova, D.I. Vahitov, E.A. Volosnikova, A.P. Rudometov,
A.A. Ilyichev, L.I. Karpenko

**Structural and functional stability of lyophilized nonencapsulated
mRNA synthesized *in vitro* during long-term storage299**

A.Yu. Butirskiy, A.S. Korovkin, D.V. Gorenkov, V.A. Merkulov

**mRNA vaccines for the prevention of infectious diseases: A review
of international experience in evaluating efficacy and safety
based on clinical trial results311**

VACCINE PROPHYLAXIS AGAINST INFECTIOUS DISEASES

R.D. Theodorovich, T.K. Dzagurova, S.S. Kurashova, M.S. Egorova,
N.A. Korotina, M.V. Balovneva, A.A. Ishmukhametov

**Vaccines for the prevention of hantavirus fevers: An overview
of results and development prospects324**

STANDARDIZATION AND QUALITY CONTROL

A.I. Zheltukhina, A.B. Komissarov, A.V. Fadeev, N.D. Yolshin, M.M. Pisareva,
V.A. Eder, M.Korzhanova, A.D. Ksenafontov, A.A. Perederiy, O.V. Ohlopko,
L.A. Saushkina, E.V. Shvedova, E.A. Grishina, D.A. Lioznov

**Genetic characterization of production strains of measles, rubella,
and mumps viruses by high-throughput sequencing336**

N.N. Savina, M.Sh. Aliev, A.I. Reutskiy, T.V. Gorokhova, O.S. Babkina,
S.V. Pankratov, N.Yu. Serova

**Inactivation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*
during influenza vaccine production349**

CLARIFICATIONS OF REGULATORY REQUIREMENTS AND NORMATIVE ACTS

E.V. Melnikova

Quality control of mRNA vaccines: recommendations for manufacturers359

УДК 615.012.6:615.37:602.6

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-247-261>

Обзор | Review



Критерии применения платформенного подхода для мРНК-вакцин и генотерапевтических лекарственных препаратов в регуляторной практике

Н.С. Покровский^{1,✉} , Е.В. Мельникова¹ , В.А. Меркулов^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Покровский Никита Станиславович; pokrovskyns@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Платформенный подход, предполагающий использование неизменного производственного процесса и унифицированных методик контроля качества, признан ведущими регуляторными органами, включая Управление по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств (FDA) и Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA), эффективным инструментом ускорения вывода на рынок инновационных препаратов – мРНК-вакцин и генотерапевтических лекарственных препаратов (ГТЛП). Для Российской Федерации и стран Евразийского экономического союза (ЕАЭС) актуально внедрение данной концепции, что позволит ускорить фармацевтическую разработку, оптимизировать контроль качества и валидацию процессов производства, а также экспертную оценку при регистрации таких препаратов.

ЦЕЛЬ. Проанализировать международные регуляторные подходы к применению платформенных технологий в производстве и контроле качества мРНК-вакцин и ГТЛП на основе вирусных векторов и систем редактирования генома для обоснования их внедрения в национальное законодательство и нормативную документацию Российской Федерации и ЕАЭС.

ОБСУЖДЕНИЕ. Проанализированы публикации (2015–2025 гг.) в PubMed, Google Scholar, eLIBRARY.RU и материалы регуляторных органов (FDA, EMA, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (ICH), Агентство по регулированию лекарственных средств и изделий медицинского назначения Великобритании, Агентство по фармацевтическим препаратам и медицинским изделиям Японии (PMDA)), посвященные применению платформенных технологий в производстве и контроле качества лекарственных препаратов. Установлено отсутствие в нормативной документации Российской Федерации и ЕАЭС критериев применения платформенного подхода для мРНК-вакцин и ГТЛП, что затрудняет ускоренное внедрение в клиническую практику инновационных персонализированных препаратов. Показано, что международные регуляторные подходы (FDA, EMA, PMDA) позволяют ускорить разработку и валидацию процесса производства, а также сократить объем доклинических и клинических исследований за счет повторного использования данных о ранее произведенных и одобренных препаратах (данные о процессе производства, профиле безопасности для мРНК-вакцин и ГТЛП). Основными нерешенными вопросами остаются объем подтверждающих данных и необходимость наличия первого одобренного продукта для присвоения статуса

платформенной технологии. Обоснована необходимость разработки унифицированных нормативных требований к релевантному опыту и валидации процессов, позволяющих реализовать преимущества платформенного подхода при сохранении высокого уровня безопасности и эффективности лекарственных препаратов в рамках экспертных процедур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Платформенный подход, основанный на неизменном производственном процессе и унифицированных методиках контроля качества, позволяет ускорить фармацевтическую разработку, сократить объем доклинических и клинических исследований и оптимизировать экспертную оценку мРНК-вакцин и ГТЛП. Для внедрения данного подхода в Российской Федерации и ЕАЭС необходимо предусмотреть в нормативной документации возможность использования стандартизированных модулей в рамках единой технологической платформы, что ускорит разработку и вывод на рынок ГТЛП и персонализированных продуктов, а также повысит их экономическую доступность.

Ключевые слова: платформенные технологии; мРНК-вакцины; генотерапевтические препараты; липидные наночастицы; вирусные векторы; контроль качества; регистрация лекарственных средств

Для цитирования: Покровский Н.С., Мельникова Е.В., Меркулов В.А. Критерии применения платформенного подхода для мРНК-вакцин и генотерапевтических лекарственных препаратов в регуляторной практике. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(3):247–261. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-247-261>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00061-26-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200093-9).

Потенциальный конфликт интересов. Е.В. Мельникова является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2025 г. В.А. Меркулов — главный редактор журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2021 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Criteria for the application of the platform approach for mRNA vaccines and gene therapy products in regulatory practice

Nikita S. Pokrovsky¹, Ekaterina V. Melnikova¹, Vadim A. Merkulov^{1,2}

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd., Moscow 127051, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Nikita S. Pokrovsky; pokrovskyns@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The platform approach, which involves the use of an unchanged manufacturing process and standardized quality control methods, is recognized by leading regulatory authorities, such as the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA), as an effective tool for accelerating market entry of innovative products, namely mRNA vaccines and gene therapy products. In this context, the implementation of this concept is relevant for the Russian Federation and the countries of the Eurasian Economic Union (EAEU), as it would accelerate pharmaceutical development, optimize quality control and process validation, and improve regulatory review during the registration of such products.

AIM. This study aimed to analyze international regulatory approaches to the application of platform technologies in the manufacturing and quality control of mRNA vaccines and gene therapy products based on viral vectors and genome editing systems, in order to provide a rationale for their implementation in the national legislation and regulatory documentation of the Russian Federation and the EAEU.

DISCUSSION. An analysis of publications from 2015 to 2025 in the PubMed, Google Scholar, and eLIBRARY.ru databases, as well as official documents from regulatory authorities,

including the FDA, the EMA, the World Health Organization (WHO), the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, and the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), addressing the application of platform technologies in the manufacturing and quality control of medicinal products, was performed. It was found that the regulatory documentation of the Russian Federation and the EAEU lacks criteria for applying the platform approach to mRNA vaccines and gene therapy products, which hinders the accelerated introduction of innovative personalized medicinal products into clinical practice. International regulatory approaches (FDA, EMA, PMDA) were shown to accelerate development and process validation, and reduce the scope of preclinical studies and clinical trials through the reuse of data on previously manufactured and approved products (including data on the manufacturing process and safety profiles for mRNA vaccines and gene therapy products). The main unresolved issues remain the amount of supporting data and the need for a first approved product before platform technology status can be granted. The need to develop unified regulatory requirements for relevant experience and process validation was substantiated, which would allow the benefits of the platform approach to be realized while maintaining a high level of safety and efficacy of medicinal products during regulatory review.

CONCLUSIONS. The platform approach, based on an unchanged manufacturing process and standardized quality control methods, can accelerate pharmaceutical development, reduce the extent of preclinical studies and clinical trials, and optimize the regulatory review of mRNA vaccines and gene therapy products. To implement this approach in the Russian Federation and the EAEU, it is necessary to incorporate provisions into the regulatory documentation allowing the use of standardized modules within a single technological platform, which would accelerate the development and market launch of gene therapy products and personalized products, and increase their affordability.

Keywords: platform technologies; mRNA vaccines; gene therapy products; lipid nanoparticles; viral vectors; quality control; medicinal product registration

For citation: Pokrovsky N.S., Melnikova E.V., Merkulov V.A. Criteria for the application of the platform approach for mRNA vaccines and gene therapy products in regulatory practice. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(3):247–261. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-247-261>

Funding. This study was conducted at the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of State Assignment No. 056-00061-26-00 for applied scientific research (R&D state registration No. 124022200093-9).

Disclosure. E.V. Melnikova has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2025. V.A. Merkulov has been the Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021. The remaining author declares no conflicts of interest.

ВВЕДЕНИЕ

В современной фармацевтической отрасли платформенный подход, основанный на унифицированных производственных процессах и методиках контроля качества лекарственных препаратов (ЛП), рассматривается как инструмент сокращения сроков разработки инновационных препаратов, повышения их доступности и снижения регуляторной нагрузки. Платформенные технологии (ПТ) определяются как технологии, применимые для производства и контроля качества нескольких ЛП с использованием унифицированных методик, что потенциально может повысить эффективность разработки, производства и экспертной оценки при регистрации ЛП [1].

Ведущие регуляторные органы – Управление по контролю за качеством продуктов пита-

ния и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) и Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA), а также Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ), Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use, ICH), Альянс по регенеративной медицине (Alliance for regenerative medicine, ARM) – относят к перспективным направлениям внедрение ПТ в производство моноклональных антител, мРНК-вакцин, включая терапевтические на основе липидных наночастиц (ЛНЧ), генотерапевтических лекарственных препаратов (ГТЛП) на основе вирусных векторов и систем редактирования генома, *ex vivo* ГТЛП, а также

синтетических олигонуклеотидов, инкапсулированных в ЛНЧ¹ [2].

Внедрение ПТ предполагает использование знаний и методов, полученных при разработке предыдущих продуктов, для создания новых ЛП, например, при масштабировании производства, валидации процессов и методик контроля качества, исследовании стабильности. Такой подход особенно актуален для персонализированных ГТЛП при наличии неудовлетворенной медицинской потребности², быстропрогрессирующих и/или приводящих к летальному исходу заболеваний (генетические нарушения, злокачественные новообразования), а также для оперативного реагирования на новые патогены, что подтверждено опытом пандемии COVID-19 [3–8].

В настоящее время изменения в нормативных правовых актах относительно внедрения ПТ обсуждаются международными организациями (ВОЗ, ICH, ARM) и регуляторными органами — FDA, EMA и Агентством по фармацевтическим препаратам и медицинским изделиям Японии (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, PMDA)³ [3]. EMA и FDA рассматривают изменения в нормативных документах, касающихся аспектов: разработки, экспертизы и регистрации ЛП,

произведенных с помощью ПТ; введения особого статуса ПТ (FDA); возможности регистрации ЛП с постоянным и переменным компонентами (EMA); использования данных по первому одобренному ЛП для сокращения объема информации по последующим препаратам при экспертизе (PMDA). К ограничениям относятся неясный объем подтверждающих данных, необходимость первого одобренного продукта и отсутствие унификации требований для разных типов препаратов (мРНК-вакцин, ГТЛП).

Согласно Указу Президента Российской Федерации платформы нового поколения для биотехнологических, высокотехнологичных и радиофармацевтических ЛП имеют высокую приоритетность и относятся к критическим технологиям⁴. Однако в нормативной документации Российской Федерации и ЕАЭС отсутствуют критерии применения ПТ для мРНК-вакцин и ГТЛП (включая персонализированные)⁵, что затрудняет их ускоренную регистрацию и клиническое внедрение, особенно при необходимости быстрой адаптации существующей технологии. Для практической реализации такого подхода необходимы регуляторные решения по нормативному закреплению возможности применения ПТ.

¹ Unlocking the potential of building blocks to expedite cell and gene therapy development: Takeaways from a scientific exchange between FDA, industry, and independent experts. ARM. 2024.

Committee for Advanced Therapies workshop on gene editing. Leveraging data via platform principles in gene editing. EMA. 2025.

Committee for Advanced Therapies workshop on gene editing. Modular platform for in vivo LNP formulated prime editors targeting rare genetic diseases of the liver. EMA. 2025.

Recommendations with regard to future Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs) related guidelines. ICH. 2025.

Platform technology designation program for drug development. FDA. 2024.

mRNA Technology Transfer Programme moves to the next phase of its development. WHO. 2023.

² Под «неудовлетворенными медицинскими потребностями» в данном случае понимается состояние, для которого в Евразийском экономическом союзе нет одобренного уполномоченными органами разрешенного и признанного эффективно метода диагностики, профилактики или лечения. Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

³ Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations. WHO. 2021.

Recommendations with regard to future ATMP related guidelines. ICH. 2025.

Proposal for a directive of the European Parliament and of the Council on the Union code relating to medicinal products for human use, and repealing Directive 2001/83/EC and Directive 2009/35/EC. European Commission. 2023.

Platform technology designation program for drug development. FDA. 2024.

Unlocking the potential of building blocks to expedite cell and gene therapy development: Takeaways from a scientific exchange between FDA, industry, and independent experts. ARM. 2024.

Human medicines modular manufacture and point of care regulations 2025. MHRA. 2025.

⁴ Указ Президента Российской Федерации от 18.06.2024 № 529 «Об утверждении приоритетных направлений научно-технологического развития и перечня важнейших наукоемких технологий».

⁵ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».

Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

Постановление Правительства Российской Федерации от 28.03.2024 № 384 «Об утверждении Правил обращения биомедицинских клеточных продуктов, предназначенных для исполнения индивидуального медицинского назначения...».

Постановление Правительства Российской Федерации от 28.03.2024 № 385 «Об утверждении Правил предоставления, подтверждения и отмены разрешения на производство и применение биомедицинских клеточных продуктов, предназначенных для исполнения индивидуального медицинского назначения».

Постановление Правительства Российской Федерации от 24.02.2025 № 213 «О биотехнологических лекарственных препаратах, предназначенных для применения в соответствии с индивидуальным медицинским назначением...».

Актуальной проблемой остается нормативное регулирование использования ПТ на всех этапах разработки, производства, контроля качества и регуляторного рассмотрения инновационных ЛП для ускорения их доступности пациентам, особенно при неудовлетворенной медицинской потребности. Ключевым элементом предлагаемой концепции является адаптация нормативно-правовых актов на национальном и наднациональном (ЕАЭС) уровнях с конкретизацией требований к компонентам ЛП (постоянным и переменным), технологии производства и механизмам экспертной оценки данных ЛП, разработанных с использованием ПТ.

Новизна работы заключается в разработке системного подхода к регулированию ПТ для мРНК-вакцин и ГТЛП, впервые предлагаемого для российской и евразийской регуляторной практики.

Цель работы — проанализировать международные регуляторные подходы к применению платформенных технологий в производстве и контроле качества мРНК-вакцин и ГТЛП на основе вирусных векторов и систем редактирования генома для обоснования их внедрения в национальное законодательство и нормативную документацию Российской Федерации и ЕАЭС.

Поиск информации проводился в базах данных PubMed, Google Scholar, eLIBRARY.RU, а также на официальных сайтах регуляторных органов (FDA, EMA, PMDA, MHRA) и международных организаций (WHO, ICH, ARM) за период 2015–2025 гг. Ключевые слова для проведения поиска: «платформенная технология», «платформенный подход», «мРНК-вакцина», «контроль качества», «нормативная документация», «platform technology», «platform approaches», «mRNA vaccines», «gene therapy», «quality control».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Международные подходы к внедрению платформенных технологий

Рекомендации ВОЗ

Эксперты Комитета ВОЗ по биологической стандартизации рассматривают производство

профилактических мРНК-вакцин как наиболее перспективное направление применения ПТ. Для ПТ производства мРНК-вакцин против инфекционных заболеваний определены следующие аспекты: неизменность технологического процесса (допускается оптимизация для каждой кандидатной вакцины), методик контроля качества (за исключением идентичности, активности и стабильности), критериев приемлемости, а также элементов, обуславливающих иммунный ответ; при этом производство должно соответствовать требованиям GMP. Помимо данных о производстве, контроле качества, валидации методик контроля качества, стабильности, допускается использование ранее полученных доклинических и клинических данных по безопасным и переносимым дозам для начала клинических исследований новой вакцины-кандидата⁶.

Подходы ICH

В Руководстве ICH Q11 (2012 г.) указана возможность использования ПТ при разработке и производстве ЛП, а также применения концепции проектного пространства (Design space)⁷. В руководствах ICH предусмотрены платформенные аналитические методики и подходы к их валидации, а также экстраполяция ранее полученных знаний для оценки элиминации вирусов при разработке аналогичных продуктов на основе хорошо охарактеризованных процессов, в том числе для генетически модифицированных вирусных векторов⁸. Для гармонизации подходов к разработке и производству препаратов генной и клеточной терапии ПТ будут рассмотрены в новом приложении к ICH Q11⁹.

Пересмотр регуляторных норм ЕМА

ЕМА в настоящее время пересматривает регулирование ЛП с целью создания гибкой нормативной базы для поддержки инноваций. Подготовлен проект Директивы¹⁰, который заменит основные действующие

⁶ Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations. WHO. 2021.

⁷ ICH Guideline Q11 on development and manufacture of drug substances (chemical entities and biotechnological/biological entities) (EMA/CHMP/ICH/425213/2011). EMA. 2012.

⁸ ICH Q2 (R2) Guideline on validation of analytical procedures (EMA/CHMP/ICH/82072/2006). EMA. 2024.

ICH Q14 Guideline on analytical procedure development (EMA/CHMP/ICH/195040/2022). EMA. 2024.

ICH Q5A (R2) Guideline on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin (EMA/CHMP/ICH/804363/2022). EMA. 2024.

⁹ Recommendations with regard to future ATMP related guidelines. ICH. 2025.

¹⁰ Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council on the Union code relating to medicinal products for human use, and repealing Directive 2001/83/EC and Directive 2009/35/EC. European Commission. 2023.

акты¹¹, регламентирующие получение разрешения на продажу ЛП (marketing authorization). Проект направлен на устранение пробелов с учетом научно-технических достижений и развития персонализированной медицины (малосерийные препараты, изготовление ЛП непосредственно «у постели пациента», персонализированные ЛП без промышленного производства). Проект Директивы предусматривает в исключительных случаях возможность получения разрешения на препарат, состоящий из постоянного и переменного компонентов, при этом переменный компонент определяется генетическим тестированием пациента или особенностями возбудителя инфекционного заболевания и обеспечивает активность против разных штаммов либо адаптируется к характеристикам конкретного пациента или группы пациентов. Вводится понятие мастер-файла ПТ и сертификата основного мастер-файла; требования к содержанию и формату заявки будут определены позднее.

Законодательные решения FDA

В 2023 г. FDA был разработан проект Руководства по присвоению статуса ПТ (platform technology designation)¹², ориентированного преимущественно на препараты генной и клеточной терапии редких генетических заболеваний (в малых группах пациентов или в единичных случаях). Присвоение статуса позволяет разработчику повторно использовать отдельные элементы технологии ранее одобренного продукта для ускорения разработки других продуктов (рис. 1).

Оценка возможности применения ПТ основывается на структурном сходстве лекарственных средств / активных веществ (последовательности нуклеиновых кислот сопоставимого размера и структуры), минимальных качественных и количественных различиях в составе ЛП, а также практически идентичных процессах производства и очистки (рис. 2).

Одним из недостатков проекта Руководства является требование о наличии уже одобренного продукта для получения статуса ПТ, тогда как многие разработчики препаратов генной и клеточной терапии представляют собой

небольшие компании или исследовательские организации, часто осуществляющие децентрализованное производство инновационных препаратов, не требующих регистрации, и у которых может не быть зарегистрированных препаратов. Для таких разработчиков важно понимать, как применять принципы ПТ на начальном этапе программы, чтобы упростить присвоение статуса ПТ после одобрения первых продуктов¹³. Другим недостатком является неопределенность в отношении учета релевантного опыта и экстраполяции ранее полученных данных при разработке и производстве аналогичного препарата (например, при сокращении объема валидации процессов, методик контроля качества и исследований стабильности)¹⁴.

Альянс по регенеративной медицине

В рамках обсуждения проекта Руководства FDA в ARM рассматривались подходы к применению ПТ для ЛНЧ, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и аденоассоциированных вирусных векторов. Были отмечены два ключевых аспекта:

- необходимость использования единообразных и хорошо охарактеризованных исходных материалов и стандартных образцов;
- перспективность применения базовых аналитических методик контроля качества для различных продуктов при условии постоянства факторов, влияющих на результаты анализа (состав, условия хранения).

Кроме того, отмечено, что, помимо схожих технологических решений и производственных процессов для продуктов и производственных площадок, ПТ должна включать идентичную вспомогательную инфраструктуру – информационные технологии и логистику¹⁵.

Подходы MHRA

В Агентстве по регулированию лекарственных средств и изделий медицинского назначения Великобритании (Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, MHRA) в 2025 г. вступили в силу изменения, разрешающие модульное производство ЛП (включая мобильное производство)¹⁶. Однако акцент сделан

¹¹ Directive 2009/35/EC of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the colouring matters which may be added to medicinal products. Official Journal of the European Union. 2009.

Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. Official Journal of the European Union. 2001.

¹² Platform technology designation program for drug development. FDA. 2024.

¹³ Там же.

¹⁴ Там же.

¹⁵ Unlocking the potential of building blocks to expedite cell and gene therapy development: Takeaways from a scientific exchange between FDA, industry, and independent experts. ARM. 2024.

¹⁶ Human medicines modular manufacture and point of care regulations 2025. MHRA. 2025.

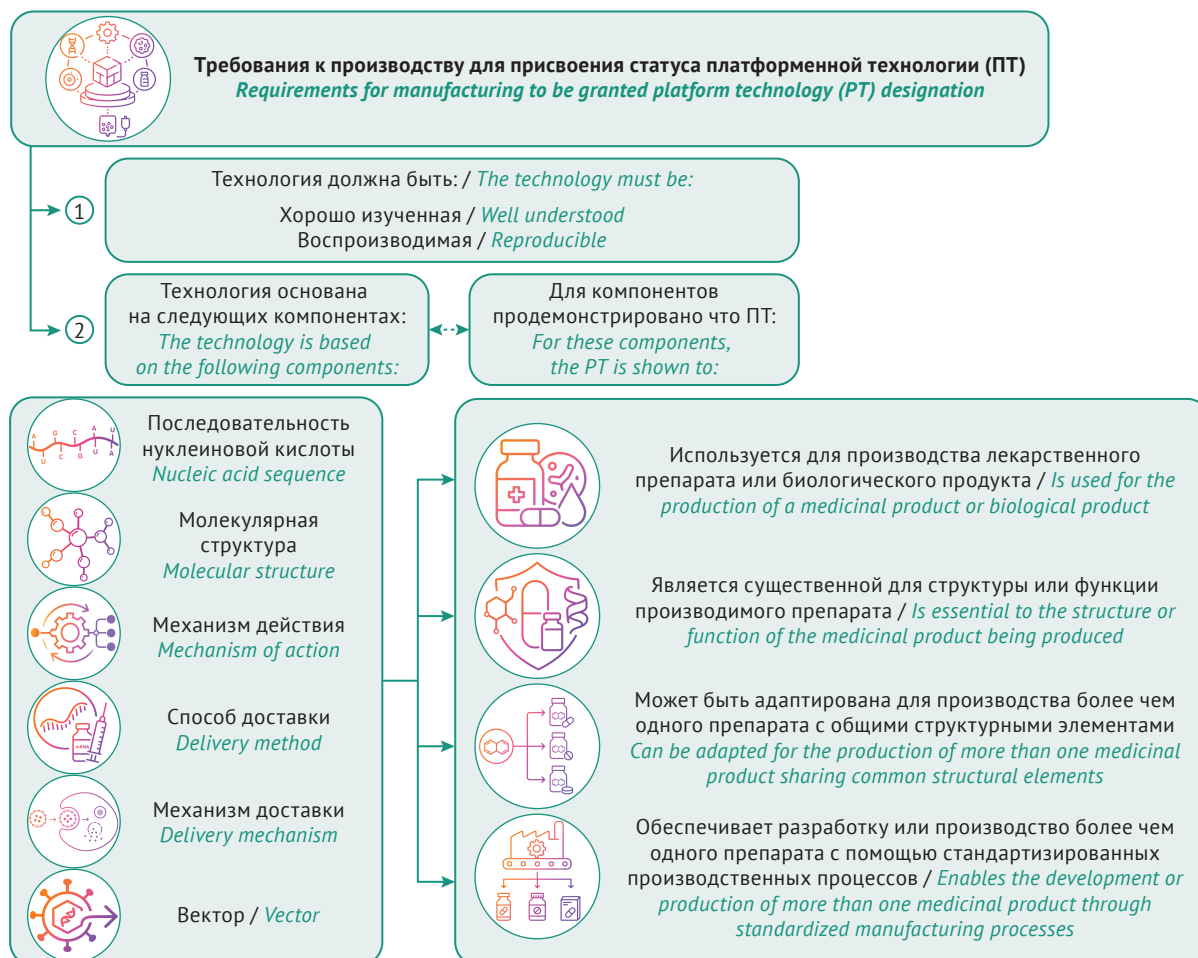


Рисунок подготовлен авторами по данным руководства FDA¹⁷, отдельные элементы визуализации выполнены с использованием инструментов ChatGPT / The figure was prepared by the authors based on FDA guidance¹⁷, with certain visualization elements created using ChatGPT tools

Рис. 1. Основные критерии программы FDA по присвоению статуса платформенной технологии (ПТ) для разработки лекарственных препаратов.

Fig. 1. Key criteria for the FDA platform technology (PT) designation program for the development of medicinal products.

не на ПТ для производства нескольких препаратов, а на мобильное перемещение технологического модуля для производства конкретного лицензированного препарата на различные фармацевтические предприятия или медицинские учреждения. Мастер-файл такого модуля включается в состав досье на препарат.

Опыт PMDA

Опыт применения платформенного подхода в разработке и экспертной оценке наиболее показательным продемонстрирован на примере производства вакцин против COVID-19 [1]. В отчете PMDA (Япония) [3] представлены случаи применения ПТ при одобрении вакцин в период пандемии (табл. 1). Признание результатов для вновь разрабатываемых вакцин,

произведенных по ПТ (включая часть доклинических и клинических исследований), проводилось в условиях чрезвычайной ситуации (пандемия) и, по мнению экспертов PMDA, может служить основой для введения подобной практики.

Таким образом, рассмотренные регуляторные подходы по внедрению ПТ в разработку ЛП свидетельствуют о повышенном интересе к данной проблеме в контексте ускорения доступа пациентов с неудовлетворенной медицинской потребностью к терапии инновационными препаратами: мРНК-вакцинами, ГТЛП на основе вирусных векторов и систем редактирования генома, олигонуклеотидами в составе ЛНЧ. Предполагаемые нормативные изменения затрагивают следующие аспекты: процедуру

¹⁷ Platform technology designation program for drug development. FDA. 2024.

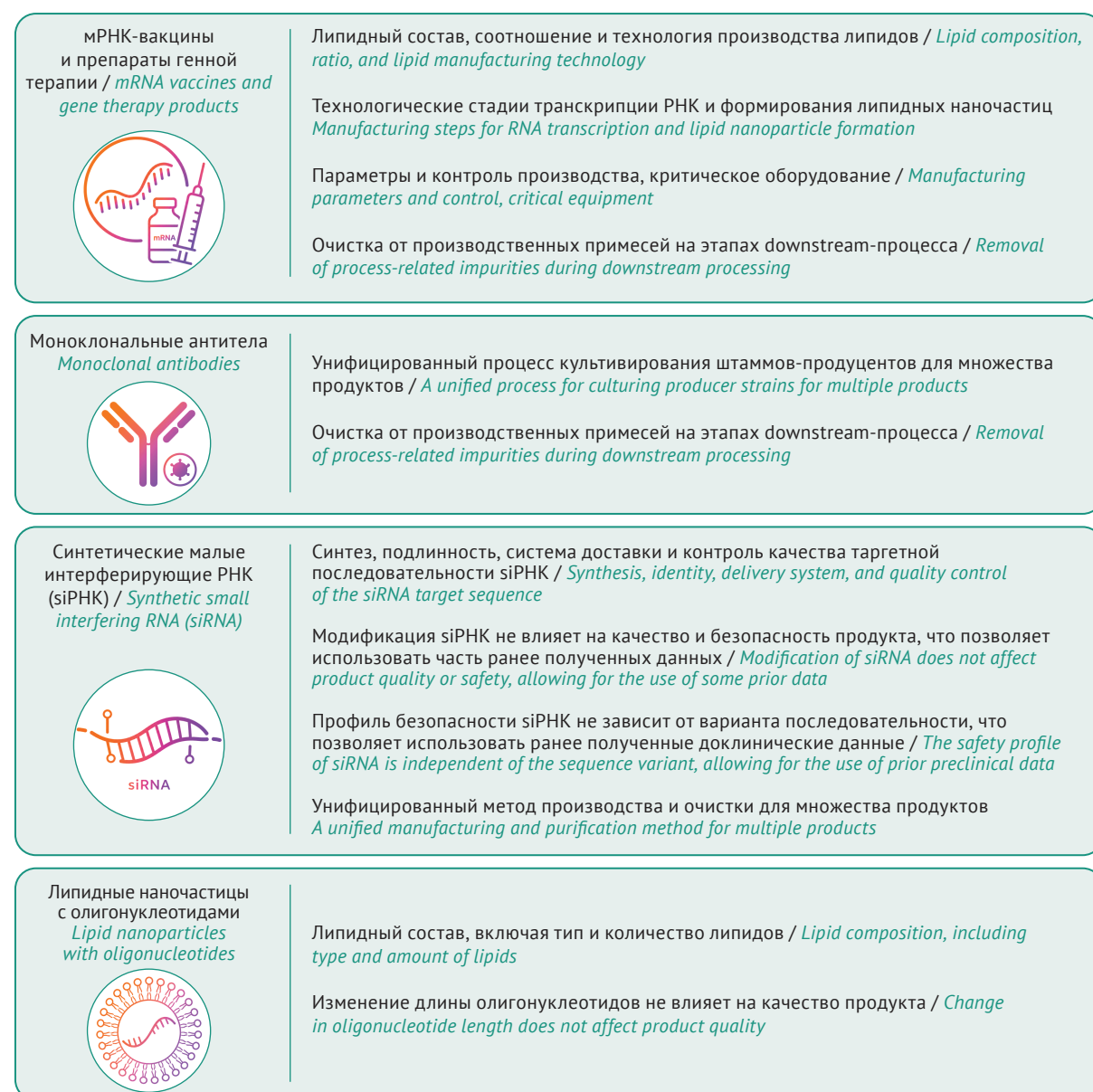


Рисунок подготовлен авторами по данным руководства FDA¹⁸, отдельные элементы визуализации выполнены с использованием инструментов ChatGPT / The figure was prepared by the authors based on FDA guidance¹⁸, with certain visualization elements created using ChatGPT tools

Рис. 2. Примеры платформенных технологий для лекарственных препаратов и их ключевые элементы (согласно программе FDA).

Fig. 2. Examples of platform technologies for medicinal products and their key elements (according to the FDA program).

разработки препаратов — критерии ПТ производства, определение ключевых элементов ПТ в зависимости от типа препарата, введение особого статуса ПТ, возможность регистрации препарата с постоянным и переменным компонентами; экспертную оценку — использование данных по первому одобренному ЛП для сокращения объема данных для последующих препаратов. Однако важным остается вопрос об объеме и характере данных, применимых для других препаратов в рамках ПТ, а также о научных критериях,

необходимых для эффективного применения платформенного подхода к регистрации ЛП.

Научные принципы платформенного подхода к производству и контролю качества лекарственных препаратов

В основе дизайна и разработки ПТ для производства лежит научный подход, позволяющий создавать гибкую и адаптивную модульную систему масштабируемого производства ЛП при сохранении их качества [9]. Это позволяет

¹⁸ Platform technology designation program for drug development. FDA. 2024.

Таблица 1. Применение платформенной технологии (ПТ) для ускоренной регистрации вакцин в Японии [3]

Table 1. Application of platform technology (PT) for accelerated vaccine registration in Japan [3]

Год Year	Описание этапа разработки/регистрационной процедуры Description of development/registration stage	Принцип платформенного подхода Principles of the platform approach	Результат применения платформенного подхода Results of applying the platform approach
2020	Первые клинические исследования вакцин против COVID-19 в условиях пандемии <i>First clinical trials of COVID-19 vaccines during the pandemic</i>	- Исследования биораспределения могут не проводиться при наличии данных для других вакцин, произведенных по той же технологии. - Доклинические исследования новой вакцины допустимо проводить параллельно с клиническими, если безопасность подтверждена данными для других вакцин, произведенных по той же технологии. - <i>Biodistribution studies may not be necessary if data are available for other vaccines produced using the same technology.</i> - <i>Preclinical studies of a new vaccine may be conducted in parallel with clinical trials if safety is confirmed by data for other vaccines produced using the same technology</i>	Демонстрация гибкого научно обоснованного подхода в чрезвычайных ситуациях для ускорения разработки при сохранении стандартов безопасности <i>Demonstration of a flexible, science-based approach in emergency situations to accelerate development while maintaining safety standards</i>
2021	Одобрение первых вакцин (Comirnaty, Spikevax, Vaxzevria) в Японии по экстренной процедуре <i>Approval of the first vaccines (Comirnaty, Spikevax, Vaxzevria) in Japan under an emergency approval procedure</i>	- Фармакокинетика и токсикология отдельно не исследовались для экспертной оценки. - Биораспределение оценивалось на основе данных препаратов, ранее произведенных по ПТ (мРНК в липидных наночастицах или вирусные векторы) - <i>Pharmacokinetics and toxicological studies were not conducted separately for the expert review.</i> - <i>Biodistribution was assessed based on data on medicinal products previously manufactured using platform technology (mRNA in lipid nanoparticles or viral vectors)</i>	Научно-регуляторное обоснование базировалось на имеющихся данных о ПТ с учетом чрезвычайной ситуации (пандемия) <i>The scientific regulatory rationale was based on available data on platform technology, taking into account the emergency situation (pandemic)</i>
2021	Появление новых вариантов SARS-CoV-2 и обновление вакцинных штаммов <i>Emergence of new variants of SARS-CoV-2 and update of vaccine strains</i>	- Сравнительная оценка качества исходной и новой вакцин, подтверждение аналогичной стабильности. - Новые доклинические исследования не требовались. - В клинических исследованиях оценивалась не меньшая эффективность, иммуногенность и безопасность - <i>Comparative quality assessment of the original and new vaccines, confirming comparable stability.</i> - <i>New preclinical studies were not required.</i> - <i>Clinical trials assessed non-inferior efficacy, immunogenicity, and safety</i>	Платформенный подход ускорил разработку вакцин против новых штаммов на основе ранее установленных параметров ПТ <i>The platform approach accelerated the development of vaccines against new strains based on previously established parameters of platform technology</i>
2022	Смена доминирующего субварианта с омикрон BA.1 на BA.4/5 в ходе разработки вакцины <i>Change of the dominant subvariant from Omicron BA.1 to BA.4/5 during vaccine development</i>	- Экстраполяция ранее полученных данных (включая клинические) для варианта BA.1 на вариант BA.4/5 вследствие отсутствия значимых антигенных различий. - Дополнительные клинические данные запрашивались регуляторным органом после регистрации - <i>Extrapolation of previously obtained data (including clinical) for the BA.1 variant to the BA.4/5 variant due to the absence of significant antigenic differences.</i> - <i>Additional clinical data were requested by the regulatory authority after registration</i>	Демонстрация регуляторной адаптивности при оценке регистрационного досье препарата, произведенного по ПТ, для оперативного реагирования на быстро меняющуюся эпидемиологическую ситуацию <i>Demonstration of regulatory adaptability when evaluating registration dossier for a product manufactured using platform technology, to quickly respond to a rapidly changing epidemiological situation</i>

Таблица составлена авторами по данным источника [3] / The table was prepared by the authors based on data from source [3]

ускорить разработку ЛП, снижает их производственную стоимость для ряда гематологических, генетических, метаболических и онкологических заболеваний и способствует более быстрому выводу на рынок.

Платформенные подходы к производству можно представить, как поэтапный процесс¹⁹.

Разработка ПТ начинается с определения ключевых постоянных компонентов ЛП (векторы для доставки, системы редактирования, производственные процессы), разработки первого препарата, характеристики его качества и полной оценки эффективности и безопасности в доклинических и клинических исследованиях.

¹⁹ Unlocking the potential of building blocks to expedite cell and gene therapy development: Takeaways from a scientific exchange between FDA, industry, and independent experts. ARM. 2024.

Этот этап позволяет создавать ЛП для определенного варианта заболевания и служит фундаментом для дальнейшего развития ПТ. На втором этапе объем разработки ЛП расширяется на основе данных первого этапа с учетом различных вариантов заболевания (например, другие генетические мутации или штаммы возбудителя), что уже не требует полного набора данных исследования. Финальный этап направлен на изучение переменного компонента (например, мутаций генов, обуславливающих одно и то же заболевание/синдром, либо клеток одного и того же типа от разных пациентов) [2].

Даже при использовании ПТ сокращение объема клинических исследований возможно не всегда, в отличие от оценки показателей качества, доклинических исследований фармакокинетики или фармакодинамики, где применение ПТ позволяет сократить сроки и стоимость производства (при условии хорошо охарактеризованного профиля безопасности).

Платформенный подход в производстве мРНК-препаратов

Производство ЛП на основе мРНК, включенных в ЛНЧ, можно рассматривать как ПТ, поскольку процессы разработки, производства и контроля качества для таких препаратов схожи для разных заболеваний [1, 10–13]. Сложность создания универсальных терапевтических мРНК-вакцин для лечения онкологических заболеваний обусловлена гетерогенностью опухолевых антигенов, что требует идентификации мишеней у конкретного пациента. Однако изготовление и контроль качества таких вакцин проводятся по единой технологической схеме; переменным компонентом является лишь последовательность мРНК, синтезированная на основе генетических исследований конкретного пациента. Постоянным компонентом таких препаратов может служить система доставки на основе одинаковой композиции ЛНЧ, поскольку различия в мРНК-последовательностях не влияют на качество готового препарата [5].

Возможность рассматривать группу мРНК-препаратов в качестве ПТ зависит от объема накопленных данных о качестве, эффективности и безопасности для ранее произведенных препаратов по этой технологии. В исследовании J.H. Skerritt с соавт. [1] на основе опыта компании Moderna представлены рекомендации по модификации нормативных подходов к разработке мРНК-препаратов для ускорения всех этапов производства. «Платформенными» модулями

для мРНК препаратов могут быть: оптимизация кодонов, регуляторные элементы плазмиды, состав ЛНЧ; данные компоненты не подвергаются значительным изменениям в рамках разработки препаратов одного типа или единой ПТ [1, 14–16]. Это позволяет повторно использовать значительную часть данных при внесении изменений в мРНК-продукт (рис. S1, Приложение 1 размещено на сайте журнала²⁰).

Платформенный подход в производстве генотерапевтических лекарственных препаратов

В генной терапии наследственных заболеваний для доставки терапевтического трансгена чаще всего используют вирусные векторы²¹. Перспективным направлением ПТ является получение ГТЛП с использованием одного и того же вирусного вектора [6–8].

Как и в случае с мРНК-препаратами, разработка ГТЛП сопряжена с высокими затратами и длительностью повторных исследований, валидации процессов и методик контроля качества, а также доклинических исследований, что усложняет создание индивидуальных препаратов разового применения и обуславливает целесообразность платформенного подхода.

В препаратах генной терапии *in vivo* наиболее распространены векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) [17], что позволяет при единой ПТ получать различные препараты, помещая разные терапевтические гены в выбранный капсид AAV.

Для внедрения ПТ Национальным центром развития трансляционных наук (National center for advancing translational sciences, NCATS) в коллаборации с другими центрами разработан подход PaVe-GT (platform vector gene therapy), направленный на повышение эффективности разработки и ускорение проведения клинических исследований ГТЛП, путем объединения доклинических и ранних клинических этапов для нескольких препаратов. Ключевой особенностью PaVe-GT является использование для четырех заболеваний (пропионовая ацидемия, изолированная метилмалоновая ацидемия, дефицит Dok7 и дефицит коллагена Q) унифицированного вектора (серотип AAV9), производимого на одной и той же производственной площадке. Выбор AAV9 обусловлен тропизмом к печени, мышцам и центральной нервной системе. Переменным компонентом ЛП являются конструкции, кодирующие терапевтические гены [17].

²⁰ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-247-261-annex>

²¹ <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>

Подход PaVe-GT также предлагает дизайн клинических исследований на основании «мастер-протоколов» (master protocols), что позволяет синхронизировать процессы и инфраструктуру для разных продуктов по единому протоколу в рамках ПТ-производства. Инициатива PaVe-GT получила поддержку FDA в ходе публичных обсуждений. Таким образом, PaVe-GT представляет собой подход, в котором вирусный вектор рассматривается не только как средство доставки терапевтического гена, но и как элемент ПТ, позволяющий использовать одну технологию для производства нескольких препаратов и ускорять их экспертную оценку за счет сокращения объема предоставляемых данных.

Реализация платформенного подхода возможна на основе векторов разных серотипов²². Общие принципы применимы и к клеточным линиям, на которых нарабатывается вектор — для оценки качества и проведения части доклинических исследований достаточно ограниченных данных о клеточной линии и валидации процесса для уже одобренного препарата, произведенного с помощью ПТ. Однако смена вектора или серотипа (в случае AAV) требует новой характеристики ПТ и проведения доклинических и клинических исследований.

Платформенный подход к препаратам на основе системы редактирования генома

Системы редактирования генома рассматриваются как наиболее перспективные инструменты для лечения генетических заболеваний [2, 18, 19]. Разработку ГТЛП на их основе может затруднять, то что один и тот же синдром может быть вызван различными мутациями. В этом случае ПТ позволяет быстро получить персонализированный препарат без существенных изменений в генетических конструкциях, минимизируя трудоемкие и дорогостоящие исследования [4].

Использование единой системы доставки, стандартизации производства, унифицированных подходов для оценки качества и оптимизированного дизайна клинических исследований может сократить время разработки ГТЛП на основе одной системы редактирования генома с нескольких лет до полугода [2]. С регуляторной точки зрения, повторное использование данных по основным компонентам систем редактирования генома (гидовая

РНК, переменный компонент, система доставки) при экспертизе позволяет ускорить регистрацию ЛП.

В настоящее время ПТ с использованием систем редактирования генома применяются для *in vivo* и *ex vivo* терапии наследственных заболеваний²³ [2].

Контроль качества в рамках платформенного подхода

При применении платформенного подхода для производства ЛП, например терапевтической мРНК-вакцины против онкологического заболевания с индивидуальным набором неоантигенов, в препарат могут вноситься лишь небольшие изменения, обусловленные особенностями профиля неоантигенов опухоли конкретного пациента, поэтому контроль качества (активной субстанции, системы доставки, вспомогательных веществ) и профиль эффективности и безопасности, установленный в доклинических исследованиях, существенно не изменятся (табл. 2). Эта стратегия основана на минимальных различиях в структуре препарата, механизме действия, биологическом эффекте или производственных процессах, которые могут повлиять на качество или безопасность. Для использования данных по стабильности требуется демонстрация сходства молекулы и производственного процесса.

Рассмотренные примеры применения ПТ (мРНК-вакцины, ГТЛП на основе AAV и системы редактирования генома) подтверждают практическую значимость платформенного подхода для сокращения сроков, объемов исследований и стоимости для последующих препаратов, произведенных с использованием ПТ. Однако присвоение статуса ПТ возможно в настоящее время только после полного цикла разработки, производства и вывода на рынок первого одобренного препарата, что может стать препятствием для малых фармацевтических предприятий и клинических центров, разрабатывающих персонализированные ЛП.

Законодательное и нормативное регулирование платформенных технологий в Российской Федерации и ЕАЭС

В российском законодательстве и правовых актах ЕАЭС отсутствуют четкие указания по использованию ПТ при разработке и регистрации

²² Unlocking the potential of building blocks to expedite cell and gene therapy development: Takeaways from a scientific exchange between FDA, industry, and independent experts. ARM. 2024.

²³ Там же.

Таблица 2. Сравнение традиционного и платформенного подходов к контролю качества лекарственных препаратов на основе мРНК
Table 2. Comparison of traditional and platform approaches to quality control of mRNA-based medicinal products

Контролируемый параметр <i>Controlled parameter</i>	Традиционный подход <i>Traditional approach</i>	Платформенный подход <i>Platform approach</i>
Исходные материалы <i>Source materials</i>	Полный контроль качества материалов: линейной ДНК, нуклеотидов, ферментов, буферных растворов <i>Complete quality control of source materials: linear DNA, nucleotides, enzymes, and buffer solutions</i>	Установление стандартизованных требований к исходным материалам <i>Establishment of standardized requirements for source materials</i>
Производство <i>Manufacturing</i>	Документирование и валидация этапов производства: кэпирование, очистка, культивирование, амплификация <i>Documentation and validation of manufacturing steps: capping, purification, cultivation, and amplification</i>	Сокращение объема валидационных исследований при идентичности процесса предыдущему препарату, произведенному по платформенной технологии <i>Reduced validation scope if the process is identical to that of a product previously manufactured using platform technology</i>
мРНК <i>mRNA</i>	Анализ чистоты, подлинности, количественного содержания, специфической активности, безопасности <i>Analysis of purity, identity, content, potency, and safety</i>	Применение тех же аналитических тестов; допускается ссылка на данные о предыдущих препаратах <i>The same analytical tests are applied; reference to data on previous products is permitted</i>
Состав <i>Composition</i>	Валидация процесса инкапсуляции (pH, соотношение липидов, скорость потока) <i>Validation of the encapsulation process (pH, lipid ratio, and flow rate)</i>	Использование схожих липидных частиц позволяет ссылаться на предыдущие данные по эффективности доставки <i>Use of similar lipid particles allows reference to previous data on delivery efficacy</i>
Эффективность <i>Efficacy</i>	Количественная оценка показателей эффективности для каждой мишени <i>Quantitative assessment of efficacy for each target</i>	При идентичности механизма действия допустимо применение той же стратегии доказательства <i>If the mechanism of action is identical, the same proof strategy may be used</i>
Производственная площадка <i>Manufacturing site</i>	Инспекция GMP перед началом производства <i>GMP inspection prior to the start of manufacturing</i>	Допустимо освобождение от повторного инспектирования (при наличии лицензии) <i>Exemption from re-inspection is permitted (if licensed)</i>
Стабильность <i>Stability</i>	Сбор данных по новому препарату для установления срока годности <i>Collection of data for a new product to establish shelf life</i>	Проведение сравнительных исследований (позволят ускорить разработку) <i>Comparative studies (to expedite development)</i>

Таблица составлена авторами по данным источников [13, 15, 20, 21] и регуляторных документов²⁴ / The table was prepared by the authors based on data from sources [13, 15, 20, 21] and regulatory documents²⁴

лекарственных средств²⁵, а также при получении разрешений на применение индивидуальных биомедицинских клеточных продуктов (ИБМКП)²⁶ и биотехнологических лекарственных препаратов (ИБТЛП)²⁷.
Для обеспечения пациентов инновационными персонализированными продуктами, производимыми в рамках единой ПТ с унифицированным контролем качества, требуется внесение изменений в нормативно-правовые

²⁴ Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations. WHO. 2021.
ICH Topic Q5C Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products (CPMP/ICH/138/95). EMA. 1996.
²⁵ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».
Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».
Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».
²⁶ Постановление Правительства Российской Федерации от 28.03.2024 № 384 «Об утверждении Правил обращения биомедицинских клеточных продуктов, предназначенных для исполнения индивидуального медицинского назначения...».
Постановление Правительства Российской Федерации от 28.03.2024 г. № 385 «Об утверждении Правил предоставления, подтверждения и отмены разрешения на производство и применение биомедицинских клеточных продуктов, предназначенных для исполнения индивидуального медицинского назначения».
²⁷ Постановление Правительства Российской Федерации от 24.02.2025 № 213 «О биотехнологических лекарственных препаратах, предназначенных для применения в соответствии с индивидуальным медицинским назначением...».

акты в части применения ПТ. Изменения необходимы как в правовых актах ЕАЭС (например, для ГТЛП на основе одного вирусного вектора при смене трансгена), так и на национальном уровне, например, для иБТЛП, получаемых на основе данных генетического тестирования пациента (четыре медицинских центра по данным на 1.09.2026 уже имеют разрешения на применение таких продуктов, два из которых производят терапевтические мРНК-вакцины по единой технологии на одной площадке)²⁸, а также для аутологичных иБМКП при единой технологии производства (шесть медицинских центров по данным на 1.09.2026 имеют разрешения на производство и применение таких продуктов)²⁹.

В нормативной базе ЕАЭС платформенное производство определяется как «подход к разработке стратегии производства нового лекарственного препарата, начиная с процессов производства, аналогичных ранее использованным тем же заявителем для производства других лекарственных препаратов того же типа»³⁰. Это предусмотрено для моноклональных антител с использованием определенного штамма-продуцента при схожих технологических процессах (при наличии значительного накопленного опыта), а также для ГТЛП на основе генетически модифицированных клеток при документированной оценке рисков³¹. При этом допускается сокращение данных по валидации процесса или программе изучения стабильности при обосновании с учетом релевантного опыта. Однако остается неясным объем и содержание релевантного опыта. К необходимым требованиям относятся: одинаковые технологические этапы производства; минимальные различия в производственном процессе (параметры, внутрипроизводственный контроль) и оборудовании; использование одинаковых материалов и реактивов; сохранение структуры постоянного компонента (для ААВ – вектор одного серотипа, плазмиды с одинаковой структурой, клеточные линии), состава ЛП (например, соотношение

липидов в мРНК-вакцинах), механизма действия и биологического эффекта, влияющих на качество и безопасность.

Платформенный подход позволяет оптимизировать стратегию контроля качества ЛП, например за счет применения платформенных (универсальных) методик для оценки отдельных показателей качества без существенного изменения условий эксплуатации, системы пригодности и структуры отчетности³² [22], а также проведения на этапе выпуска периодических (выборочных) исследований ЛП вместо посерийных при наличии обоснования³³. По мере накопления опыта производства возможно сокращение стоимости препарата за счет проведения сложных дорогостоящих анализов не на каждой серии ЛП, а с определенной периодичностью.

Признание регуляторным органом данных доклинических исследований препаратов, произведенных по ПТ, допустимо при наличии обоснования для показателей биораспределения (например, для ГТЛП на основе одного серотипа ААВ или мРНК-вакцин с одинаковым составом и содержанием ЛНЧ).

Таким образом, с учетом развития технологий в области мРНК-вакцин, вирусных векторов, ЛНЧ и систем редактирования генома, особенно для лечения орфанных заболеваний с неудовлетворенной медицинской потребностью, использование ПТ является актуальным для ускорения доступа пациентов Российской Федерации к терапии. Концепция актуализации нормативных правовых документов (на национальном уровне и в рамках ЕАЭС) должна включать требования к следующим аспектам: характеристикам постоянного и переменного компонентов ЛП (для постоянного – молекулярная структура, способ доставки, состав ЛНЧ; для переменного – признаки сходного механизма действия); воспроизводимой технологии производства (стадии, оборудование, обоснование валидации); механизму рассмотрения и признания при экспертизе данных для препаратов, разработанных с использованием ПТ – мастер-файл

²⁸ <https://gxpnews.net/2026/04/razrabotannaya-fmba-rossii-vakczina-onkorna-poluchila-razreshenie-na-primenenie/>
<https://gxpnews.net/2026/02/klinika-blohina-poluchila-razreshenie-na-ispolzovanie-mrnk-vakcziny-ot-melanomy/>
<https://gxpnews.net/2025/11/minzdrav-vydal-razresheniya-na-ispolzovanie-dvuh-individualnyh-biopreparatov/>

²⁹ <https://www.sechenov.ru/pressroom/news/sergey-sobyanin-podderzhal-programmu-nauchno-tekhnologicheskogo-razvitiya-sechenovskogo-universiteta/>
<https://blood.ru/about/novosti/nmits-gematologii-minzdrava-rossii-poluchil-litsenziyu-na-proizvodstvo-biomeditsinskikh-kletochnykh/>

³⁰ Рекомендация Коллегии ЕЭК от 22.12.2020 № 26 «О Руководстве по разработке и производству активных фармацевтических субстанций».

³¹ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

³² ICH Guideline Q14 on analytical procedure development Step 2b (EMA/CHMP/ICH/195040/2022). EMA. 2022.

³³ Решение Коллегии ЕЭК от 07.09.2018 № 151 «Об утверждении Руководства по составлению нормативного документа по качеству лекарственного препарата».

ПТ, экстраполяция данных валидации процесса производства, отдельные параметры доклинических исследований (данные изучения токсичности, фармакокинетики) и стабильности.

К ограничениям проведенного авторами исследования относится то, что рассмотренный международный регуляторный опыт по внедрению ПТ (FDA, EMA, PMDA) ориентирован преимущественно на крупных производителей; для малых и средних предприятий экстраполяция может быть ограничена. Экономические аспекты (стоимость создания ПТ и уровень затрат на повторные исследования) в статье не рассматривались.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Международные регуляторные органы признают платформенные подходы наиболее перспективными для разработки персонализированных препаратов на основе мРНК и ГТЛП, прежде всего для лечения орфанных генетических и онкологических заболеваний. FDA, EMA и PMDA формируют подходы к внедрению ПТ в практику разработки и регистрации ЛП. Основным барьером в подходах FDA и PMDA остается требование наличия первого одобренного продукта для получения статуса ПТ, что затруднительно для большинства разработчиков персонализированных препаратов.

Для мРНК-вакцин (включая терапевтические и для иммунопрофилактики инфекционных заболеваний) и ГТЛП на основе ААВ доказана возможность использования стандартизированных модулей ПТ (постоянный состав ЛНЧ, серотип ААВ вектора, унифицированные методы

контроля качества) и сокращения объема доклинических исследований за счет экстраполяции результатов, полученных для первого препарата.

В нормативной документации Российской Федерации и ЕАЭС отсутствуют критерии признания платформенного подхода, что требует разработки согласованных требований к результатам предшествующих разработок.

Платформенный подход, основанный на неизменном производственном процессе и унифицированных методиках контроля качества, эффективно ускоряет разработку и внедрение мРНК-вакцин и ГТЛП для лечения орфанных генетических и онкологических заболеваний с неудовлетворенной медицинской потребностью, однако его реализация требует внесения изменений в нормативную документацию в Российской Федерации и ЕАЭС.

Регуляторная практика применения платформенного подхода при регистрации ЛП в настоящее время ограничивается опытом Японии (PMDA) по рассмотрению вакцин против разных штаммов SARS-CoV-2 в период пандемии COVID-19.

Предложенная концепция может быть учтена при подготовке изменений в Решения Совета Евразийской экономической комиссии, касающихся разработки, производства и регистрации ЛП, а также в национальные нормативные акты, регламентирующие процедуры получения разрешений на применение отдельных препаратов. Рассмотренные подходы также могут быть полезны для создания методических рекомендаций для заявителей, разрабатывающих мРНК-вакцины и ГТЛП.

Литература/References

- Skerritt JH, Tucek-Szabo C, Sutton B, Nolan T. The platform technology approach to mRNA product development and regulation. *Vaccines (Basel)*. 2024;12(5):528. <https://doi.org/10.3390/vaccines12050528>
- Urnov F, Kassim S, Musunuru K, et al. Advancing gene-editing platforms to improve the viability of rare-disease therapeutics: Key insights from a 2024 Scientific Exchange hosted by ARM, ISCT, and Danaher. *Cytotherapy*. 2025;27(10):1151–63. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2025.06.010>
- Ogawa T, Sunyi J, Kawachi K, et al. Regulatory approaches for platform-based vaccine development in Japan: Insights from PMDA's experience with COVID-19 and RSV vaccines. *Vaccine*. 2026;76:128315. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2026.128315>
- Musunuru K, Grandinette SA, Wang X, et al. Patient-Specific *in vivo* gene editing to treat a rare genetic disease. *N Engl J Med*. 2025;392(22):2235–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2504747>
- Багдасарова ДВ, Болотина ЛВ, Леухина ИА и др. мРНК-технологии в борьбе с онкологическими заболеваниями: мировой опыт клинических исследований и опыт внедрения в Российской Федерации. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2025;14(6):69–77. Bagdasarova DV, Bolotina LV, Leukhina IA, et al. mRNA technologies in treatment of oncological diseases: global experience of clinical trials and implementation in the Russian Federation. *P.A. Herzen Journal of Oncology*. 2025;14(6):69–77 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/onkolog20251406169>
- Копейн ДС, Порошин ГН, Хамитов РА. Реализация концепции Quality by Design для генотерапевтического лекарственно-
- го препарата на основе аденоассоциированного вирусного вектора. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(2):141–55. Kopein DS, Poroshin GN, Khamitov RA. Implementation of the quality-by-design concept for an adeno-associated viral vector-based gene therapy. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(2):141–55 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-580>
- Bulcha JT, Wang Y, Ma H, et al. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):53. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
- Young P. Treatment to cure: Advancing AAV gene therapy manufacture. *Drug Discov Today*. 2023;28(7):103610. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103610>
- Stoops J, Morton T, Powell J, et al. Treg cell therapy manufacturability: current state of the art, challenges and new opportunities. *Front Immunol*. 2025;16:1604483. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1604483>
- Whitley J, Zwolinski C, Denis C, et al. Development of mRNA manufacturing for vaccines and therapeutics: mRNA platform requirements and development of a scalable production process to support early phase clinical trials. *Transl Res*. 2022;242:38–55. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.11.009>
- Zhang G, Tang T, Chen Y, et al. mRNA vaccines in disease prevention and treatment. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):365. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01579-1>
- Li M, Wang Z, Xie C, et al. Advances in mRNA vaccines. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier; 2022.

- P. 295–316. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2022.04.011>
13. 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>
 14. Schrieber SJ, Putnam WS, Chow ECY, et al. Comparability considerations and challenges for expedited development programs for biological products. *Drugs RD*. 2020;20(4):301–6. <https://doi.org/10.1007/s40268-020-00321-4>
 15. Castellanos MM, Gressard H, Li X, et al. CMC strategies and advanced technologies for vaccine development to boost acceleration and pandemic preparedness. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(7):1153. <https://doi.org/10.3390/vaccines11071153>
 16. Madabushi R, Seo P, Zhao L, et al. Review: Role of model-informed drug development approaches in the lifecycle of drug development and regulatory decision-making. *Pharm Res*. 2022;39(8):1669–80. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03288-w>
 17. Brooks PJ, Ottinger EA, Portero D, et al. The platform vector gene therapies project: Increasing the efficiency of adeno-associated virus gene therapy clinical trial startup. *Hum Gene Ther*. 2020;31(19–20):1034–42. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.259>
 18. Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature*. 2020;578(7794):229–36. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>
 19. Chan AYL, Chan VKY, Olsson S, et al. Access and unmet needs of orphan drugs in 194 countries and 6 areas: A global policy review with content analysis. *Value Health*. 2020;23(12):1580–91. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2020.06.020>
 20. Drennen J, Anderson C. Comparability protocols: Chemistry, manufacturing and controls information. *NIR News*. 2003;14(3):14–5. <https://doi.org/10.1255/nirn.720>
 21. Sanyal G, Särnefält A, Kumar A. Considerations for bioanalytical characterization and batch release of COVID-19 vaccines. *npj Vaccines*. 2021;6(1):53. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00317-4>
 22. Ваганова ОА, Смирнов РС, Ленин СА и др. Моноклональные антитела: разработка платформенных методик оценки примесей высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(3):330–46. Vaganova OA, Smirnov RS, Lenin SA, et al. Monoclonal antibodies: Development of universal (platform) methods for the assessment of high and low-molecular weight impurities. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2025;15(3):330–46 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-3-330-346>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещено Приложение 1. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-247-261-annex>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Н.С. Покровский** — работа с источниками литературы, написание текста рукописи, формулировка выводов; **Е.В. Мельникова** — концепция работы, написание текста рукописи, формулировка выводов; **В.А. Меркулов** — утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Использование генеративного искусственного интеллекта. Авторы заявляют, что при подготовке рукописи использовали генеративный ИИ (ChatGPT Images 2.0, исключительно для подготовки отдельных элементов визуализации в рисунках) в строгом соответствии с положениями политики журнала в отношении ИИ.

Supplementary information. Supplementary material 1 is available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-247-261-annex>

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **N.S. Pokrovsky** worked with literature sources, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **E.V. Melnikova** conceptualized the study, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **V.A. Merkulov** approved the final version of the manuscript for publication.

Use of generative artificial intelligence. The authors declare that they used generative AI (ChatGPT Images 2.0, used solely for the preparation of certain visualization elements in the figures) during the preparation of this manuscript in strict compliance with the journal's policy on AI.

Об авторах / Authors

Покровский Никита Станиславович / Nikita S. Pokrovsky

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2355-0879>

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук / Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. / Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 06.04.2026

После доработки 12.08.2026

Принята к публикации 25.09.2026

Received April 6, 2026

Revised August 12, 2026

Accepted September 25, 2026

Лекарственные препараты на основе олигонуклеотидов: обзор современных регуляторных требований к доклиническим исследованиям

Г.Н. Енгальчева , Р.Д. Сюбаев , А.А. Берчатова , О.В. Астапова ,
Д.В. Горячев , В.А. Меркулов 

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Енгальчева Галина Нинелевна; engalychева@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Олигонуклеотиды — перспективный класс лекарственных средств, обладающих уникальными физико-химическими свойствами, фармакокинетическими характеристиками, механизмом действия и многообещающим терапевтическим потенциалом. В связи с отсутствием национального российского и действующего в ЕАЭС руководства были рассмотрены существующие международные регуляторные требования к доклинической оценке безопасности олигонуклеотидов.

ЦЕЛЬ. Анализ нормативных документов и научно-методических источников, освещающих современные подходы к доклинической разработке терапевтических олигонуклеотидов.

ОБСУЖДЕНИЕ. Олигонуклеотиды представляют собой сформировавшийся класс лекарственных средств, состоящий из полиморфных по структуре и механизму действия химически синтезированных соединений, обладающих высокоспецифичной фармакологической активностью. В основе фармакологического действия олигонуклеотидов лежит специфическое связывание синтетически модифицированных РНК или гибридов РНК/ДНК с целевыми последовательностями РНК с целью изменения экспрессии РНК и/или последующей экспрессии белков. Олигонуклеотиды могут различаться по механизму действия, структуре, химическим модификациям, размеру, последовательности, стратегии доставки, а также по наличию или отсутствию других функциональных групп, таких как малые молекулы, белки или антитела. По показателям мишень- и видоспецифичности эти препараты занимают промежуточное положение между малыми молекулами и биологическими препаратами. В настоящее время успешно применяются в медицинской практике антисмысловые олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК, аптамеры. Локальные руководства по доклинической оценке безопасности олигонуклеотидов, предложенные PMDA, FDA, EMA, в зарубежных странах являются промежуточным этапом перед выходом глобального гармонизированного руководства ICH S13, разработка которого ведется международными регуляторами. В соответствии с Программой фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на период 2021–2030 гг. заявлено создание технологий подавления работы поврежденных генов с помощью олигонуклеотидов, представляется целесообразной разработка руководства по доклиническим исследованиям олигонуклеотидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Терапевтические олигонуклеотиды обладают двойственной природой, сочетая в себе характеристики малых химических молекул и высокоспецифичных биотехнологических препаратов. Поскольку разработка олигонуклеотидов является динамично развивающимся научным направлением, при планировании и проведении доклинических исследований целесообразно использовать гибкий, индивидуальный подход, учитывающий химическую модификацию, механизм действия, способ доставки, а также актуальные научные знания о потенциальных токсических эффектах данного класса препаратов.

Ключевые слова: олигонуклеотидные препараты; олигонуклеотидная терапия; доклиническая оценка безопасности; доклинические исследования; регуляторные требования; руководства; безопасность лекарственных средств; международная гармонизация; ICH S13; антисмысловые олигонуклеотиды; миРНК

Для цитирования: Енгальчева Г.Н., Сяубаев Р.Д., Берчатова А.А., Астапова О.В., Горячев Д.В., Меркулов В.А. Лекарственные препараты на основе олигонуклеотидов: обзор современных регуляторных требований к доклиническим исследованиям. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(3):262–275. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-262-275>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00061-26-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0).

Потенциальный конфликт интересов. В.А. Меркулов — главный редактор журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2021 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Oligonucleotide-based medicinal products: A review of current regulatory requirements for preclinical studies

Galina N. Engalycheva , Rashid D. Syubaev , Anastasia A. Berchatova ,
Oksana V. Astapova , Dmitry V. Goryachev , Vadim A. Merkulov 

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd., Moscow 127051, Russian Federation

✉ Galina N. Engalycheva; engalycheva@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Oligonucleotides represent a promising class of drugs with unique physico-chemical properties, pharmacokinetic characteristics, mechanisms of action, and encouraging therapeutic potential. Due to the lack of a national Russian guideline and a guideline currently effective within the Eurasian Economic Union (EAEU), existing international regulatory requirements for the preclinical safety assessment of oligonucleotides were reviewed.

AIM. To analyze regulatory documents and scientific and methodological sources addressing current approaches to the preclinical development of therapeutic oligonucleotides.

DISCUSSION. Oligonucleotides represent an established class of medicinal products consisting of chemically synthesized compounds that are polymorphic in structure and mechanism of action, possessing highly specific pharmacological activity. The pharmacological action of oligonucleotides is based on the specific binding of synthetically modified RNA or RNA/DNA hybrids to target RNA sequences to alter RNA expression and/or subsequent protein expression. Oligonucleotides can vary by mechanism of action, structure, chemical modifications, size, sequence, delivery strategy, as well as by the presence or absence of other functional groups, such as small molecules, proteins, or antibodies. In terms of target and species specificity, these drugs occupy an intermediate position between small molecules and biologics. Currently, antisense oligonucleotides, small interfering RNAs, and aptamers are successfully utilized in clinical practice. Local guidelines for the preclinical safety assessment of oligonucleotides proposed by the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA), the US Food and Drug Administration (FDA), and the European Medicines Agency (EMA) serve as an interim step prior to the release of the globally harmonized International Council for Harmonisation (ICH) S13 guideline, which is currently being developed by international regulators. In accordance with the Fundamental Scientific Research Program in the Russian Federation for the 2021–2030 period, which states the goal of creating technologies for silencing damaged genes using oligonucleotides, the development of a guideline for the preclinical studies of oligonucleotides is considered appropriate.

CONCLUSIONS. Therapeutic oligonucleotides have a dual nature, combining the characteristics of small chemical molecules and highly specific biotechnological products. Since oligonucleotide development is a dynamically evolving scientific field, it is advisable to utilize a flex-

ible, case-by-case approach when planning and conducting preclinical studies. This approach should account for chemical modification, mechanism of action, delivery method, and current scientific knowledge regarding the potential toxic effects of this drug class.

Keywords: oligonucleotide-based medicinal products; oligonucleotide therapeutics; preclinical safety assessment; nonclinical studies; regulatory requirements; guidelines; safety of medicinal products; international harmonization; ICH S13; antisense oligonucleotides; siRNA

For citation: Engalycheva G.N., Syubaev R.D., Berchatova A.A., Astapova O.V., Goryachev D.V., Merkulov V.A. Oligonucleotide-based medicinal products: A review of current regulatory requirements for preclinical studies. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(3):262–275. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-262-275>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation under State Assignment No. 056-00061-26-00 for applied scientific research (R&D state registration No. 124022300127-0).

Disclosure. V.A. Merkulov has been the Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021. The other authors declare no conflicts of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Терапевтические олигонуклеотидные препараты являются перспективными лекарственными средствами (ЛС) для терапии широкого спектра заболеваний, в том числе тех, которые ранее считались не поддающимися лечению низкомолекулярными препаратами или моноклональными антителами [1–3]. Структурно олигонуклеотиды состоят из ~20 нуклеотидов на цепь, изготавливаются путем химического синтеза. Олигонуклеотиды – это полиморфный класс, который включает антисмысловые одноцепочечные олигонуклеотиды (АСО), малые интерферирующие РНК (миРНК), микроРНК (мкРНК) и аптамеры [4]. Главное преимущество олигонуклеотидов заключается в их способности воздействовать на самые разные терапевтические мишени, к которым относятся более 10000 белков в геноме человека, ранее считавшиеся недоступными для традиционных малых молекул (undruggable)¹. Кроме того, простота синтеза новых библиотек комплементарных олигонуклеотидов под конкретный целевой белок значительно облегчает подбор оптимального дизайна таких препаратов².

Согласно современным представлениям, терапевтические средства на основе РНК рассматриваются как класс препаратов, принципиально отличающихся от традиционных низкомолекулярных соединений и белковых биопрепаратов [5, 6] и требуют особого регулирования [7]. Первый нормативный документ,

посвященный доклиническим исследованиям (ДКИ) безопасности терапевтических олигонуклеотидов, был разработан PMDA (Pharmaceutical and Medical Devices Agency, Япония)³. В 2024 г. FDA (Food and Drug Administration, США) представило свой проект руководства для фармацевтической промышленности по доклинической оценке терапевтических средств на основе олигонуклеотидов⁴. Оба эти документа служат промежуточным этапом перед выходом глобального гармонизированного руководства Международного совета по гармонизации (International Council for Harmonisation – ICH) ICH S13⁵, разработка которого ведется международными регуляторами [6].

Целью ICH является создание руководства, которое будет учитывать современное состояние и перспективные направления в разработке терапевтических олигонуклеотидов с учетом стремительных научных достижений в данной области. Заявленным требованием к разрабатываемому документу является сочетание принципов высокого научного уровня и подробного технического руководства, охватывающего все популяции пациентов, включая педиатрическую. В руководствах PMDA, FDA отмечено, что ДКИ безопасности олигонуклеотидов не укладываются в рамки стандартных протоколов для малых молекул или классических биотехнологических белков. В концептуальном документе ICH S13⁶ отмечено, что, хотя олигонуклеотиды упоминаются в руководствах ICH S6 (R1)

¹ <https://www.productlifegroup.com/>

² Там же.

³ Guideline for preclinical safety assessment of oligonucleotide therapeutics. PSEHB/PED Notification No. 0330-1. PMDA; 2020.

⁴ Guideline for preclinical safety assessment of oligonucleotide therapeutics. Guidance for industry (DRAFT). FDA; 2024.

⁵ Final concept paper S13 EWG: Non-clinical safety evaluation of oligonucleotide-based therapeutics. ICH; 2024.

⁶ Там же.

и S5 (R3), а разработчики часто ссылаются на ICH M3(R2) при проведении ДКИ безопасности, эти документы не в полной мере учитывают уникальные свойства данного класса препаратов. На этом основании сделан вывод об отсутствии руководящих принципов ICH, что приводит к принятию индивидуальных решений, потенциально препятствующих эффективному выводу терапевтических олигонуклеотидов на рынок. Таким образом, разработка ЛС на основе олигонуклеотидов ставит уникальные научные и нормативные задачи, которые не в полной мере решены в действующих рекомендациях ICH [6, 8].

Правительством Российской Федерации утверждена программа фундаментальных научных исследований на долгосрочный период (2021–2030 гг.)⁷, в соответствии с которой актуальным является создание в том числе технологий подавления работы поврежденных генов с помощью антисмысловых олигонуклеотидов, включая миРНК. В 2021 г. был зарегистрирован оригинальный отечественный лекарственный препарат, содержащий в качестве действующего вещества синтетическую миРНК siRk-12, которая специфически подавляет репликацию SARS-CoV-2⁸. Два воспроизведенных препарата нусинерсена были зарегистрированы в 2024⁹ и 2025¹⁰ гг. Российские ученые разрабатывают антисмысловые олигонуклеотиды [9–11], аптамеры [12, 13], олигонуклеотиды на основе миРНК [14]. Необходимо отметить, что в Российской Федерации и Евразийском экономическом союзе (ЕАЭС) специальные руководства, посвященные ДКИ безопасности олигонуклеотидов, отсутствуют, что может стать препятствием для успешной регистрации этих инновационных препаратов.

Цель работы — анализ нормативных документов и научно-методических источников, освещающих современные подходы к доклинической разработке терапевтических олигонуклеотидов.

Поиск информации осуществляли на интернет-сайтах российских и зарубежных регуляторных органов, международных организаций PMDA, FDA, EMA (European Medicines Agency), Евразийской экономической комиссии (ЕЭК), ICH, а также в библиографических базах данных eLIBRARY.RU и PubMed. В анализ включали действующие нормативные документы и проекты, руководства, научные публикации,

находящиеся в открытом доступе по состоянию на апрель 2026 г. Глубина поиска составила 22 года (2005–2026 гг.).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Особенности олигонуклеотидов

Механизм действия и структура

В отличие от традиционных лекарственных препаратов, олигонуклеотиды воздействуют на ранее недоступные патогенетические пути и являются перспективными ЛС для лечения генетических, инфекционных и дегенеративных заболеваний [15]. В зависимости от механизма действия, структурных характеристик, стадии разработки и жизненного цикла олигонуклеотидные препараты (ОНП) можно отнести к нескольким категориям (рис. 1). Рисунок 1 на английском языке представлен в Приложении 1 (размещено на сайте журнала¹¹).

В настоящее время терапевтические олигонуклеотиды представляют собой сформировавшийся класс ЛС, обеспечивающих высокоспецифичную фармакологическую активность. В медицинской практике успешно применяются несколько АСО (например, нусинерсен, этеплирсен, инотерсен), миРНК (например, патисиран, гивосиран, люмасаиран, инклизариан) и аптамер авацинкаптад пегол.

Фармакологическое действие АСО реализуется преимущественно в ядре, миРНК — в цитоплазме. Аптамеры («химические антитела») не должны проникать внутрь клетки и действуют во внеклеточном пространстве или на поверхности клеточных мембран путем конформационного связывания с белками-мишенями. Поскольку методы терапии на основе олигонуклеотидов стремительно развиваются, на стадии ДКИ и клинических исследований (КИ) находятся новые типы этих молекул, которые реализуют иные механизмы фармакологического эффекта [16]. Так, на разных стадиях ДКИ и КИ находятся олигонуклеотиды на основе микроРНК, рiРНК, маРНК и др. (рис. 1).

Доставка олигонуклеотидов к мишеням

Для реализации фармакологического эффекта большинству олигонуклеотидов необходимо проникнуть внутрь клеток-мишеней [17]. Будучи отрицательно заряженными молекулами, олигонуклеотиды почти не проникают

⁷ Распоряжение Правительства Российской Федерации от 31.12.2020 № 3684-р (ред. от 25.12.2025) «Об утверждении Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы)».

⁸ https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=0a17291e-5ec1-44d0-8d12-ce760dc165ad

⁹ <https://pharma.eaeunion.org/pharma/registers/26/ru/register/registered-medicinal-products/64f59ef6fb44f13b9518e6b9>

¹⁰ <https://pharma.eaeunion.org/pharma/registers/26/ru/register/registered-medicinal-products/698b049830dcf82ad9360906>

¹¹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-262-275-annex>

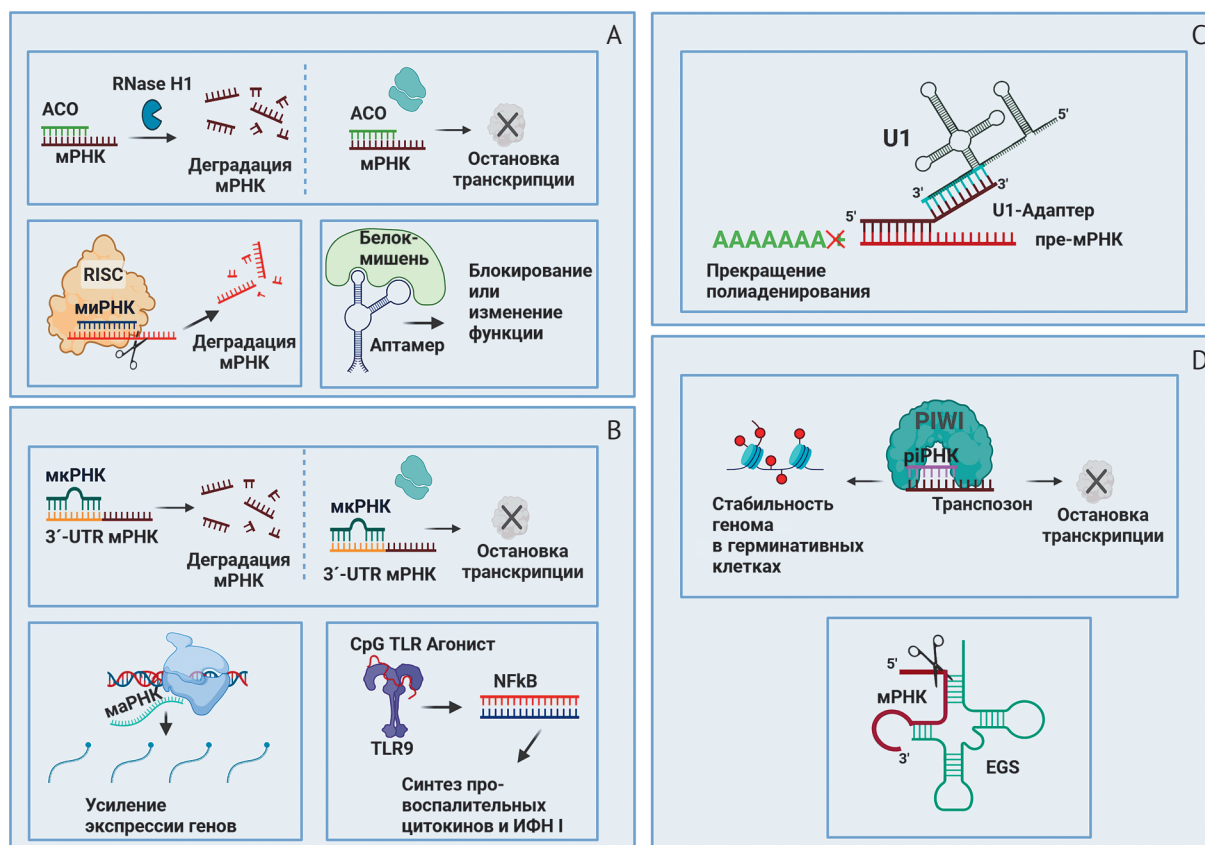


Рисунок подготовлен авторами с использованием шаблонов biorender.com / Figure was prepared by the authors using the templates from biorender.com

Рис. 1. Механизмы действия олигонуклеотидов и стадии разработки лекарственных препаратов. А — терапевтические олигонуклеотиды, разрешенные для медицинского применения; В — олигонуклеотидные препараты, находящиеся на стадии клинических исследований; С — олигонуклеотидные препараты, находящиеся на стадии доклинических исследований; D — перспективные для разработки лекарственных препаратов олигонуклеотиды. Сокращения: АСО — антисмысловые олигонуклеотиды; RNase H1 — рибонуклеаза H1; миРНК — малые интерферирующие РНК; RISC — РНК-индуцированный комплекс сайленсинга генов; мкРНК — микроРНК; 3'-UTR — 3'-нетранслируемая область; маРНК — малые активирующие РНК; CpG TLR Агонисты — олигонуклеотиды с некодирующими неметилированными CpG-мотивами; TLR9 — Toll-подобный рецептор 9-го типа; NF-κB — ядерный фактор «каппа-би»; ИФН I — интерфероны I типа; U1-адаптеры — бифункциональный олигонуклеотид, состоящий из целевого домена и U1-домена; piРНК — РНК, взаимодействующие с белками PIWI; EGS — внешние направляющие последовательности.

Fig. 1. Mechanisms of action of oligonucleotides and stages of development of medicinal products. Figure 1 in English is presented in Supplementary material 1 (available on the journal's website¹²).

через клеточные мембраны. Также необходимо обеспечить стабильность олигонуклеотида, поскольку он разрушается нуклеазами после введения в организм [18]. Для улучшения стабильности, оптимизации фармакокинетических свойств и проникновения в клетки используют химические модификации молекулы олигонуклеотида и усовершенствованные стратегии доставки [17, 19]. Модификация и преобразование молекулы, разработка эффективных, безопасных и адресных систем доставки являются основным направлением исследований и разработок в данной области [18]. Оптимальные системы доставки (рис. 2) должны обладать высокой эффективностью включения препарата (drug

loading efficiency), обеспечивать достаточный профиль безопасности, защищать нуклеиновые кислоты от быстрой деградации и обладать высокой селективностью в отношении мишени [20].

Таким образом, олигонуклеотиды, с одной стороны, похожи на биологические препараты (обладают естественными биологическими механизмами действия, которые отличаются высокой специфичностью), с другой — изготавливаются синтетическим путем и обычно включают химические модификации для повышения стабильности, периода полувыведения и/или эффективности [6]. Эти особенности диктуют необходимость применять особые подходы к планированию регуляторных ДКИ данного

¹² <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-262-275-annex>

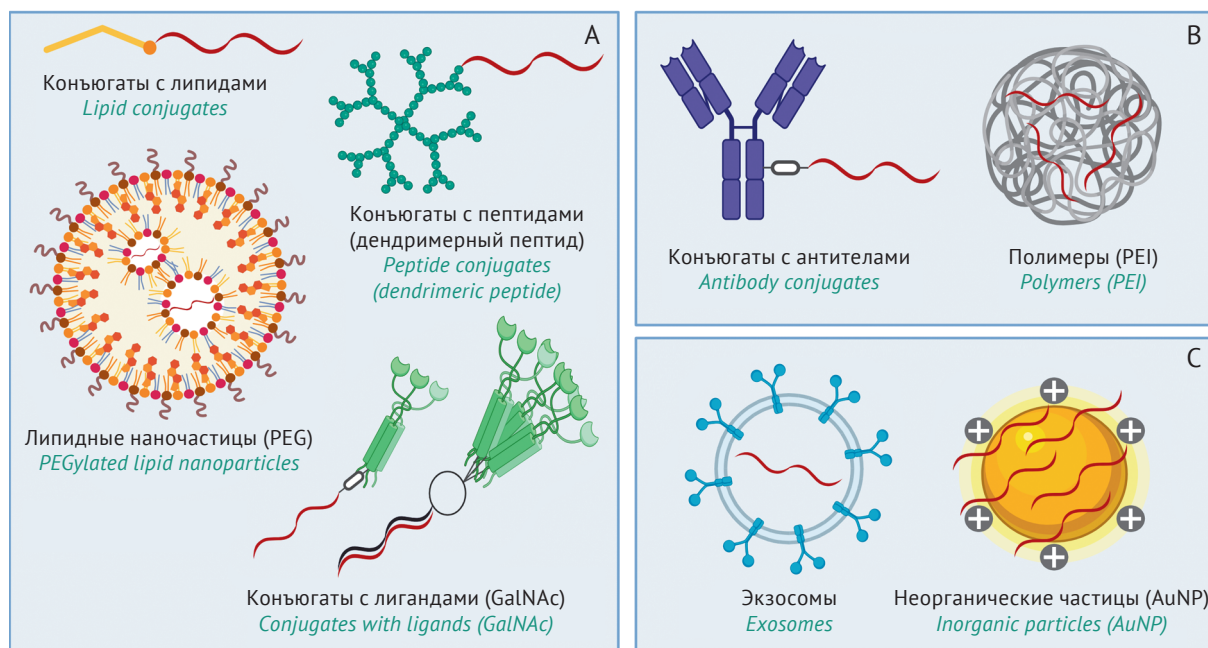


Рисунок подготовлен авторами с использованием шаблонов biorender.com. Изображение дендримерного пептида создано авторами по данным источника [21]. Изображение шпильчатой структуры с тетрапептидами, ковалентно связанной с остатками N-ацетилгалактозамина, создано авторами по данным источника [22] / Figure was prepared by the authors using the templates from biorender.com. The image of the dendrimeric peptide was created by the authors based on data from the reference [21]. The image of a hairpin structure with a tetraloop covalently linked to N-acetylgalactosamine residues was created by the authors based on data from the reference [22].

Рис. 2. Системы доставки олигонуклеотидов в составе лекарственных препаратов (ЛП). А — зарегистрированные ЛП; В — ЛП на стадии клинических исследований; С — ЛП на стадии доклинических исследований. PEG — полиэтиленгликоль; GalNAc — N-ацетилгалактозамин; PEI — полиэтиленглимин; AuNP — наночастица золота.

Fig. 2. Oligonucleotide delivery systems in medicinal products. A, registered medicinal products; B, medicinal products in clinical trials; C, medicinal products in preclinical studies. PEG, polyethylene glycol; GalNAc, N-acetylgalactosamine; PEI, polyethyleneimine; AuNP, gold nanoparticle.

класса препаратов. По мере расширения сферы применения и усложнения структуры олигонуклеотидов методология их доклинической оценки продолжает эволюционировать. Y. Tessier и соавт. отмечают, что зачастую у разработчиков и регуляторных органов отсутствует ясность по многим вопросам, связанным с разработкой терапевтических олигонуклеотидов [23].

Нормативные и научно-методические документы по доклиническим исследованиям терапевтических олигонуклеотидов Российская Федерация и ЕАЭС

На территории Российской Федерации регулирование обращения лекарственных препаратов осуществляется в соответствии с российским законодательством, а также законодательством ЕАЭС. Федеральный закон ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств»¹³

и Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств¹⁴ не содержат упоминаний об олигонуклеотидах.

Согласно главе 53 Правил проведения исследований биологических ЛС требования к доклинической оценке безопасности лекарственных препаратов, полученных с использованием биотехнологических методов, могут также применяться к олигонуклеотидам¹⁵. Из этого следует, что данный документ рассматривает олигонуклеотиды как биологические препараты и отмечает, что традиционные подходы, используемые для исследования токсичности лекарственных препаратов, могут не в полной мере подходить по причине уникальности и разнообразия структурных и биологических свойств, в частности видоспецифичности, иммуногенности и непредсказуемых плейотропных эффектов. В Фармакопее¹⁶ ЕАЭС олигонуклеотиды

¹³ Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 29.12.2025) «Об обращении лекарственных средств» (с изм. и доп., вступ. в силу с 1.03.2026).

¹⁴ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 78 (ред. от 26.11.2025) «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».

¹⁵ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 (ред. от 22.01.2025) «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

¹⁶ Решение Коллегии ЕЭК от 11.08.2020 № 100 «О Фармакопее Евразийского экономического союза».

упоминаются отдельно, а не как биологические и биотехнологические продукты. Руководство по составлению документации по химическому и фармацевтическому качеству для исследуемых ЛС, применяемых в КИ¹⁷, распространяется, среди прочих препаратов, на синтетические олигонуклеотиды. Ни один из вышеупомянутых документов не содержит определения понятия «терапевтический олигонуклеотид».

Необходимо отметить, что олигонуклеотиды формально подпадают под определение генотерапевтических лекарственных препаратов (ГТЛП), которое дано в Федеральном законе № 61-ФЗ и Решении Совета ЕЭК № 78, поскольку содержат нуклеиновую кислоту, последовательность которой напрямую обуславливает регулирование экспрессии генов. Однако, в отличие от ГТЛП, действие которых направлено на необратимую модификацию генома¹⁸, терапевтические олигонуклеотиды осуществляют обратимую регуляцию на пост-транскрипционном уровне путем модуляции сплайсинга пре-мРНК (АСО) или деградации зрелой мРНК (миРНК). Кроме того, олигонуклеотиды включают аптамеры, действующие на белковом уровне за счет прямого конформационного взаимодействия с мишенями. Принципиальным отличием олигонуклеотидов от ГТЛП также является способ получения путем химического синтеза и отсутствие в составе вирусных векторов. Таким образом, терапевтические олигонуклеотиды представляют собой самостоятельный класс лекарственных препаратов, который фактически выпадает из регуляторного поля Российской Федерации и ЕАЭС.

Япония

В 2020 г. Агентство по фармацевтике и медицинским изделиям (PMDA) и Министерство здравоохранения, труда и благосостояния Японии (Ministry of Health, Labour and Welfare – MHLW) утвердило руководство по ДКИ безопасности олигонуклеотидов¹⁹. Этот документ стал первым в мире специализированным национальным руководством, посвященным токсикологическим исследованиям олигонуклеотидов [24]. Целью руководства было заявлено формирование структурированной системы правил, подходов и стандартов для доклинической оценки безопасности препаратов на основе олигонуклеотидов. Указано на необходимость соблюдения принципа 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement) при проведении исследований без негативных последствий для безопасности человека.

При обосновании актуальности разработки документа отмечено, что, хотя в действующем руководстве ICH S6(R1)²⁰ указано, что «принципы, изложенные в данном руководстве, могут применяться и к олигонуклеотидам», при их оценке необходимо исследовать внутриклеточные эффекты и последствия химических модификаций, которые обычно не учитываются для биотехнологических препаратов. Следовательно, при оценке доклинической безопасности олигонуклеотидов принципиально важно опираться не только на ICH S6(R1), но и учитывать специфические биологические характеристики препаратов нуклеиновых кислот, а также требования других руководств по низкомолекулярным ЛС химического синтеза. Руководство устанавливает базовые принципы, опирающиеся на актуальные научные достижения. В связи с этим заявители могут использовать иные методы, если эти альтернативные подходы имеют под собой надлежащее научное обоснование, соответствующее современному уровню развития научных знаний.

Областью применения руководства являются действующие вещества, в основном произведенные методами химического синтеза и содержащие линейно связанную РНК/ДНК или искусственно модифицированную нуклеиновую кислоту, которые связываются со специфической нуклеотидной последовательностью (далее этот процесс именуется «гибридизацией») и вызывают биологическую реакцию без синтеза нового белка. К таким действующим веществам относятся антисмысловые олигонуклеотиды, малые интерферирующие РНК (миРНК/siRNA) и микроРНК (мкРНК/miRNA). Описанные в данном руководстве концепции оценки безопасности могут также применяться к аптамерам и декой-олигонуклеотидам. Программа ДКИ безопасности терапевтических олигонуклеотидов предусматривает оценку органа-мишени, дозозависимости, взаимосвязи с системной экспозицией и обратимости эффектов для характеристики фармакологических и токсикологических свойств ЛС. Важно отметить, что в руководство заранее включены новые типы олигонуклеотидов, которые находятся на ранних стадиях клинической разработки или только начинают выходить на фармацевтический рынок, например олигонуклеотиды-ловушки и аптамеры.

В 2018 г. PMDA опубликовало отраслевое руководство, посвященное оценке качества

¹⁷ Рекомендация Коллегии ЕЭК от 27.12.2022 № 49 «О Руководстве по составлению документации по химическому и фармацевтическому качеству для исследуемых лекарственных средств, применяемых в клинических исследованиях».

¹⁸ Long-term follow-up after administration of human gene therapy products: Guidance for industry. FDA; 2020.

¹⁹ Guideline for preclinical safety assessment of oligonucleotide therapeutics. No. 0324-1. PMDA; 2020.

²⁰ Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals S6(R1). EMA; 2011.

терапевтических олигонуклеотидов²¹, которое дает следующее определение: олигонуклеотид — это химически синтезированный полимер нуклеиновых кислот, предназначенный для регулирования экспрессии генов или функций белков.

Отмечено, что олигонуклеотиды не подпадают под действие существующих руководств ICH по качеству, касающихся контроля и спецификаций примесей (руководства ICH Q3A(R2), Q3B(R2), Q6A и M7). Принципы, изложенные в текущих руководствах для химически синтезированных ЛС, могут быть частично применимы к олигонуклеотидам, полученным путем химического синтеза. Но могут оказаться недостаточными или неприменимыми, например, для квалификации примесей или контроля ОНП, для которых формирование высшей (пространственной) структуры критично для проявления фармакологической активности.

США

FDA представило проект Руководства по доклинической оценке терапевтических олигонуклеотидов²² в 2024 г. Цель документа — предоставить рекомендации по подходам к доклинической оценке безопасности терапевтических препаратов на основе олигонуклеотидов для поддержки клинической разработки и вывода этих продуктов на рынок. Регулятор отмечает, что доклиническая оценка безопасности олигонуклеотидов представляет собой уникальную задачу. Несмотря на то что в действующих руководствах по низкомолекулярным ЛС и терапевтическим белкам могут упоминаться олигонуклеотиды, данное руководство содержит подробные рекомендации, специфичные для доклинической оценки именно терапевтических олигонуклеотидов, которые были разработаны на основе накопленного к настоящему времени опыта работы с этой категорией ЛС. Предложенные рекомендации учитывают характеристики олигонуклеотидов, отличающие их от низкомолекулярных препаратов и терапевтических белков. Область применения руководства FDA распространяется на одноцепочечные или двухцепочечные олигонуклеотиды, синтезированные или полученные естественным путем, с нативной или модифицированной основной цепью или нуклеозидными структурами, которые

увеличивают или уменьшают экспрессию и/или функцию белков (например, АСО, миРНК, микроРНК, транспортные РНК, олигонуклеотиды-ловушки, аптамеры). Декларировано, что FDA поддерживает принципы 3Rs в отношении использования животных при проведении ДКИ олигонуклеотидов, когда это возможно.

В июне 2024 г. вступило в силу руководство FDA, посвященное клинко-фармакологическим аспектам разработки олигонуклеотидных лекарственных препаратов²³. Рекомендации агентства призваны обеспечить единообразие подходов при разработке терапевтических олигонуклеотидов с учетом их уникальных фармакологических свойств, а также ввиду наличия специфических регуляторных трудностей при разработке данного класса препаратов. В этом руководстве олигонуклеотиды определяются как обширный класс синтетически модифицированных РНК или гибридов РНК/ДНК, разработанных для специфического связывания с целевыми последовательностями РНК с целью изменения экспрессии РНК и/или последующей экспрессии белков. Олигонуклеотиды могут различаться по механизму действия, структуре, химическим модификациям, размеру, последовательности, стратегии доставки, а также по наличию или отсутствию других функциональных групп, таких как малые молекулы, белки или антитела. Руководство акцентирует внимание спонсоров на необходимости при проведении КИ олигонуклеотидов оценивать следующие риски: удлинение QTc-интервала, иммуногенность, нарушение функции печени и почек, а также лекарственные взаимодействия.

В целях ускорения вывода на рынок воспроизведенных олигонуклеотидных препаратов FDA в 2022 г. выпустило проекты руководств (Draft Guidance), посвященных разработке воспроизведенных препаратов нусинерсена²⁴, этеплирсена²⁵, инотерсена²⁶ и патисирана²⁷. Первые три ЛС представляют собой АСО; патисиран — это миРНК. Также FDA опубликовало комплекс руководств, посвященных разработке индивидуализированных антисмысловых олигонуклеотидов для лечения ультраредких заболеваний, в частности для коррекции единичной в мире генетической мутации (подход «N-of-1 trial», single-patient clinical trials). Среди этих документов: проект руководства по ДКИ

²¹ <https://www.pmda.go.jp/files/000263163.pdf>

²² Nonclinical safety assessment of oligonucleotide-based therapeutics: Draft guidance for industry. FDA; 2024.

²³ <https://www.fda.gov/media/180045/download>

²⁴ https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/PSG_209531.pdf

²⁵ https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/PSG_206488.pdf

²⁶ https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/PSG_211172.pdf

²⁷ https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/psg/PSG_210922.pdf

индивидуальных антисмысловых олигонуклеотидов²⁸, руководства для спонсора по подаче заявки на проведение исследований²⁹.

Европейское агентство по лекарственным средствам (ЕМА)

Директива ЕС 2001/83/ЕС (в актуальной редакции Annex I), которая определяет регуляторные правила разработки высокотехнологичных лекарственных препаратов, напрямую не упоминает олигонуклеотиды. Согласно отчету британского государственного инновационного центра Medicines Discovery Catapult, химически синтезированные нуклеиновые кислоты (например, миРНК, матричные РНК и антисмысловые олигонуклеотиды) не относятся ни к биологическим лекарственным препаратам, ни к традиционным низкомолекулярным соединениям (молекулярная масса которых обычно составляет менее 900 г/моль) и классифицируются регуляторами как химические ЛС³⁰.

ЕМА долгое время рассматривало олигонуклеотиды в рамках документов по химическим субстанциям. Однако в настоящее время агентство вводит для них точечное регулирование, представив проект руководства по разработке и производству данного класса препаратов³¹. Общественное обсуждение документа было завершено в конце 2025 г. Руководство освещает вопросы, связанные с конъюгацией, активными субстанциями в форме растворов, разработкой готовых лекарственных форм, созданием воспроизведенных олигонуклеотидных препаратов, а также подходами к персонализированной медицине. Также устраняется пробел в правилах для синтетических олигонуклеотидов, которые ранее не полностью подпадали под требования для малых молекул (ICH Q3A/B) или биотехнологических продуктов.

Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (ИЧН)

В настоящее время не существует руководства ИЧН, посвященного ДКИ терапевтических олигонуклеотидов. Для преодоления регуляторного вакуума в данной области в 2024 г. была создана рабочая группа для разработки руководства по ДКИ безопасности

олигонуклеотидов (ICH S13)³². В документе отмечено, что олигонуклеотиды отличаются от биотехнологических лекарственных препаратов (биофармацевтических препаратов) и малых молекул по ряду характеристик, влияющих на профиль безопасности, включая фармакокинетику, внемишенные (off-target) эффекты и критерии выбора видов лабораторных животных. Указано, что документ ICH M3(R2) не в полной мере учитывает уникальные свойства олигонуклеотидов, а в ICH S6(R1) содержится лишь упоминание этого класса препаратов. Отсутствие конкретных руководящих принципов ИЧН для ОНП приводит к принятию индивидуальных решений, что потенциально препятствует разработке эффективных стратегий. Сложившаяся ситуация свидетельствует о необходимости согласования стратегий изучения безопасности в рамках специализированного руководства. Решить эту проблему возможно путем создания современного нормативного документа, который охватывает динамичные научные достижения в этой области и одновременно является подробным техническим руководством, актуальным для разработки терапевтических олигонуклеотидов для всех популяций, включая педиатрическую.

В 2017 г. под эгидой Европейской федерации фармацевтической промышленности и ассоциаций (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations – EFPIA) была создана Рабочая группа по доклинической безопасности олигонуклеотидов (Oligonucleotide Nonclinical Safety Working Group – OSWG). В настоящее время эта организация представляет собой ведущий международный консорциум, объединяющий экспертов из фармацевтической индустрии, научных кругов и регулирующих органов. OSWG работает над ускорением безопасной разработки олигонуклеотидов, объединяя экспертов из различных областей для формирования передовых практик, позволяющих уверенно переносить терапевтические подходы из сферы научных исследований в клиническую практику. Сфера деятельности OSWG включает:

- разработку четких, гармонизированных стандартов оценки безопасности;

²⁸ Nonclinical testing of individualized antisense oligonucleotide drug products for severely debilitating or life-threatening diseases: Guidance for industry. FDA; 2021.

²⁹ IND submissions for individualized antisense oligonucleotide drug products: Administrative and procedural recommendations. Guidance for sponsor-investigators. FDA; 2021.

IND submissions for individualized antisense oligonucleotide drug products for severely debilitating or life-threatening diseases: Clinical recommendations. Guidance for sponsor-investigators. FDA; 2021.

³⁰ Proposed definition of 'complex medicine': identifying technologies requiring innovation and support. Medicines Discovery Catapult; 2018. <https://md.catapult.org.uk/wp-content/uploads/2021/04/Proposed-Definition-of-Complex-Medicines.pdf>

³¹ Guideline on the development and manufacture of oligonucleotides. EMA/CHMP/CVMP/QWP/262313/2024. EMA; 2024.

³² Final concept paper: Nonclinical safety evaluation of oligonucleotide-based therapeutics (S13). ICH; 2024. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_S13EWG_Concept_Paper_2024_1028.pdf

- стимулирование прозрачного обмена данными между всеми заинтересованными сторонами;
- поддержку инноваций при неизменном приоритете безопасности пациентов³³.

OSWG занимается решением специфических проблем безопасности, которые не всегда вписываются в стандартные протоколы для малых молекул или традиционных биопрепаратов [24]. OSWG публикует подробные рекомендации по ключевым аспектам доклинической разработки олигонуклеотидов, так называемые Белые книги (White Papers). Работа ведется по конкретным направлениям, включая фармакокинетику [25], генотоксичность [26], репродуктивную токсичность [27] и др.

Для системной оценки безопасности олигонуклеотидов необходим комплексный анализ рисков, обусловленных их уникальной нуклеотидной последовательностью, особенностями химической структуры и системой доставки. Основные категории потенциальной токсичности, выявляемые на ранних этапах доклинических исследо-

ваний, систематизированы в *таблице 1* [6, 8, 24]. *Таблица 1* на английском языке представлена в Приложении 1 (размещено на сайте журнала).

Представленная таблица обобщает ключевые риски, характерные для ОНП. Однако данный перечень механизмов и их проявлений не является исчерпывающим и может расширяться по мере накопления новых данных, что требует индивидуального подхода к дизайну ДКИ для каждого конкретного препарата.

ОБСУЖДЕНИЕ

Олигонуклеотиды нельзя в полной мере отнести ни к малым синтетическим молекулам, ни к биотехнологическим препаратам (*табл. 2*).

Олигонуклеотиды представляют собой химически синтезированные соединения и содержат химические модификации. По показателям мишень- и видоспецифичности эти препараты занимают промежуточное положение между малыми молекулами и биологическими препаратами: они разработаны для гибридизации со специфическими нуклеотидными последовательностями,

Таблица 1. Анализ основных рисков безопасности и механизмов токсичности терапевтических олигонуклеотидов
Table 1. Analysis of the main safety risks and toxicity mechanisms of therapeutic oligonucleotides*

Категория риска	Механизм возникновения рисков	Потенциальные проявления рисков (примеры)
Целевые эффекты	Чрезмерное фармакологическое действие, превышающее адаптационные возможности организма	– Снижение уровня целевого белка ниже физиологической нормы; – Токсическое действие в нецелевых органах из-за системного распределения
Нецелевые эффекты, связанные с гибридизацией	Комплементарное связывание олигонуклеотида с нецелевыми транскриптами из-за схожести нуклеотидных последовательностей	– Непреднамеренное подавление экспрессии сторонних структурных или функциональных белков; – Нарушение стабильности клеточного транскриптома
Нецелевые эффекты, не связанные с гибридизацией	Прямое физическое (аптамер-подобное) взаимодействие молекулы олигонуклеотида с клеточными или плазменными белками	– Нарушение каскадов свертывания крови при связывании с факторами коагуляции; – Конкурентное ингибирование регуляторных белков, рецепторов или ферментов
Иммунотоксичность	Распознавание олигонуклеотида рецепторами врожденного иммунитета. Индукция адаптивного ответа	– Активация паттерн-распознающих рецепторов (TLR, RIG-I) и выброс провоспалительных цитокинов; активация системы комплемента – Индукция антиолигонуклеотидных антител
Токсичность, связанная с химическими модификациями и системами доставки	Химические модификации замедляют метаболизм ОНП, вызывая их депонирование в тканях-мишенях (в т.ч. GalNAc в гепатоцитах) и органах выведения. Взаимодействие фосфоротиоатной цепи АСО с комплексом тенасы в каскаде свертывания	– Пролонгированное действие, сопряженное с высокой локальной нагрузкой на печень (в т.ч. GalNAc-опосредованное накопление в гепатоцитах) и почки; – Увеличение времени свертывания крови

Таблица составлена авторами по данным [6, 8, 24] / The table was prepared by the authors based on data from references [6, 8, 24]

Примечание. АСО – антисмысловые олигонуклеотиды; ОНП – олигонуклеотидные препараты (олигонуклеотиды); GalNAc – N-ацетилгалактозамин; RIG-I – ретиноевая кислота-индуцируемый ген I; TLR – толл-подобные рецепторы.

* *Таблица 1* на английском языке представлена в Приложении 1 (размещена на сайте журнала³⁴).

* *Table 1* in English is presented in Supplementary material 1 (available on the journal's website³⁵).

³³ <https://oswg.net/about-us/>

³⁴ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-262-275-annex>

³⁵ Там же.

С точки зрения СМС³⁶ (Chemistry, Manufacturing, and Controls) синтетические олигонуклеотиды находятся на стыке малых молекул и биологических препаратов: олигонуклеотиды полностью или частично исключены из сферы применения ICH Q3A/B, ICH Q6A/B и ICH M7. В отраслевой литературе (аналитические обзоры, финансовая отчетность крупных фармацевтических корпораций) достаточно часто олигонуклеотиды называют «комплексные малые молекулы» (complex small molecules) или «комплексные

синтетические лекарственные препараты» (complex synthetic medicines). Так, в статье, опубликованной на сайте британской компании CatSci Ltd, которая специализируется на химической разработке и технологиях синтеза ЛС, дано следующее определение этому понятию: комплексные синтетические лекарственные препараты представляют собой терапевтические агенты химического происхождения, отличительными признаками которых являются сложность пространственной структуры, многостадийный синтез и, зачастую, высокая специфичность механизма действия. Подобные препараты занимают особое положение между традиционными малыми молекулами и крупномолекулярными биологическими лекарственными препаратами (биопрепаратами), сочетая в себе преимущества обоих классов и одновременно нивелируя их характерные недостатки, и именно к комплексным синтетическим лекарственным препаратам отнесены

Table 2. Characteristics of oligonucleotides in comparison with small molecules and biologics

Характеристики <i>Characteristics</i>	Малые молекулы <i>Small molecules</i>	Олигонуклеотиды <i>Oligonucleotides</i>	Биологические препараты <i>Biologics</i>
Способ получения <i>Manufacturing method</i>	Химический синтез <i>Chemical synthesis</i>	Твердофазный химический синтез <i>Solid-phase chemical synthesis</i>	Биотехнологический <i>Biotechnological production</i>
Молекулярная масса <i>Molecular weight</i>	<500 Да <i><500 Da</i>	~ 5–15кДа <i>~ 5–15 kDa</i>	до 150 кДа <i>up to 150 kDa</i>
Антигенность <i>Antigenicity</i>	Низкая <i>Low</i>	Средняя <i>Moderate</i>	Высокая <i>High</i>
Нецелевая токсичность <i>Off-target toxicity</i>	Высокая <i>High</i>	Средняя <i>Moderate</i>	Низкая <i>Low</i>
Катаболизм <i>Catabolism</i>	Минимальный <i>Minimal</i>	Умеренный <i>Intermediate</i>	Интенсивный <i>Extensive</i>
Метаболизм <i>Metabolism</i>	Интенсивный <i>Extensive</i>	Умеренный <i>Intermediate</i>	Минимальный <i>Minimal</i>
Длительность <i>Duration</i>			
Период полужизни в крови <i>Plasma half-life</i>	Короткий <i>Short</i>	Умеренный <i>Intermediate</i>	Длительный <i>Long</i>
Период полужизни в тканях <i>Tissue half-life</i>	Умеренный <i>Moderate</i>	Очень длительный <i>Very long</i>	Неприменимо <i>Not applicable</i>
Регуляторные документы <i>Regulatory guidance</i>	ICH M3(R2)	ICH M3(R2) ICH S6 (R1) ICH S13 ^a Руководство FDA ^b / <i>FDA Guidance^b</i> Руководство PMDA ^c / <i>PMDA Guidance^c</i>	ICH S6 (R1)

^c Guideline for preclinical safety assessment of oligonucleotide therapeutics. PSEHB/PED Notification No. 0330-1. PMDA; 2020.

³⁶ Concept paper on the establishment of a guideline on the development and manufacture of synthetic oligonucleotides. EMA/CHMP/QWP/735423/2022. EMA: 2022.

олигонуклеотиды³⁷. Двойственность природы олигонуклеотидов является одной из причин недостаточности существующей нормативной базы, что обуславливает наличие своеобразного регуляторного барьера, препятствующего их выводу на рынок [23].

Консалтинговая компания Zwiers Regulatory Consultancy (входит в состав ProductLife Group) в 2023 г. опубликовала аналитический обзор, подробно описывающий ключевые проблемы регуляторного сопровождения и разработки ОНП. Отмечено, что, хотя за последние годы фарминдустрия и регуляторные органы накопили обширный опыт работы с этим классом ЛС, для их успешной разработки необходимо учитывать существующие вызовы на уровне контроля качества, ДКИ и КИ, нормативно-правового регулирования. Успешный вывод на рынок таких препаратов требует комплексного преодоления этих барьеров³⁸.

Научное сообщество активно участвует в преодолении регуляторного барьера. Определены области, наиболее остро нуждающиеся в регуляторной определенности и гармонизации. В частности, выделены стратегии оценки нецелевой токсичности (off-target токсичность), фармакологической безопасности, общетоксических свойств (токсичности при многократном введении), выбора первой дозы для человека (first-in-human), генотоксичности, репродуктивной токсичности и токсического воздействия на внутриутробное развитие, оценки канцерогенности, а также надлежащего использования суррогатных молекул в процессе разработки [6].

Представляет интерес обзор агентства Charles River, посвященный адаптации ДКИ АСО и мРНК к меняющимся требованиям регуляторных органов³⁹ (табл. 3). Услуги компании Charles River Laboratories (CRL) весьма востребованы и интегрированы в процесс создания новых лекарств в США⁴⁰.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Терапевтические олигонуклеотиды — это класс инновационных биофармацевтических препаратов, представляющих собой короткие синтетические фрагменты ДНК или РНК, разработанные для высокоспецифичного изменения экспрессии генов или модуляции функций белков-мишеней на молекулярном уровне. В отличие от классических малых молекул, блокирующих активные

центры белков, терапевтические олигонуклеотиды работают преимущественно на уровне генетической информации (РНК или ДНК), позволяя «выключать», корректировать или восстанавливать работу дефектных генов. Олигонуклеотидная терапия динамично развивается, разрабатываются новые типы препаратов, которые реализуют не использовавшиеся ранее механизмы фармакологического действия. Простота синтеза новых библиотек комплементарных олигонуклеотидов под конкретный целевой белок значительно облегчает подбор их оптимального дизайна, однако эта простота нивелируется сложностями с разработкой систем доставки к месту реализации целевого эффекта.

Таким образом, с одной стороны, олигонуклеотиды похожи на биологические препараты (обладают естественными высокоспецифичными биологическими механизмами действия), с другой — изготавливаются синтетическим путем и обычно включают химические модификации для повышения стабильности, эффективности и/или долговечности. Этот дуализм не в полной мере укладывается в жесткие рамки существующих регуляторных норм, что порой приводит у спонсоров и органов здравоохранения к отсутствию ясности по многим вопросам, связанным с разработкой терапевтических олигонуклеотидов. Решению этой проблемы должно способствовать создание гармонизированного руководства по доклиническим исследованиям, учитывающего уникальные характеристики олигонуклеотидов, отличающие их от низкомолекулярных препаратов и терапевтических белков. Локальные руководства по доклинической оценке безопасности олигонуклеотидов, предложенные PMDA и FDA, являются промежуточным этапом перед выходом глобального гармонизированного руководства ICH S13, разработка которого ведется международными регуляторами. Поскольку в Российской Федерации и ЕАЭС отсутствуют руководства по доклиническим исследованиям олигонуклеотидов, а в соответствии с Программой фундаментальных научных исследований на период 2021–2030 гг. заявлено создание технологий подавления работы поврежденных генов с помощью олигонуклеотидов, представляется целесообразной разработка рамочного документа, регламентирующего проведение доклинических исследований этого класса препаратов.

³⁷ Renny J. Complex synthetic medicines: Unlocking the next frontier in drug development. CatSci. 2025. <https://catsci.com/library/defining-complex-synthetic-medicines>

³⁸ Zwiers regulatory consultancy. Oligonucleotide therapy: Regulatory & development challenge. <https://www.productlifegroup.com>

³⁹ <https://www.criver.com/insights/regulatory-strategy-oligonucleotide-therapeutics>

⁴⁰ <https://www.finam.ru/publications/item/charles-river-maloizvestnaya-pravaya-ruka-farmsektora-20220706-155511/>

Таблица 3. Стратегическая матрица: научное обоснование и регуляторные ожидания для применения антисмысловых одноцепочечных олигонуклеотидов и миРНК
Table 3. Strategic matrix: scientific rationale and regulatory expectations for applications of antisense oligonucleotides and small interfering RNAs*

Ключевой аспект	Текущая реальность и вызовы	Ожидания регуляторных органов (FDA, EMA)	Стратегическое решение по снижению рисков для разработчика
Регуляторные подходы	Олигонуклеотиды занимают промежуточное положение между малыми молекулами и биологическими препаратами	Отказ от шаблонов Шаблонные подходы к ДКИ не принимаются. Требуется индивидуальная адаптация программы ДКИ под свойства конкретной молекулы	Интеграция регуляторного планирования на этапе ранней разработки. Отказ от стандартных подходов и использование специфического дизайна ДКИ
Механизм действия ЛС	Олигонуклеотиды могут вызывать непреднамеренную (нецелевую, <i>off-target</i>) или класс-специфическую токсичность	Четкое обоснование Требуется глубокое понимание, как достигается эффект, и доказательство релевантности тест-систем, использованных для изучения безопасности	Четко и последовательно сформулировать биологическую логику исследования; интерпретировать сигналы безопасности строго в контексте механизма действия
Интерпретация фармакокинетических эффектов (экспозиции)	Кратковременное присутствие ЛС в плазме крови сочетается с длительной биологической активностью в тканях	Фокус на распределении в тканях Регуляторы оценивают продолжительность биологического эффекта в целевом органе, а не только фармакокинетические параметры в плазме	Обосновывать выбор дозы и безопасность на основе длительности эффекта в тканях для обеспечения достоверной оценки риска
Дизайн исследований	Стандартные схемы и исторические данные больше не обеспечивают доверия регуляторов	Принцип fit for purpose Взвешенный подбор биомаркеров, конечных точек и сроков исследования, экстраполируемых на человека	Формировать целостный пакет данных, где разные тесты и методы складываются в единую, биологически обоснованную картину
Динамика проекта	Первоначальные гипотезы часто устаревают по мере продвижения программы ДКИ	Гибкость и актуализация Выявление и устранение несоответствий на ранних стадиях разработки, а не перед подачей досье на регистрацию	Регулярно пересматривать ранние допущения по мере развития проекта, поддерживая преемственность данных между этапами
Главный вывод	Успешное прохождение экспертизы становится более предсказуемым для программ с научно документированным подходом в области регуляторной токсикологии, что обеспечивает принятие выверенных решений от разработки концепции до регистрации терапевтического олигонуклеотида		

Таблица составлена авторами по данным источника⁴¹ / The table was prepared by the authors based on data from reference⁴²

Примечание. ЛС — лекарственное средство; ДКИ — доклинические исследования.

* Таблица 3 на английском языке представлена в Приложении 1 (размещена на сайте журнала⁴³).

* Table 3 in English is presented in Supplementary material 1 (available on the journal's website⁴⁴).

Литература/References

- Некипелова АА, Аляутдин РН. Антагонисты PCSK9: эффективность в клинической практике и основные направления создания новых лекарственных средств. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(3):279–91. Nekipelova AA, Alyautdin RN. PCSK9 antagonists: Clinical efficacy and main trends in the development of new medicines. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(3):279–91 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-3-279-291>
- Obexer R, Nassir M, Moody ER, et al. Modern approaches to therapeutic oligonucleotide manufacturing. *Science*. 2024;384(6692):eadl4015. <https://doi.org/10.1126/science.adl4015>
- Мирошниченко СК, Патутина ОА, Зенкова МА. МикроРНК-направленные олигонуклеотидные конструкции с различным механизмом действия для эффективного подавления процессов канцерогенеза. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(2):140–56. Miroshnichenko SK, Patutina OA, Zenkova MA. miRNA-targeting oligonucleotide constructs with various mechanisms of action as effective inhibitors of carcinogenesis. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2024;24(2):140–56 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-2-140-156>
- Al Bardawil S, Barthélémy P, Ferey L. Advances in analysis of therapeutic oligonucleotides with chromatography coupled to mass spectrometry. *Anal Chem*. 2026;98(15):10895–912. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5c06656>
- Cronin JM, Yu AM. Small RNA or oligonucleotide drugs and challenges in evaluating drug–drug interactions. *Front Pharmacol*. 2025;16:1720361. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1720361>
- Sisler JD, Andersson P, Brown A, et al. An industry perspective on key considerations for the ICH S13 Guidance: Nonclinical safety evaluations of oligonucleotide-based therapeutics. *Int J Toxicol*. 2026;45(2):127–35. <https://doi.org/10.1177/10915818261417235>
- Azari S, Manellari S, Anderluzzi G, et al. Relevant factors to guarantee quality of oligonucleotide-based products. *Int J Pharm*. 2026;687:126393. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.126393>
- Hirabayashi Y, Maki K, Kinoshita K, et al. Considerations of the Japanese Research Working Group for the ICH S6 & related issues regarding nonclinical safety assessments of oligonucleotide therapeutics: Comparison with those of biopharmaceuticals. *Nucleic Acid Ther*. 2021;31(2):114–25. <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0879>
- Miroshnichenko SK, Patutina OA, Burakova EA, et al. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(4):1229–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813376116>
- Maretina M, Il'ina A, Egorova A, et al. Development of 2'-O-methyl and LNA antisense oligonucleotides for SMN2 splicing correction in SMA cells. *Biomedicines*. 2023;11(11):3071. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11113071>
- Стеценко ДА, Челобанов БП, Фокина АА, Буракова ЕА. Модифицированные олигонуклеотиды, активирующие РНКазу Н. Патент Российской Федерации № 2740501; 2021. Stetsenko DA, Chelobanov BP, Fokina AA, Burakova EA. Modified oligonucleotides which activate RNase H. Patent of the Russian Federation No. 2740501; 2021 (In Russ.). EDN: SXETGG

⁴¹ <https://www.criver.com/insights/regulatory-strategy-oligonucleotide-therapeutics>

⁴² Там же.

⁴³ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-262-275-annex>

⁴⁴ Там же.

12. Копылов АМ, Головин АВ, Павлова ГВ и др. Модифицированные 50-звенные ДНК-аптамеры, связывающие внеклеточный домен EGFR. Патент Российской Федерации № 2736790; 2019. Kopylov AM, Golovin AV, Pavlova GV, et al. Modified 50-link DNA-aptamers linking extracellular domain EGFR. Patent of the Russian Federation No. 2736790; 2019 (In Russ.). EDN: [RZTXPG](https://doi.org/10.25205/978-5-4437-1843-9-355)
13. Риппинен ДВ, Воробьева МА, Соловьева АО, Королев МА. Анализ противовоспалительной активности ДНК-аптамеров к ФНО-α на *in vitro* модели ревматоидного артрита. В кн.: *Материалы XII Российского форума биотехнологий OpenBio-2025*. Новосибирск; 2025. Rippinen DV, Vorobyeva MA, Solovieva AO, Korolev MA. Analysis of the anti-inflammatory activity of TNF-α specific DNA aptamers using an *in vitro* model of rheumatoid arthritis. In: *Proceedings of the XII Russian Biotechnology Forum OpenBio-2025*. Novosibirsk; 2025 (In Russ.). <https://doi.org/10.25205/978-5-4437-1843-9-355>
14. Хаитов МР, Шиловский ИП, Никонова АА, Мазуров ДВ. Способ профилактики и лечения бронхиальной астмы, осложняющих ее респираторных вирусных инфекций и других воспалительных заболеваний дыхательных путей. Патент Российской Федерации № 2526146; 2014. Khaitov MR, Shilovskij IP, Nikonova AA, Mazurov DV. Method for preventing and treating bronchial asthma, complicating respiratory viral infections and other respiratory inflammatory diseases. Patent of the Russian Federation No. 2526146; 2014 (In Russ.). EDN: [IBVEEW](https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7)
15. Delre P, Cerchia C, Lavecchia A. Artificial intelligence in the development of small nucleic acid therapeutics: toward smarter and safer medicines. *Drug Discov Today*. 2025;30(11):104488. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2025.104488>
16. Herkt M, Thum T. Pharmacokinetics and proceedings in clinical application of nucleic acid therapeutics. *Mol Ther*. 2021;29(2):521–39. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.11.008>
17. Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(10):673–94. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>
18. Sun X, Settrerrahmane S, Li C, et al. Nucleic acid drugs: Recent progress and future perspectives. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9:316. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02035-4>
19. Хаитов МР, Никонова АА, Шиловский ИП и др. МИР 19® – первый в мире специфический противовирусный препарат для лечения COVID-19: разработка и доклинические исследования. *Иммунология*. 2023;44(3):270–90. Khaitov MR, Nikonova AA, Shilovskiy IP, et al. MIR 19® is the world's first specific antiviral drug for the treatment of COVID-19: Development and preclinical studies. *Immunologiya*. 2023;44(3):270–90 (In Russ.). <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2023-44-3-270-290>
20. Liu M, Wang Y, Zhang Y, et al. Landscape of small nucleic acid therapeutics: moving from the bench to the clinic as next-generation medicines. *Signal Transduct Target Ther*. 2025; 10(1):73. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02112-8>
21. Kisakova LA, Apartsin EK, Nizolenko LF, Karpenko LI. Dendrimer-mediated delivery of DNA and RNA vaccines. *Pharmaceutics*. 2023;15(4):1106. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041106>
22. Kumar V, Turnbull WB. Targeted delivery of oligonucleotides using multivalent protein-carbohydrate interactions. *Chem Soc Rev*. 2023;52(4):1273–87. <https://doi.org/10.1039/d2cs00078f>
23. Tessier Y, Achanzar W, Mihalciuk L, et al. Outcomes of the European Federation of pharmaceutical industries and associations oligonucleotide working group survey on nonclinical practices and regulatory expectations for therapeutic oligonucleotide safety assessment. *Nucleic Acid Ther*. 2021;31(1):7–20. <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0892>
24. Goyenvalle A, Jimenez-Mallebrera C, van Roon W, et al. Considerations in the preclinical assessment of the safety of antisense oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther*. 2023;33(1):1–16. <https://doi.org/10.1089/nat.2022.0061>
25. Berman CL, Antonsson M, Batkai S, et al. OSWG recommended approaches to the nonclinical pharmacokinetic (ADME) characterization of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther*. 2023;33(5):287–305. <https://doi.org/10.1089/nat.2023.0011>
26. Berman CL, Barros SA, Galloway SM, et al. OSWG recommendations for genotoxicity testing of novel oligonucleotide-based therapeutics. *Nucleic Acid Ther*. 2016;26(2):73–85. <https://doi.org/10.1089/nat.2015.0534>
27. Cavagnaro J, Berman C, Kornbrust D, et al. Considerations for assessment of reproductive and developmental toxicity of oligonucleotide-based therapeutics. *Nucleic Acid Ther*. 2014;24(5):313–25. <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0490>

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

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-262-275-annex>
Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Г.Н. Енгальчева** – концепция работы, анализ и систематизация данных литературы, написание текста рукописи; **Р.Д. Сюбаев** – критический пересмотр содержания, переработка, формулировка выводов; **А.А. Берчатова** систематизация данных регуляторных документов; **О.В. Астапова** – графическое оформление рукописи; **Д.В. Горячев** – критический пересмотр текста рукописи и иллюстративного материала; **В.А. Меркулов** – участие в формулировке выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Использование генеративного искусственного интеллекта. Авторы заявляют, что не использовали генеративный ИИ при подготовке рукописи.

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

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-262-275-annex>

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **G.N. Engalycheva** conceptualized, analyzed, and systematized literature data, and drafted the manuscript. **R.D. Syubaev** critically reviewed the content, revised it, and formulated the conclusions. **A.A. Berchatova** systematized data from regulatory documents. **O.V. Astapova** graphically designed the manuscript. **D.V. Goryachev** critically reviewed the text of the manuscript and illustrative material. **V.A. Merkulov** participated in formulating the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication.

Use of generative artificial intelligence. The authors declare that no generative AI was used during the preparation of this manuscript.

Об авторах / Authors

Енгальчева Галина Нинелевна, канд. биол. наук / **Galina N. Engalycheva**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5121-0858>

Сюбаев Рашид Даутович, д-р мед. наук / **Rashid D. Syubaev**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6729-2349>

Берчатова Анастасия Александровна / **Anastasia A. Berchatova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1462-2911>

Астапова Оксана Вадимовна / **Oksana V. Astapova**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3089-8395>

Горячев Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук / **Dmitry V. Goryachev**, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8583-2372>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. / **Vadim A. Merkulov**, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 10.06.2026

После доработки 11.08.2026

Принята к публикации 25.09.2026

Received June 10, 2026

Revised August 11, 2026

Accepted September 25, 2026

Введение хорькам мРНК-вакцины mRNA-H5 методом струйной инъекции формирует защитный иммунитет в отношении вируса гриппа подтипа H5N1

В.Р. Литвинова , А.С. Гудымо , В.А. Яковлев , М.Б. Боргоякова ,
Е.В. Старостина , Е.В. Яковлева , К.И. Иванова , О.Н. Перфильева ,
К.П. Макарова , Д.И. Вахитов , Н.В. Данильченко , М.Л. Егорова,
Н.Н. Васильцова , С.В. Шарабрин , Н.Б. Рудомётова , Д.Н. Кисаков ,
Л.А. Кисакова , Т.Н. Ильичёва , В.Ю. Марченко , Л.И. Карпенко ,
А.А. Ильичёв , А.П. Рудомётов 

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

✉ Литвинова Виктория Руслановна; litvinova_vr@vector.nsc.ru; viktoriya_litvinova_1999@mail.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Высокопатогенный вирус гриппа птиц подтипа H5Nx быстро эволюционирует и заражает различные виды диких и домашних млекопитающих, включая крупный рогатый скот, что подчеркивает его пандемический потенциал для человека. Для борьбы с угрозой пандемии необходимо разрабатывать подходящие вакцинные платформы, к которым относятся мРНК-вакцины, их эффективность во многом зависит от системы доставки. Данное исследование посвящено оценке иммуногенности и протективности мРНК-вакцины mRNA-H5, доставленной с помощью липидных наночастиц (LNP) и струйной инъекции (СИ).

ЦЕЛЬ. Изучение иммуногенных и протективных свойств экспериментальной мРНК-вакцины mRNA-H5 на модели хорьков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Проведена двухкратная иммунизация хорьков мРНК-вакциной mRNA-H5 в дозе 30 мкг в комплексе с LNP и в дозе 100 мкг при введении СИ. Сыворотки иммунизированных хорьков исследованы методами иммуноферментного анализа (ИФА) на рекомбинантном белке HA/H5, ELISpot с использованием пула специфических пептидов и вируснейтрализации в культуре клеток MDCK-SIAT1 с использованием штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Произведено интраназальное заражение иммунизированных хорьков 5 LD₅₀ штамма вируса гриппа A/dalmatian pelican/Kalmykia/330-10V/2023 (H5N1) и регистрация состояния хорьков в течение 14 сут после заражения.

РЕЗУЛЬТАТЫ. С помощью метода ИФА установлены титры специфических антител в группах животных, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5 с помощью СИ и в составе LNP; средние титры в группах составили 1:180 000 и 1:4 000 000 соответственно. С помощью метода вируснейтрализации показано, что сыворотки животных, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5 с помощью СИ и в составе LNP, обладают вируснейтрализующей активностью; средние 50% нейтрализующие титры составили 1:250 и 1:1500 соответственно. Методом ELISpot показано, что в группах хорьков, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5, активируется специфический клеточный иммунитет. Иммунизация обеспечивала 100% защиту хорьков от гибели при заражении 5 LD₅₀ штамма вируса гриппа A/dalmatian pelican/Kalmykia/330-10V/2023 (H5N1).

ВЫВОДЫ. Результаты исследования свидетельствуют о высокой эффективности активации вирус-специфического гуморального и клеточного иммунного ответа у хорьков, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5 в случае доставки СИ и в комплексе с LNP.

Ключевые слова: мРНК-вакцина; вирус гриппа H5Nx; струйная инъекция; хорьки; иммуногенность; ИФА; вируснейтрализация; протективность

Для цитирования: Литвинова В.Р., Гудымо А.С., Яковлев В.А., Боргоякова М.Б., Старостина Е.В., Яковлева Е.В., Иванова К.И., Перфильева О.Н., Макарова К.П., Вахитов Д.И., Данильченко Н.В., Егорова М.Л., Васильцова Н.Н., Шарабрин С.В., Рудомётова Н.Б., Кисаков Д.Н., Кисакова Л.А., Ильичёва Т.Н., Марченко В.Ю., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А., Рудомётов А.П. Введение хорькам мРНК-вакцины mRNA-H5 методом струйной инъекции формирует защитный иммунитет в отношении вируса гриппа подтипа H5N1. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(3):276–286. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-276-286>

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.

Administration of the mRNA-H5 vaccine to ferrets via jet injection provides protective immunity against the H5N1 influenza virus

Victoria R. Litvinova , Andrei S. Gudymo , Vladimir A. Yakovlev , Mariya B. Borgoyakova , Ekaterina V. Starostina , Elena V. Yakovleva , Ksenia I. Ivanova , Olga N. Perfil'yeva , Kristina P. Makarova , Danil I. Vahitov , Natalia V. Danilchenko , Marina L. Egorova, Natalya N. Vasil'tsova , Sergei V. Sharabrin , Nadezhda B. Rudometova , Denis N. Kisakov , Lyubov A. Kisakova , Tatiana N. Ilyicheva , Vasiliy Yu. Marchenko , Larisa I. Karpenko , Alexander A. Ilyichev , Andrey P. Rudometov 

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation

✉ Victoria R. Litvinova; litvinova_vr@vector.nsc.ru; viktoriya_litvinova_1999@mail.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The highly pathogenic avian influenza virus subtype H5Nx is rapidly evolving and infecting various species of wild and domestic mammals, including cattle, highlighting its pandemic potential for humans. To combat the pandemic threat, it is essential to develop suitable vaccine platforms, including mRNA vaccines, the efficacy of which largely depends on the delivery system. This study evaluates the immunogenicity and protective efficacy of the mRNA-H5 vaccine, delivered via lipid nanoparticles (LNPs) and jet injection (JI).

AIM. The aim of the study was to evaluate the immunogenic and protective properties of the experimental mRNA-H5 vaccine in a ferret model.

MATERIALS AND METHODS. Ferrets were immunized twice with the mRNA-H5 vaccine at a dose of 30 µg formulated with LNPs and at a dose of 100 µg administered by JI. Sera from immunized ferrets were analyzed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against the recombinant HA/H5 protein, an enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay using a pool of specific peptides, and a virus neutralization assay in MDCK-SIAT1 cell culture using the influenza virus strain A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Immunized ferrets were intranasally challenged with 5 LD₅₀ of the influenza virus strain A/dalmatian pelican/Kalmykia/330-10V/2023 (H5N1), and their status was recorded for 14 days after challenge.

RESULTS. Using ELISA, it was established that specific antibody titers were determined in groups of animals immunized with the mRNA-H5 vaccine administered by JI or formulated with LNPs; the average titers in the groups were 1:180,000 and 1:4,000,000, respectively. Using the virus neutralization assay, sera from animals immunized with the mRNA-H5 vaccine administered by JI or formulated with LNPs had virus-neutralizing activity; the average 50% neutralizing titers were 1:250 and 1:1500, respectively. The ELISpot assay showed that in groups of ferrets immunized with the mRNA-H5 vaccine, specific cellular immunity was induced. Immunization with the mRNA-H5 vaccine provided 100% protection against mortality in ferrets challenged with 5 LD₅₀ of the influenza virus strain A/dalmatian pelican/Kalmykia/330-10V/2023 (H5N1).

CONCLUSIONS. This study demonstrated the effective induction of virus-specific humoral and cellular immune responses in ferrets immunized with the mRNA-H5 vaccine administered by JI or formulated with LNPs.

Keywords: mRNA vaccine; H5Nx influenza virus; jet injection; ferrets; immunogenicity; ELISA; virus neutralization; protective efficacy

For citation: Litvinova V.R., Gudymo A.S., Yakovlev V.A., Borgoyakova M.B., Starostina E.V., Yakovleva E.V., Ivanova K.I., Perfilieva O.N., Makarova K.P., Vahitov D.I., Danilchenko N.V., Egorova M.L., Vasiltsova N.N., Sharabrin S.V., Rudometova N.B., Kisakov D.N., Kisakova L.A., Ilyicheva T.N., Marchenko V.Yu., Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Rudometov A.P. Administration of the mRNA-H5 vaccine to ferrets via jet injection provides protective immunity against the H5N1 influenza virus. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(3):276–286. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-276-286>

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

Высокопатогенные вирусы птичьего гриппа вызывают серьезную обеспокоенность из-за их пандемического потенциала. Основные риски связаны с возможностью мутаций, которые могут привести к устойчивой передаче вируса от человека к человеку. В настоящее время случаи передачи птичьего гриппа, как правило, связаны с тесным контактом с инфицированными животными [1, 2]. По данным Всемирной организации здравоохранения, по состоянию на 22.01.2026 зафиксировано 993 случая заражения людей вирусом гриппа H5N1, из которых 477 привели к смертельному исходу¹.

В 2024 г. вирус гриппа подтипа H5N1 клады 2.3.4.4b был впервые выявлен у молочного скота. За этим последовало документирование первого случая межвидовой передачи от крупного рогатого скота к работникам молочных ферм [3, 4]. Вирусологические и эпидемиологические исследования показали, что штамм A/Texas/37/2024, передавшийся от животных человеку, характеризуется повышенной вирулентностью и трансмиссивностью. Эксперименты на мышах и хорьках подтвердили возможность его передачи воздушно-капельным путем. Кроме того, штамм A/Texas/37/2024 содержит ключевую адаптационную аминокислотную замену E627K в белке

полимеразного комплекса PB2, связанную с повышением репродукции вируса в клетках млекопитающих [5, 6], что потенциально повышает риск дальнейшей адаптации патогена к хозяину.

Быстрая эволюция высокопатогенных вирусов гриппа птиц требует разработки гибких и оперативных мер профилактики. В этом контексте мРНК-вакцины рассматриваются как перспективная платформа для быстрого реагирования на возможные новые вспышки. мРНК-вакцины неинфекционны, эффективно индуцируют клеточный и гуморальный иммунный ответ, а их производство может быть налажено в кратчайшие сроки. В настоящее время во всем мире активно разрабатываются мРНК-вакцины для профилактики различных инфекционных заболеваний [7, 8].

Одним из важных вопросов, который нужно решить при разработке мРНК-вакцины, является выбор способа ее внутриклеточной доставки. Липидные наночастицы (LNP) — наиболее распространенный метод доставки мРНК-вакцин. LNP обычно состоят из четырех липидных компонентов, которые обеспечивают эффективную инкапсуляцию и высвобождение мРНК, длительный период циркуляции в организме и стабильность комплекса. Дополнительным преимуществом LNP является адъювантный

¹ Human infection with avian influenza A(H5) viruses. Avian influenza weekly update No. 1040. WHO; 2026.

эффект, усиливающий иммунный ответ на вакцину. Однако для LNP характерен ряд недостатков, таких как токсичность, нежелательные явления и реактогенность [9, 10].

В последнее время все больше внимания уделяется альтернативному методу доставки — методу струйной инъекции (СИ), который основан на внутрикожной инъекции под высоким давлением, при этом физическое воздействие на клеточную мембрану повышает ее проницаемость для нуклеиновых кислот. Кроме того, широкое распределение препарата в дерме способствует поглощению мРНК антигенпрезентирующими клетками, что еще больше повышает его иммуногенность. СИ позволяет эффективно доставлять неинкапсулированную мРНК в клетки, что исключает недостатки, связанные с LNP [11].

В рамках наших предыдущих исследований была создана экспериментальная мРНК-вакцина mRNA-H5 для профилактики заболевания, вызываемого высокопатогенным вирусом гриппа птиц подтипа H5Nx. В экспериментах на мышах линии BALB/c продемонстрирована ее высокая иммуногенность [11]. Мышей традиционно используют в качестве модели для изучения патогенеза вируса гриппа, и они имеют ряд преимуществ перед другими лабораторными животными, в том числе низкую стоимость содержания [12]. Однако многие клинические признаки заражения вирусом гриппа, характерные для людей, не проявляются у мышей, что ограничивает применимость этой модели для изучения передачи вируса и течения заболевания [13].

Хорьки как модель являются «золотым стандартом» для оценки доклинической эффективности вакцин и воздушно-капельной передачи вирусов гриппа [14]. Хорьки имеют сходные с людьми физиологию легких, клинические признаки инфекции и распределение клеточных рецепторов сиаловой кислоты в дыхательных путях, что играет важную роль в репликации и проникновении вируса в клетку [15, 16]. Высокая восприимчивость хорьков к вирусу гриппа и способность больных животных передавать вирус здоровым были впервые продемонстрированы в 1933 г. С тех пор хорьки стали незаменимыми в экспериментальных исследованиях, направленных на изучение взаимодействия вируса с организмом хозяина [17]. Например, на модели хорьков проведены исследования мРНК-вакцин для борьбы с заболеванием, вызываемым вирусом гриппа H5N1 [18, 19].

Цель работы — изучение иммуногенных и протективных свойств экспериментальной мРНК-вакцины mRNA-H5 на модели хорьков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Плазмиды. Для синтеза мРНК-вакцины mRNA-H5 использовали плазмиду pVAX-Cas1CC-H5, полученную ранее в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора [11].

Вирусные штаммы. В реакции вируснейтрализации был использован штамм вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) (EPI_ISL_1114749) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). При исследовании протективных свойств мРНК-вакцины mRNA-H5 использовали штамм вируса гриппа A/dalmatian pelican/Kalmykia/330-10V/2023 (H5N1) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Культуры клеток. Использована культура клеток MDCK-SIAT1 (Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Клетки выращивали на среде DMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% фетальной коровьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В. При работе с вирусом использовали поддерживающую среду: среда DMEM, 0,2% бычьего сывороточного альбумина; 2 мкг/мл трипсин ТРСК (Sigma-Aldrich); 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В.

Животные. В работе использовали 8–10 мес. половозрелых самок беспородных хорьков (*Mustela putorius furo*) весом 700–1500 г (ООО «Кэра», Россия). Работу с животными проводили в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных»² и с соблюдением принципов гуманности в соответствии с протоколами, утвержденными Биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Протокол № 3 от 03.04.2025). Более подробное описание экспериментов на животных приведено в Приложении 1 (размещено на сайте журнала³).

Методы

Синтез мРНК *in vitro*

Подготовку матрицы для синтеза мРНК и синтез мРНК проводили по ранее описанному протоколу [11]. В качестве матрицы для синтеза мРНК использовали генетическую

² ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

³ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-276-286-annex>

конструкцию pVAX-Cas1CC-H5, несущую целевой ген под контролем T7-промотора, который был модифицирован для правильного присоединения AG-Cap-аналога. Перед процедурой получения мРНК плазида была линейаризована с использованием эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* (ООО «СибЭнзайм», Россия). Условия реакции (температура, состав буфера и длительность проведения ферментативного гидролиза ДНК) подбирали в соответствии с инструкциями производителя. Для очистки линейной формы плазмиды pVAX-Cas1CC-H5 был проведен электрофорез в 1% агарозном геле с последующим выделением продукта из геля с использованием набора «HiPure Gel DNA Mini Kit» (Magen, Китай).

Синтез мРНК проводили с использованием набора T7 High Yield RNA Synthesis Kit (Yeasen, Китай). Реакционная смесь содержала 1 мкг линейаризованной матрицы; T7-полимеразу с буфером; AG-Cap-аналог кэпа m⁷GmAmG («Биолабмикс», Россия) (6 мМ); смесь рибонуклеозидтрифосфатов (7 мМ), в которой уридин был заменен на N1-метилпсевдоуридин; ингибитор РНКаз («БелБиоЛаб», Россия) и безнуклеазную воду. Смесь инкубировали в течение 3 ч при температуре 37 °С. После инкубации в смесь добавляли 1 мкл ДНКазы I (1 ед. активности/мкл) (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С для разрушения ДНК-матрицы. Выделение синтезированной мРНК из реакционной смеси проводили с помощью осаждения 5М аммония ацетатом, инкубации при минус 20 °С в течение 1 ч и последующей промывки 70% этанолом. Осадок мРНК подсушивали при комнатной температуре и растворяли в безнуклеазной воде.

Получение липидных наночастиц (LNP)

LNP получали методом быстрого микрофлюидного смешивания водной и органической фаз. Водная фаза содержала мРНК mRNA-H5 в 100 мМ цитратном буфере (pH 4). Органическая фаза представляла собой смесь растворенных в 96% этаноле липидов в молярном процентном соотношении: ионизируемый липид SM-102 – 50%; нейтральный фосфолипид DSPC – 10%; холестерин – 38,5%; ПЭГ-липид (DMG-PEG2000) – 1,5%. Препараты липидов были получены от AVT Pharmaceutical Tech Co. (КНР). Фазы смешивали с использованием прибора Automated NP System (Dolomite Microfluidics, Великобритания).

Иммунизация хоряков мРНК-вакциной mRNA-H5

Для иммунизации использовали самок хоряков весом 700–1500 г. Препараты mRNA-H5 LNP и рекомбинантного белка HA/H5 в 100 мкл

фосфатно-солевого буфера – ФСБ (pH 7,4) вводили в четырехглавую мышцу бедра с помощью инсулиновых шприцев с иглой 29G. Препараты мРНК-вакцины, растворенные в 50 мкл ФСБ, вводили в область левой задней лапы методом СИ с помощью инжектора Comfort-IN (Comfort-IN, Австралия) с использованием индивидуальных насадок-сопло. Животные были распределены в 4 группы по 6 животных: группа 1 – введение мРНК-вакцины mRNA-H5 в дозе 100 мкг с помощью СИ; группа 2 – введение mRNA-H5 в дозе 30 мкг в составе LNP внутримышечно; группа 3 – введение рекомбинантного белка HA/H5 с гидроокисью алюминия в дозе 15 мкг внутримышечно; группа 4 – введение физиологического раствора внутримышечно (интактные животные). Размер данной выборки обусловлен тем, что в исследовании прототипы вакцины оценивались *in vivo* на модели хоряков впервые и целью был сбор первоначальных данных для дальнейших экспериментов с большим размером выборки. Иммунизацию осуществляли двукратно с интервалом 28 сут. Через 21 сут после второй иммунизации осуществляли забор венозной крови для оценки гуморального и клеточного иммунного ответа.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

В качестве антигена для ИФА использовали рекомбинантный эукариотический белок HA/H5, сорбированный на поверхности 96-луночных планшетов в концентрации 1 мкг/мл в 2 М мочеvine в течение ночи при 4 °С [20]. ИФА проводили по методике, описанной в работе [21]. Лунки планшетов трижды промывали и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре с 1% казеина в ФСБ с добавлением 0,05% Tween 20 (ФСБ-Т) для блокирования неспецифического связывания белка. Затем планшеты инкубировали с трехкратными серийными разведениями сыворотки иммунизированных животных в течение 1 ч при комнатной температуре, после промывки ФСБ-Т добавляли вторичные козы антитела против иммуноглобулина G хоряка, меченные пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После окончательной промывки в планшеты добавляли субстрат TMB (Amresco, США). Реакцию останавливали 1N HCl и проводили измерение оптической плотности на приборе Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) при длине волны 450 нм. Конечный титр определяли по последнему разведенному образцу, дававшему положительные результаты по значению оптической плотности.

Определение вируснейтрализующей активности иммунных сывороток

В работе использовали штамм вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Сыворотки крови иммунизированных хорьков обрабатывали ферментом RDE (Denka Seiken, Япония) для удаления неспецифических ингибиторов, содержащих сиаловую (нейраминовую) кислоту, которые могут имитировать действие антител, связываясь с вирусом гриппа. Сыворотки инактивировали нагреванием в течение 30 мин при температуре 56 °C. Рабочая доза вируса составляла 100 TCID₅₀/100 мкл вирусного разбавителя (среда DMEM с добавлением 0,2% бычьего сывороточного альбумина (Gibco), 1% пенициллина-стрептомицина и 2 мкг/мл TPCK-трипсина). В 96-луночных серологических планшетах готовили двукратные разведения сыворотки в 100 мкл поддерживающей среды, затем в каждую лунку вносили 100 мкл рабочего разведения вируса (общий объем 200 мкл) и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °C и 5% CO₂. В качестве контроля использовали сыворотку интактных хорьков. После этого 180 мкл суспензии переносили в лунки 96-луночного планшета с клеточной культурой MDCK-SIAT1 и инкубировали в течение 3 сут при температуре 37 °C и 5% CO₂. После инкубации клетки окрашивали раствором кристаллического фиолетового и анализировали с помощью Agilent BioTek Cytation 5 (Thermo Fisher Scientific). Титр сыворотки в тесте на нейтрализацию вируса соответствовал разведению сыворотки, при котором остается 50% живых клеток. В контрольной группе оставалось не более 5% живых клеток [21].

Оценка Т-клеточного ответа методом ELISpot

Т-клеточный иммунный ответ определяли с помощью метода ELISpot с использованием набора ELISpot Plus: Ferret IFN-γ (ALP) (Mabtech, Швеция). Через 3 нед. после второй иммунизации осуществляли забор крови у иммунизированных хорьков. После лизиса эритроцитов буфером ACK Lysing Buffer (BD, США) Т-лимфоциты дважды отмывали в среде RPMI и помещали в 1 мл среды RPMI с 2 мМ L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина. На 96-луночном планшете из набора были иммобилизованы антитела против интерферона гамма (IFN-γ) хорька. После блокировки планшета RPMI Т-лимфоциты пассивировали в количестве 5×10⁵ клеток/лунка и стимулировали пулом вирус-специфических пептидов PepMix (JPT, Германия). Клетки инкубировали в течение 20 ч при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO₂. Плашки затем отмывали,

добавляли биотинилированные антитела против IFN-γ хорька, которые проявляли с помощью конъюгата «стрептавидин — пероксидаза хрена» и субстрата АЕС (3-амино-9-этилкарбазол). Число IFN-γ-продуцирующих клеток подсчитывали с помощью системы для ELISpot-анализа на базе стереомикроскопа (Carl Zeiss, Германия) [21].

Изучение протективных свойств мРНК-вакцины

Все исследования по оценке защитных свойств вакцины проводили в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных заболеваний». Через 21 сут после второй иммунизации хорьков заражали интраназально 5 LD₅₀ штамма вируса гриппа A/dalmatian pelican/Kalmykia/330-10V/2023 (H5N1) для изучения протективных свойств мРНК-вакцины mRNA-H5. Заражение осуществляли под наркозом с использованием смеси зарегистрированных ветеринарных препаратов Золетил 100 (Франция) и Ксила (Нидерланды). В течение 14 сут после заражения регистрировали физиологические реакции, смертность животных и измеряли их вес. В случаях, когда у животных развивались тяжелые состояния, несовместимые с жизнью, при которых животное не могло нормально жить и питаться, а также при потере более 20% первоначальной массы тела, животное выводили из эксперимента. Всех остальных животных гуманно выводили из эксперимента при его завершении.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Количественные данные представлены в виде среднего арифметического значения со стандартным отклонением и проанализированы с помощью непараметрических тестов. Межгрупповые различия оценивали с помощью непараметрического одностороннего дисперсионного анализа (критерия Краскала — Уоллиса) с post-hoc тестом Данна. Моделирование функции выживания проводилось с использованием метода Каплана — Мейера [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях мы провели молекулярный дизайн модифицированного гемагглютинина штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8): удалены трансмембранный и цитоплазматический домены для получения секретируемого белка;

заменен сайт протеолиза высокопатогенного вируса гриппа; внесены аминокислотные замены для повышения стабильности белка. На основе спроектированного иммуногена была получена мРНК-вакцина mRNA-H5, кодирующая модифицированный гемагглютинин вируса гриппа. Показана эффективная стимуляция гуморального и Т-клеточного ответа у мышей линии BALB/c на введение мРНК-вакцины методом СИ или в составе LNP. Вакцина mRNA-H5, введенная методом СИ или в составе LNP, обеспечила 100% защиту иммунизированных мышей от гибели при заражении летальными дозами штаммов вируса птичьего гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1) [11].

В настоящем исследовании изучали иммуногенные и протективные свойства mRNA-H5 на модели хорьков. Получение мРНК-вакцины mRNA-H5, а также получение комплексов mRNA-H5 LNP проводили согласно ранее описанному протоколу [11]. В ходе анализа данных иммуногенности мРНК-вакцины, полученных на мышах линии BALB/c, и анализа литературных данных были выбраны дозы для разных методов введения mRNA-H5 — 100 мкг в случае

использования СИ и доза 30 мкг в случае LNP. Хорьков двукратно иммунизировали препаратами mRNA-H5 в указанных дозах методом СИ и в комплексе с LNP. В качестве положительного контроля хорькам вводили рекомбинантный белок HA/H5. Сыворотки иммунизированных животных исследовали с помощью ИФА. Титры специфических антител были выявлены у животных, иммунизированных mRNA-H5 с помощью СИ и в составе LNP и животных, иммунизированных рекомбинантным белком HA/H5; средние титры антител в группах составили 1:180 000, 1:4 000 000 и 1:1 800 000 соответственно (рис. 1А).

Сыворотки крови иммунизированных хорьков далее анализировали в реакции вируснейтрализации в отношении штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Сыворотки крови животных, иммунизированных mRNA-H5 с помощью СИ и в составе LNP, а также сыворотки животных, иммунизированных рекомбинантным белком HA/H5, обладают вируснейтрализующей активностью; средние 50% нейтрализующие титры составили 1:250, 1:1500 и 1:1900 соответственно (рис. 1В).

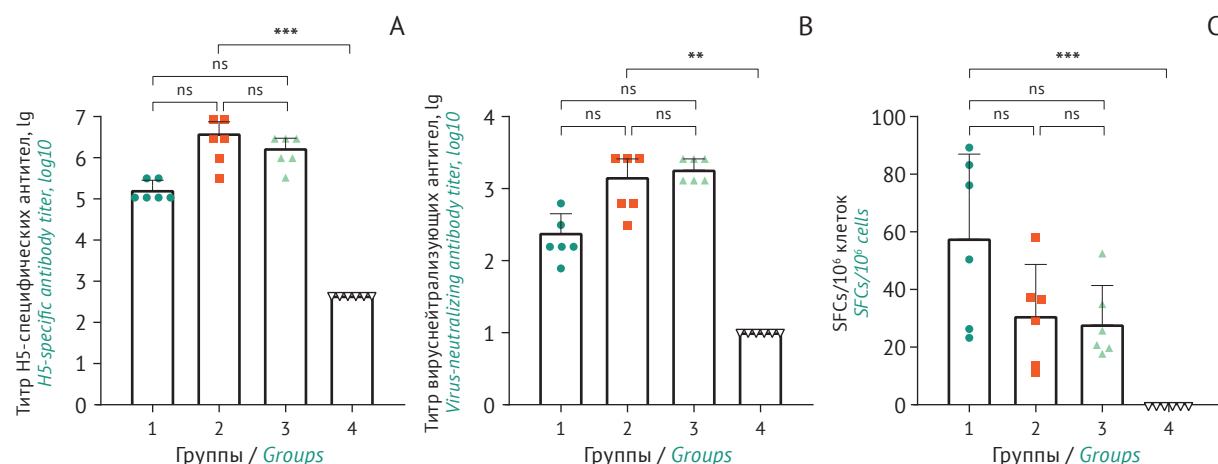


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors based on their own data

Рис. 1. Анализ иммуногенности мРНК-вакцины mRNA-H5 на модели хорьков: А — результаты иммуноферментного анализа сывороток хорьков, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5; В — вируснейтрализующая активность иммунных сывороток хорьков в отношении вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8); С — количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов, определенное методом ELISpot.

Группа 1 — животные, иммунизированные 100 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 с помощью струйной инъекции; группа 2 — животные, иммунизированные 30 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 в составе липидных наночастиц; группа 3 — животные, иммунизированные рекомбинантным белком HA/H5; группа 4 — животные, не подвергавшиеся каким-либо манипуляциям. Каждый столбик представляет собой среднее число клеток, образующих пятна IFN-γ (SFCs), на 1 млн стимулированных Т-лимфоцитов; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns — различия статистически не значимы.

Fig. 1. Immunogenicity analysis of the mRNA-H5 vaccine in a ferret model. A, enzyme-linked immunosorbent assay results for sera from ferrets immunized with mRNA-H5 vaccine. B, Virus-neutralizing activity of immune sera from ferrets against influenza virus A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). C, Number of T lymphocytes expressing IFN-γ in response to stimulation with a pool of specific peptides, as determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISpot).

Group 1, animals immunized with 100 μg of the mRNA-H5 vaccine administered by jet injection (JI); group 2, animals immunized with 30 μg of the mRNA-H5 vaccine formulated with lipid nanoparticles; group 3, animals immunized with recombinant HA/H5 protein; group 4, animals not subjected to any manipulations. Each bar represents the mean number of IFN-γ spot-forming cells (SFCs) per 1 million stimulated T lymphocytes; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns, not significant.

Формирование Т-клеточного иммунитета у хорьков было изучено с помощью метода ELISpot. Для этого из образцов крови иммунизированных хорьков выделяли Т-лимфоциты и оценивали их способность выделять IFN- γ в ответ на стимуляцию пептидами, входящими в состав гемагглютинаина вируса. У хорьков, иммунизированных mRNA-H5 и рекомбинантным белком HA/H5, активируется специфический Т-клеточный иммунитет, что выражается в значительном повышении количества лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ (>15 SFCs) (рис. 1С).

Анализ результатов изучения иммуногенности показывает, что наблюдается тенденция к более высокому уровню гуморального ответа в случае доставки мРНК в составе LNP, но при этом в случае доставки методом СИ есть тенденция к более высокому уровню клеточного ответа. Активация клеточного ответа может объясняться тем, что введение мРНК методом СИ обеспечивает широкое распределение препарата в эпидермисе и дерме, в которых плотность антиген-презентирующих клеток выше, чем в мышечной ткани, тогда как при доставке в составе LNP мРНК поглощается в основном клетками мышц [22].

Не установлено статистически значимых различий титров специфических антител (данные ИФА и реакции вируснейтрализации) и в количестве Т-лимфоцитов (данные ELISpot) между группой хорьков, иммунизированных

мРНК-вакциной, и группой положительного контроля. В то же время были показаны статистически значимые различия при сравнении с группой интактных хорьков. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности активации вирус-специфического гуморального и клеточного иммунного ответа у хорьков, иммунизированных mRNA-H5, в случае доставки методом СИ или в комплексе с LNP.

Для анализа протективных свойств был выбран циркулировавший на территории России штамм вируса гриппа A/dalmatian pelican/Kalmykia/330-10V/2023 (H5N1). Через 21 сут после второй иммунизации хорьки были заражены данным штаммом в дозе 5 LD₅₀. В течение 14 сут после заражения регистрировали физиологические реакции, смертность животных и измеряли их вес (рис. 2А). Выживаемость всех иммунизированных животных составила 100%, клинические признаки заболевания отсутствовали (рис. 2В). В группе интактных животных погибло 2 из 6 хорьков (33%), остальные животные были выведены из эксперимента из-за сильной ($>20\%$) потери веса или неврологических симптомов; у всех интактных хорьков наблюдались явные признаки заболевания, такие как плохой аппетит, хрипение и чихание, выделения из носа на внешней стороне, атаксия.

Впервые на модели хорьков продемонстрированы иммуногенные и протективные свойства

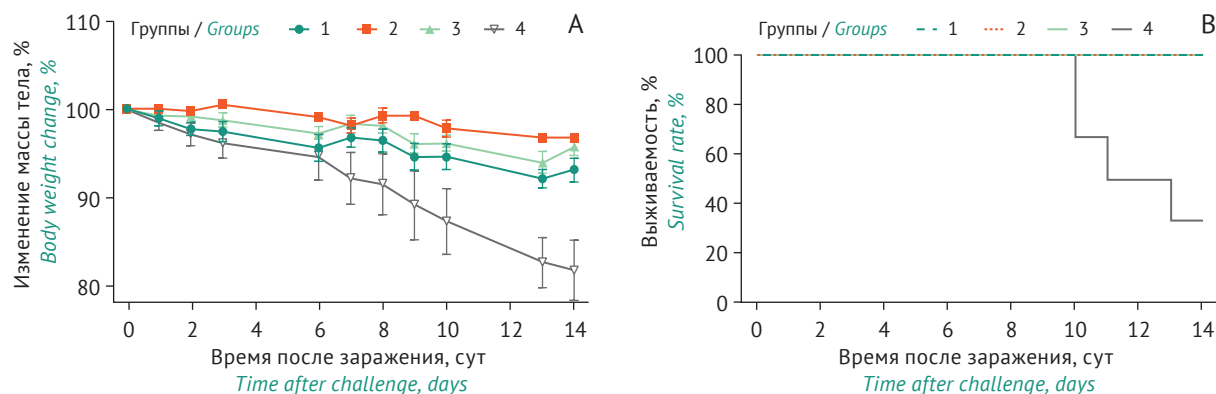


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors based on their own data

Рис. 2. Анализ протективных свойств мРНК-вакцины mRNA-H5 на модели хорьков: А — график изменения веса хорьков после заражения вирусом гриппа; В — график выживаемости хорьков после заражения 5 LD₅₀ штамма вируса гриппа A/dalmatian pelican/Kalmykia/330-10V/2023 (H5N1).

Группа 1 — животные, иммунизированные 100 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 с помощью струйной инъекции; группа 2 — животные, иммунизированные 30 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 в составе липидных наночастиц; группа 3 — животные, иммунизированные рекомбинантным белком HA/H5; группа 4 — животные, не подвергавшиеся каким-либо манипуляциям.

Fig. 2. Analysis of the protective efficacy of the mRNA-H5 vaccine in a ferret model. A, Body weight change in ferrets after challenge with influenza virus; B, Survival of ferrets after challenge with 5 LD₅₀ of the influenza virus strain A/dalmatian pelican/Kalmykia/330-10V/2023 (H5N1).

Group 1, animals immunized with 100 μ g of the mRNA-H5 vaccine administered by jet injection (JI); group 2, animals immunized with 30 μ g of the mRNA-H5 vaccine formulated with lipid nanoparticles (LNPs); group 3, animals immunized with the recombinant HA/H5 protein; group 4, animals not subjected to any manipulations.

мРНК-вакцины mRNA-H5, кодирующей модифицированный гемагглютинин штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Важный аспект данного исследования заключается в сравнении эффективности двух разных способов доставки мРНК-вакцины (СИ и в составе LNP) в одном эксперименте. Для обоих способов показано сопоставимое формирование защитного иммунитета у животных при заражении вирусом гриппа (рис. 2). В группе с введением mRNA-H5 методом СИ установлены более низкие вируснейтрализующие титры (рис. 1B) по сравнению с группой mRNA-H5 LNP, но при этом наблюдалась тенденция к увеличению уровня Т-клеточного ответа (рис. 1C). Это позволяет предположить, что для формирования протективного иммунитета очень важна эффективная активация не только гуморального, но и Т-клеточного ответа. Необходимо отметить, что неинкапсулированная мРНК, введенная струйным инъектором, способствует обеспечению защитного иммунитета без использования LNP, имеющих ряд недостатков [9, 10]. Описанные выше данные согласуются с данными нашей предыдущей работы на мышах [11] и являются продолжением изучения mRNA-H5 на другой модели животных — хорьках, которые представляют собой более релевантную модель для исследования патогенеза вируса гриппа. Таким образом, мРНК-вакцина mRNA-H5 является перспективным вакцинным кандидатом для профилактики заболевания, вызываемого высокопатогенным вирусом гриппа птиц подтипа H5Nx.

Необходимо отметить следующие ограничения данного исследования. На хорьках была исследована только одна доза мРНК для каждого метода доставки (100 мкг для СИ и 30 мкг для LNP),

выбранная на основании экспериментальных данных на мышах и анализа данных литературы; целесообразен анализ дозозависимого эффекта mRNA-H5 на хорьках и более тщательный подбор дозы. Протективные свойства вакцины изучены только на гомологичном штамме вируса гриппа и в дозе 5 LD₅₀; необходимо изучение на более широком спектре штаммов и диапазоне доз. Дальнейшая работа будет направлена на преодоление указанных ограничений.

ВЫВОДЫ

1. При введении mRNA-H5 в организм хорька в дозе 30 мкг в комплексе с липидными наночастицами и в дозе 100 мкг с помощью струйной инъекции индуцируется как вирус-специфический гуморальный, так и Т-клеточный ответ.
2. Формирование Т-клеточного иммунного ответа следует из значительного увеличения количества лимфоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов к гемагглютинуину HA/H5.
3. Формирование вирус-специфического гуморального иммунного ответа подтверждено при изучении вируснейтрализующей активности сывороток крови иммунизированных хорьков; продемонстрировано формирование нейтрализующих антител в отношении штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8).
4. Результаты изучения протективных свойств mRNA-H5 указывают на способность вакцины обеспечивать 100% защиту хорьков от гибели при заражении 5 LD₅₀ штамма вируса гриппа A/dalmatian pelican/Kalmykia/330-10V/2023 (H5N1) при использовании обоих методов доставки.

Литература/References

1. Lam JY, Yuen CK, Cheung SK, et al. Nasal RNA-scaffold-protein vaccine protects mice from human H5N1 clade 2.3.4.4b virus lethal infection and safeguards against vaccine-unmatched viruses. *EBio-Medicine*. 2026;126:106228. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2026.106228>
2. Hannoun C. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(9):1085–94. <https://doi.org/10.1586/14760584.2013.824709>
3. Mostafa A, Nogales A, Martinez-Sobrido L. Highly pathogenic avian influenza H5N1 in the United States: Recent incursions and spillover to cattle. *Npj Viruses*. 2025;3(1):54. <https://doi.org/10.1038/s44298-025-00138-5>
4. Uyeki TM, Milton S, Abdul Hamid C, et al. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus infection in a dairy farm worker. *N Engl J Med*. 2024;390(21):2028–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2405371>
5. Li H, Huang M, Feng S, et al. Preclinical evaluation of an mRNA vaccine developed from the first human isolate of bovine H5N1. *Cell Rep Med*. 2026;7(4):102702. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2026.102702>
6. Marchenko VY, Panova AS, Kolosova NP, et al. Characterization of H5N1 avian influenza virus isolated from bird in Russia with the E627K mutation in the PB2 protein. *Sci Rep*. 2024;14(1):26490. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-78175-y>
7. Wang Z, Tian C, Zhu J, et al. Avian influenza mRNA vaccine encoding hemagglutinin provides complete protection against divergent H5N1 viruses in specific-pathogen-free chickens. *J Nanobiotechnology*. 2025;23(1):55. <https://doi.org/10.1186/s12951-025-03156-w>
8. Sharabrin SV, Krasnikova SI, Kisaikov 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>
9. Michel T, Luft D, Abraham MK, et al. Cationic nanoliposomes meet mRNA: Efficient delivery of modified mRNA using hemocompatible and stable vectors for therapeutic applications. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017;8:459–68. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.07.013>
10. Hatziantoniou S, Maltezou HC, Tsakris A, et al. Anaphylactic reactions to mRNA COVID-19 vaccines: A call for further study. *Vaccine*. 2021;39(19):2605–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.073>
11. 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>
12. Belser JA, Szretter KJ, Katz JM, Tumpey TM. Use of animal models to understand the pandemic potential of highly pathogenic avian influenza viruses. *Adv Virus Res*. 2009; 73:55–97. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(09\)73002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)73002-7)
 13. Lowen AC, Mubareka S, Tumpey TM, et al. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(26):9988–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604157103>
 14. Septer KM, Sim DG, Patel DR, et al. Immunity to hemagglutinin and neuraminidase results in additive reductions in airborne transmission of influenza H1N1 virus in ferrets. *Sci Adv*. 2026;12(11):eaea8719. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aea8719>
 15. Belser JA, Barclay W, Barr I, et al. Ferrets as models for influenza virus transmission studies and pandemic risk assessments. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(6):965–71. <https://doi.org/10.3201/eid2406.172114>
 16. Kim CU, Choi WS, Lee P, et al. A consensus HA DNA vaccine targeting clade 2.3.4.4 H5Nx influenza viruses provides broad cross-clade protection in mice and ferrets. *Biomed Pharmacother*. 2025;191:118485. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2025.118485>
 17. Belser JA, Katz JM, Tumpey TM. The ferret as a model organism to study influenza A virus infection. *Dis Model Mech*. 2011;4(5):575–9. <https://doi.org/10.1242/dmm.007823>
 18. Furey C, Scher G, Ye N, et al. Development of a nucleoside-modified mRNA vaccine against clade 2.3.4.4b H5 highly pathogenic avian influenza virus. *Nat Commun*. 2024;15(1):4350. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48555-z>
 19. Hatta M, Brock N, Hauguel T, et al. Influenza mRNA vaccine reduces pathogenicity and transmission of A(H5N1) virus in a ferret model. *NPI Vaccines*. 2025;10(1):263. <https://doi.org/10.1038/s41541-025-01318-3>
 20. Rudometova NB, Fando AA, Kisakova LA, et al. Immunogenic and protective properties of recombinant hemagglutinin of influenza A (H5N8) virus. *Vaccines (Basel)*. 2024;12(2):143. <https://doi.org/10.3390/vaccines12020143>
 21. Litvinova VR, Rudometov AP, Rudometova NB, et al. DNA vaccine encoding a modified hemagglutinin trimer of avian influenza A virus H5N8 protects mice from viral challenge. *Vaccines (Basel)*. 2024;12(5):538. <https://doi.org/10.3390/vaccines12050538>
 22. 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.jymthe.2024.03.022>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» опубликовано Приложение 1. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-276-286-annex>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **В.Р. Литвинова, А.С. Гудымо, В.А. Яковлев, Т.Н. Ильичёва, В.Ю. Марченко, Л.И. Карпенко, А.А. Ильичёв, А.П. Рудомётов** — концепция работы, написание текста рукописи, формулировка выводов; **М.Б. Боргоякова, Е.В. Старостина, Е.В. Яковлева, К.И. Иванова, О.Н. Перфильева, К.П. Макарова, Д.И. Вахитов, Н.В. Данильченко, М.Л. Егорова, Н.Н. Васильцова** — получение экспериментальных данных; **С.В. Шарабрин, Н.Б. Рудомётова, Д.Н. Кисаков, Л.А. Кисакова** — участие в формулировке выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Соответствие принципам этики. Эксперименты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с протоколами, утвержденными Bioэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Протокол № 3 от 03.04.2025).

Использование генеративного искусственного интеллекта. Авторы заявляют, что не использовали генеративный ИИ при подготовке рукописи.

Supplementary information. Supplementary material 1 is available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-276-286-annex>

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **V.R. Litvinova, A.S. Gudymo, V.A. Yakovlev, T.N. Ilyicheva, V.Yu. Marchenko, L.I. Karpenko, A.A. Ilyichev, A.P. Rudometov** conceptualized the study, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **M.B. Borgoyakova, E.V. Starostina, E.V. Yakovleva, K.I. Ivanova, O.N. Perflyeva, K.P. Makarova, D.I. Vahitov, N.V. Danilchenko, M.L. Egorova, N.N. Vasiltsova** contributed to the acquisition of experimental data. **S.V. Sharabrin, N.B. Rudometova, D.N. Kisakov, L.A. Kisakova** participated in formulating the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. Animal experiments were conducted in compliance with humane principles and in accordance with the protocols approved by the Bioethics Committee of the Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” (Protocol No. 3 dated April 3, 2025).

Use of generative artificial intelligence. The authors declare that they did not use generative AI in the preparation of this manuscript.

Об авторах / Authors

Литвинова Виктория Руслановна / Victoria R. Litvinova

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

Гудымо Андрей Сергеевич / Andrei S. Gudymo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6952-6412>

Яковлев Владимир Андреевич / Vladimir A. Yakovlev

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

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

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

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

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

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>

Перфильева Ольга Николаевна / Olga N. Perflyeva

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-4170-0552>

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>

Данильченко Наталья Викторовна / Natalia V. Danilchenko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2655-4629>

Егорова Марина Леонидовна / Marina L. Egorova

Васильцова Наталья Николаевна / Natalya N. Vasiltsova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-1548-5608>

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

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

Рудомётова Надежда Борисовна, канд. биол. наук / **Nadezhda B. Rudometova**, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1684-9071>

Кисаков Денис Николаевич / Denis N. Kisakov

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

Кисакова Любовь Александровна / Lyubov A. Kisakova

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

Ильичёва Татьяна Николаевна, д-р биол. наук, доц. / **Tatiana N. Ilyicheva**, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2354-7688>

Марченко Василий Юрьевич, д-р биол. наук / **Vasiliy Yu. Marchenko**, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1339-6732>

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>

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

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

Поступила 27.04.2026

После доработки 25.08.2026

Принята к публикации 25.09.2026

Received April 27, 2026

Revised August 25, 2026

Accepted September 25, 2026

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, рестриктуемых 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>	–
IADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNYNYLYRLFRKSNLKPFE	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
KEITVATSRTLSTYYKLGASQQRVAGDSGFAAY	M2 фрагмент <i>M2 fragment</i>	166–196
FPRGQGVPIINTSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGK	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. 3А). 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. 3А–С). 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,

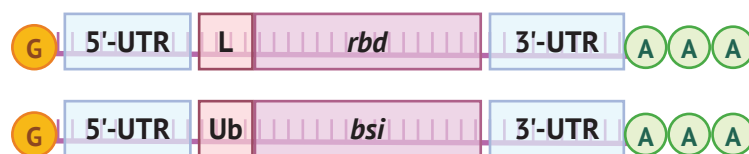


Рисунок подготовлен авторами с использованием ресурса BioRender.com / The figure was prepared by the authors using BioRender.com

Рис. 1. Схема строения мРНК-конструкций mRNA-RBD (А) и mRNA-BSI (В). 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.

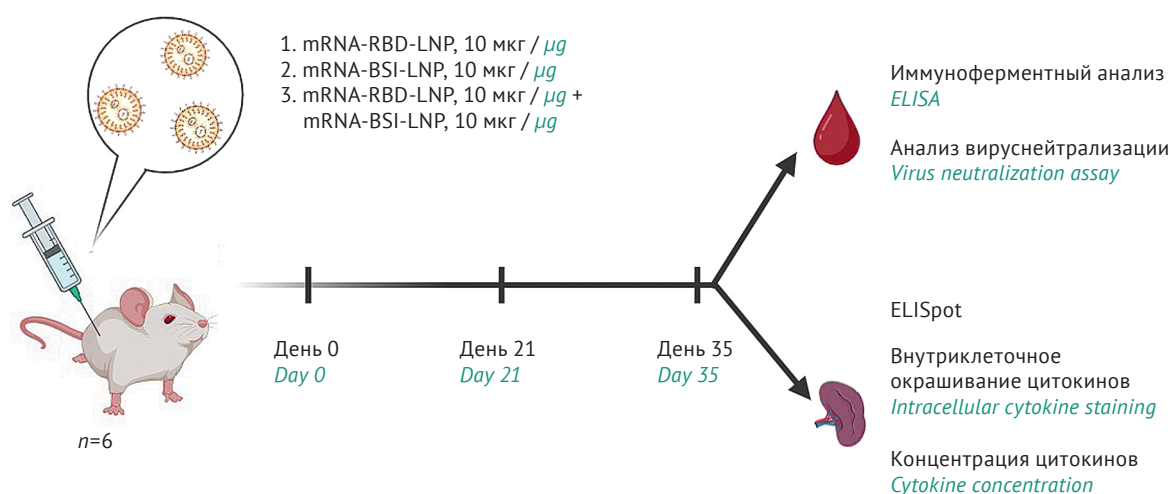


Рисунок подготовлен авторами с использованием ресурса biorender.com / The figure was prepared by the authors using BioRender.com

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].

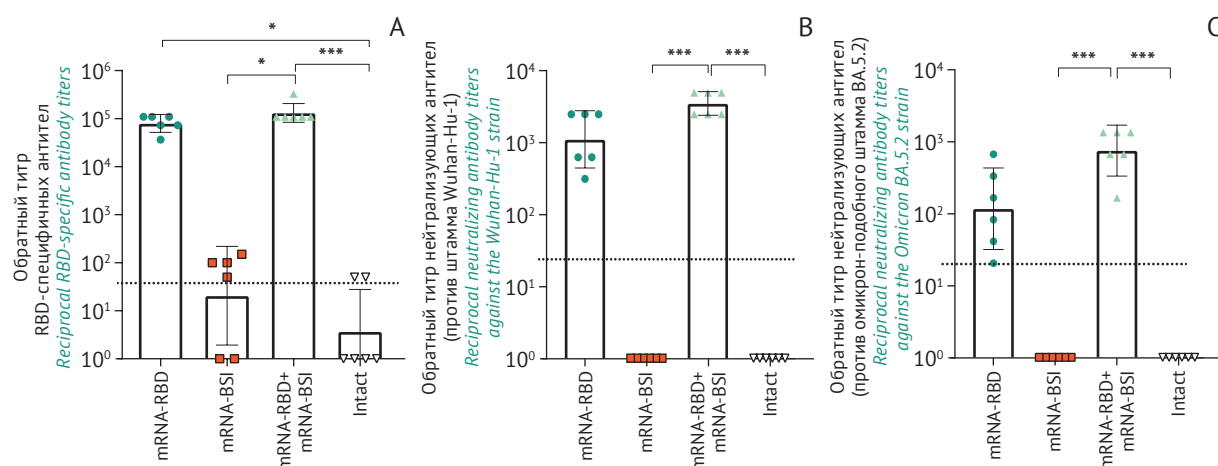


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors based on their own data

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.

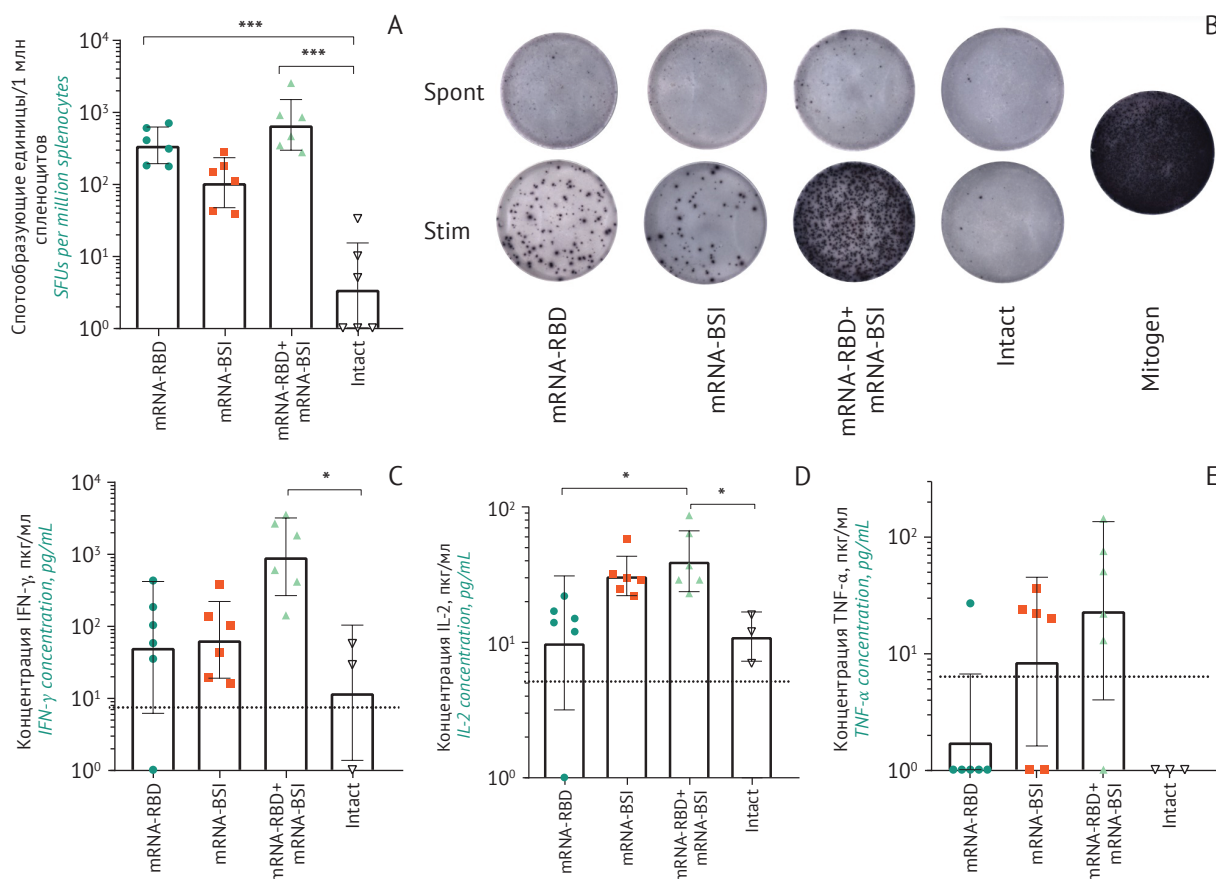


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors based on their own data

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/s41586-020-2550-z>
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

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 вирусов 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 мышях-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>

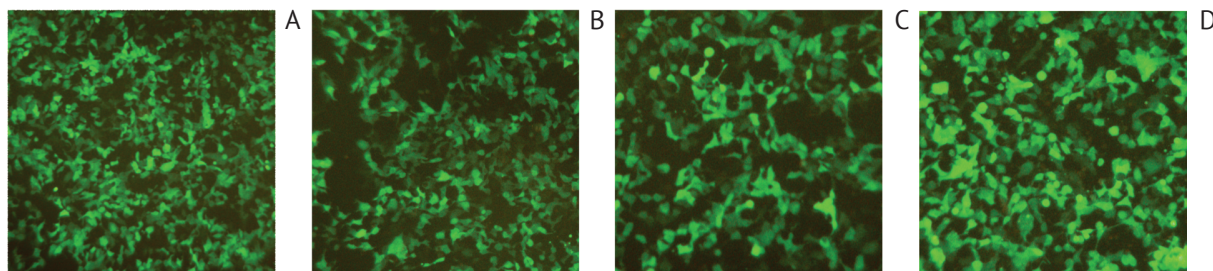


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

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.

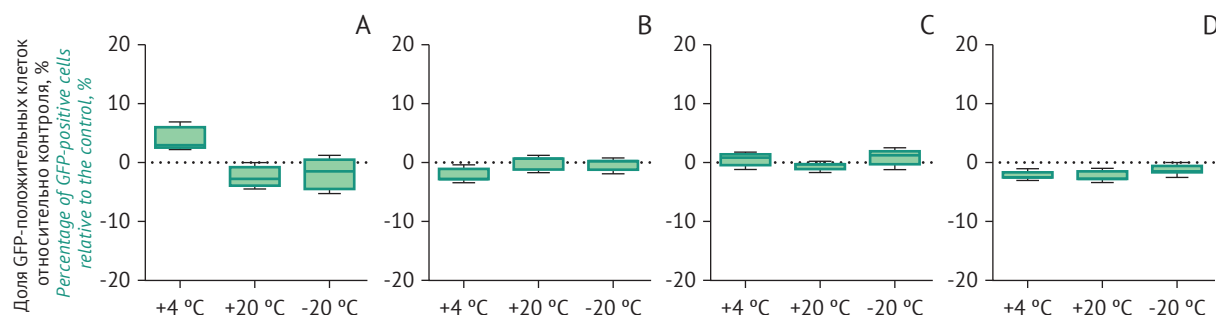


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

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 Н1 составили 1:382 000 в группе лиофилизированной вакцины и 1:710 000 в группе нелиофилизированной вакцины; к Н3 — 1:628 000 в обеих группах; к НВ — 1:273 000 и 1:328 000 соответственно. При использовании в качестве антигена смеси рекомбинантных гемагглютининов Н1, Н3 и НВ 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. 4Б). 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 °C 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 °C, хотя при длительном хранении, особенно при 20 °C, 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

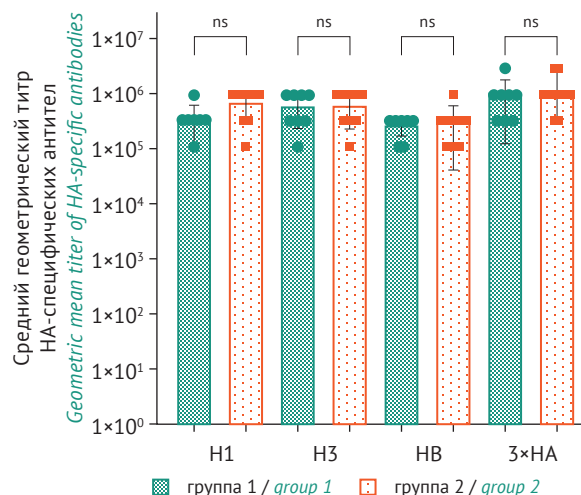


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Оценка гуморального иммунитета у мышей после применения лиофилизированной вакцины «мРНК-Вектор-Флю», хранившейся в течение трех месяцев при температуре 4 °C. Ось X – антигены для иммуноферментного анализа (ИФА): рекомбинантные гемагглютинины 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

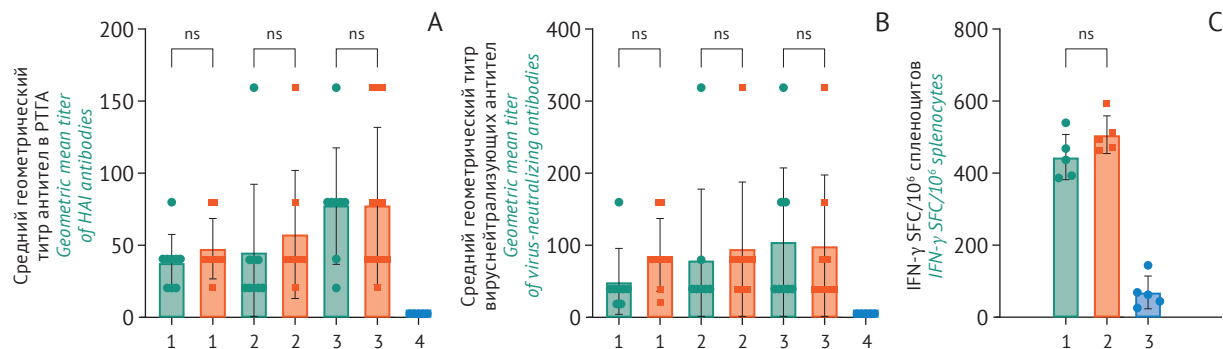


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

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/S0026893257000062>
 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 микроципового 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

УДК 578.7:612.017.1:614.44:615.37

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-311-323>

Обзор | Review



мРНК-вакцины для профилактики инфекционных заболеваний: обзор международного опыта оценки эффективности и безопасности по результатам клинических исследований

А.Ю. Бутырский¹ , А.С. Коровкин^{1,2} , Д.В. Горенков¹ , В.А. Меркулов^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный пер., д. 5А, Москва, 105064, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Коровкин Алексей Сергеевич; korovkinas@expmed.ru; a.s.korovkin@gmail.com

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Платформенная мРНК-технология создания вакцин для профилактики инфекционных заболеваний была внедрена в медицинскую практику в период COVID-19, однако накопленный опыт клинического применения мРНК-вакцин требует систематизации применительно к другим инфекционным болезням. В связи с этим актуальным представляется обобщение данных об эффективности и безопасности таких мРНК-вакцин в условиях контролируемых клинических исследований для обоснования подходов к экспертизе иммунобиологических лекарственных препаратов подобного класса.

ЦЕЛЬ. Обзор результатов клинических исследований мРНК-вакцин для профилактики респираторно-синцитиальной вирусной инфекции (РСВ-инфекции), цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ-инфекции), сезонного гриппа, лихорадки Зика и бешенства для обобщения данных об их эффективности и безопасности с определением ограничений, связанных с применением суррогатных конечных точек и размером выборки.

ОБСУЖДЕНИЕ. Выполнен анализ публикаций в PubMed, eLIBRARY.RU и материалов в ClinicalTrials.gov, описывающих результаты контролируемых клинических исследований мРНК-вакцин для профилактики инфекционных болезней (за исключением COVID-19) за период 2016–2026 гг. Клиническая эффективность подтверждена только для вакцины mRNA-1345 против РСВ-инфекции: 83,7% (для эпизодов с 2 симптомами) и 82,4% (для эпизодов с 3 симптомами); профиль безопасности признан удовлетворительным. Для мРНК-вакцин против сезонного гриппа подтвержден благоприятный профиль безопасности и выраженная сероконверсия в реакции торможения гемагглютинации; показатели гуморального иммунитета были сопоставимы с зарегистрированными вакцинами. Вакцина mRNA-1647 против ЦМВ-инфекции после трехкратного введения стимулировала длительный иммунный ответ с индукцией Т-клеточного звена при благоприятном профиле безопасности. В исследовании вакцины для профилактики лихорадки Зика (mRNA-1325, mRNA-1893) показано наличие после вакцинации нейтрализующих антител (в реакции нейтрализации) у участников с различным исходным серологическим статусом по флавивирусам; профиль безопасности признан благоприятным. мРНК-вакцина CV7201 против

бешенства индуцировала защитные титры вируснейтрализующих антител у 71% участников исследования при внутривенном и у 46% — при внутримышечном введении; частота местных и системных нежелательных явлений (НЯ) была высокой (97 и 78% соответственно).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Результаты контролируемых клинических исследований мРНК-вакцин для профилактики РСВ-, ЦМВ-инфекций, сезонного гриппа, лихорадки Зика и бешенства продемонстрировали их потенциальную эффективность и приемлемый профиль безопасности, однако оценка большинства препаратов основана на суррогатных конечных точках и малых выборках, что является основными ограничениями проведенных исследований. Полученные результаты обосновывают необходимость дальнейших исследований с использованием конечных точек (клиническая эффективность, суррогатные маркеры) и пострегистрационного мониторинга безопасности (в первую очередь местные и системные НЯ).

Ключевые слова: мРНК-вакцины; клинические исследования; иммуногенность вакцин; безопасность вакцин; корреляты протекции; суррогатные конечные точки; грипп; респираторно-синцитиальная вирусная инфекция; цитомегаловирусная инфекция; лихорадка Зика; бешенство

Для цитирования: Бутырский А.Ю., Коровкин А.С., Горенков Д.В., Меркулов В.А. мРНК-вакцины для профилактики инфекционных заболеваний: обзор международного опыта оценки эффективности и безопасности по результатам клинических исследований. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(3):311–323. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-311-323>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00061-26-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. А.С. Коровкин является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2024 г. В.А. Меркулов — главный редактор журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2021 г. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

mRNA vaccines for the prevention of infectious diseases: A review of international experience in evaluating efficacy and safety based on clinical trial results

Alexey Yu. Butirskiy¹ , Alexey S. Korovkin^{1,2}  , Dmitry V. Gorenkov¹ ,
Vadim A. Merkulov^{1,3} 

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd., Moscow 127051, Russian Federation

² I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russian Federation

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Alexey S. Korovkin; korovkinas@expmed.ru; a.s.korovkin@gmail.com

ABSTRACT

INTRODUCTION. The mRNA platform technology for creating vaccines against infectious diseases was introduced into clinical practice during the COVID-19 pandemic; however, the accumulated experience of clinical use of mRNA vaccines requires systematization in relation to other infectious diseases. Therefore, summarizing data on the efficacy and safety of such mRNA vaccines in controlled clinical trials is relevant for substantiating approaches to the regulatory evaluation of immunobiological medicinal products of this class.

AIM. To review the results of clinical trials of mRNA vaccines for the prevention of respiratory syncytial virus infection (RSV infection), cytomegalovirus infection (CMV infection), seasonal

influenza, Zika fever, and rabies to summarize data on their efficacy and safety, identifying the limitations associated with the use of surrogate endpoints and sample size.

DISCUSSION. The authors analyzed publications in PubMed, eLIBRARY.RU and records in ClinicalTrials.gov describing the results of controlled clinical trials of mRNA vaccines for the prevention of infectious diseases (excluding COVID-19) from 2016 to 2026. Clinical efficacy was confirmed only for the mRNA-1345 vaccine against RSV infection: 83.7% (for episodes with 2 symptoms) and 82.4% (for episodes with 3 symptoms); the safety profile was considered satisfactory. For mRNA vaccines against seasonal influenza, a favorable safety profile and pronounced seroconversion in the hemagglutination inhibition assay were confirmed; the humoral immunity parameters were comparable to those of licensed vaccines. The mRNA-1647 vaccine against CMV infection, after a three-dose regimen, induced a durable immune response with the activation of T-cell immunity, along with a favorable safety profile. In a study of vaccines for the prevention of Zika fever (mRNA-1325, mRNA-1893), the presence of neutralizing antibodies (in a neutralization assay) after vaccination was demonstrated in participants with different baseline flavivirus serostatus; the safety profile was considered favorable. The mRNA vaccine CV7201 against rabies induced protective titers of virus-neutralizing antibodies in 71% of study participants after intradermal administration and in 46% after intramuscular administration; the incidence of local and systemic adverse events (AEs) was high (97% and 78%, respectively). Most studies were shown to have limitations associated with the assessment of efficacy using surrogate endpoints and an insufficient sample size to detect rare adverse events.

CONCLUSIONS. The results of controlled clinical trials of mRNA vaccines for the prevention of RSV and CMV infection, seasonal influenza, Zika fever, and rabies demonstrated their potential efficacy and acceptable safety profile; however, the evaluation of most products is based on surrogate endpoints and small sample sizes, which are the main limitations of the conducted studies. The findings substantiate the need for further research using endpoints (clinical efficacy, surrogate markers) and post-marketing safety monitoring (primarily for local and systemic AEs).

Keywords: mRNA vaccines; clinical trials; vaccine immunogenicity; vaccine safety; correlates of protection; surrogate endpoints; influenza; respiratory syncytial virus infections; cytomegalovirus infections; Zika virus infection; rabies

For citation: Butirskiy A.Yu., Korovkin A.S., Gorenkov D.V., Merkulov V.A. mRNA vaccines for the prevention of infectious diseases: A review of international experience in evaluating efficacy and safety based on clinical trial results. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(3):311–323. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-311-323>

Funding. This study was conducted at the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of State Assignment No. 056-00061-26-00 for applied scientific research (R&D state registration No. 124022200103-5).

Disclosure. A.S. Korovkin has been a member of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2024. V.A. Merkulov has been the Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021. The other authors declare no conflicts of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19 стимулировала внедрение новых технологий создания и промышленного выпуска иммунобиологических препаратов, позволивших в кратчайшие сроки разработать профилактические вакцины на основе различных технологических платформ, включая аденовирусные и мРНК-вакцины [1, 2]. Массовое применение мРНК-вакцин против COVID-19 заложило основы разработки подходов к оценке эффективности и безопасности новых вакцин для профилактики других инфекционных заболеваний [3, 4]. По результатам массовой вакцинации получены данные по безопасности таких препаратов, включая сигналы о серьезных нежелательных явлениях (СНЯ) — преимущественно миокардитах и перикардитах у привитых

в поствакцинальном периоде, потенциально являющихся класс-эффектом [5, 6].

В мире активно ведутся разработки мРНК-вакцин для профилактики других инфекционных заболеваний, и в обозримом будущем такие препараты будут внедрены в медицинскую практику, в том числе в Российской Федерации, что потребует обоснования подходов к экспертной оценке их эффективности и безопасности на различных этапах клинической разработки.

В связи с этим актуальным представляется обобщение данных об эффективности и безопасности мРНК-вакцин в условиях контролируемых клинических исследований (КИ) для обоснования подходов к экспертизе иммунобиологических препаратов данного класса. Новизна настоящей работы заключается в систематизации

данных контролируемых КИ мРНК-вакцин для профилактики респираторно-синцитиальной вирусной инфекции (РСВ-инфекции), цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ-инфекции), сезонного гриппа, лихорадки Зика и бешенства за последние 10 лет с анализом ограничений.

Отказ от рассмотрения опыта клинической разработки мРНК-вакцин против COVID-19 в рамках настоящего обзора связан с особенностями регуляторных подходов к оценке эффективности и безопасности таких вакцин, в первую очередь внедрением процедур ускоренной регистрации на основе неполных клинических данных. Перспективные препараты, такие как гриппозные вакцины или вакцины для профилактики РСВ-инфекции, рассчитаны на массовое длительное применение, а их обращение регулируется в соответствии с общепринятыми для вакцин подходами.

Цель работы — обзор результатов клинических исследований мРНК-вакцин для профилактики РСВ-инфекции, ЦМВ-инфекции, сезонного гриппа, лихорадки Зика и бешенства для обобщения данных об их эффективности и безопасности с определением ограничений, связанных с применением суррогатных конечных точек и размером выборки.

Поиск литературных данных проводился в базах данных PubMed, eLIBRARY.RU и материалах ClinicalTrials.gov за период 2016–2026 гг. Отбирались публикации, описывающие дизайн и результаты КИ мРНК-вакцин для профилактики инфекционных болезней (кроме COVID-19). Использовались ключевые слова на английском и русском языках: «mRNA vaccine», «clinical trials», «infectious disease», «efficacy», «safety», «мРНК-вакцина», «клинические исследования», «инфекционные болезни», «эффективность», «безопасность». Всего выявлено 48 публикаций, из них релевантных — 9.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Конструкция современных мРНК-вакцин

Технология получения мРНК-вакцин базируется на фундаментальном свойстве молекул матричной РНК — способности к трансляции и синтезу белка при введении в живой организм. Данный принцип был подтвержден в экспериментальных работах, проведенных в конце прошлого века и продемонстрировавших эффективную трансляцию синтетических мРНК в клетках-мишенях [7].

На ранних этапах разработки исследователи сталкивались с рядом трудностей, включая нестабильность молекулы синтетической мРНК (быстрое разрушение в биологических

средах) [8], низкую выраженность иммунного ответа и проблемы доставки в клетки-мишени, так как молекула мРНК не проникала в клетки без специальных носителей [9]. Прорывом в разработке мРНК-вакцин стало создание стабильной мРНК (благодаря замене уридина на псевдоуридин) [10, 11] и разработка эффективных средств доставки [12]. Химическая модификация мРНК повысила ее стабильность и снизила иммуногенность, что позволило увеличить эффективность и безопасность. Разработка липидных носителей обеспечила защиту мРНК и ее доставку внутрь клеток [13, 14].

В современных вакцинах, созданных на основе платформенной технологии мРНК, молекула мРНК представляет собой синтетическую конструкцию, специально разработанную для индукции иммунного ответа. Ее структура включает несколько ключевых элементов, каждый из которых выполняет определенную функцию [15, 16]:

- 1) 5'-кэп (5'-cap) — защищает мРНК от разрушения экзонуклеазами, обеспечивает распознавание рибосомой и инициацию трансляции. Кэп служит сайтом связывания для факторов инициации белкового синтеза и малой субъединицы рибосомы; без него клетка не распознает мРНК как матрицу для синтеза белка;
- 2) 5'-нетранслируемая область (5'-UTR) — расположена между 5'-кэпом и старт-кодоном AUG. Она регулирует эффективность трансляции и влияет на стабильность мРНК. Область содержит сайты связывания для рибосомных белков, которые могут ускорить или блокировать сборку рибосомы. Основные механизмы регуляции трансляции — кэп-зависимая инициация (классическое сканирование) и IRES-зависимый механизм, позволяющий рибосомам связываться с мРНК внутри 5'-UTR, ускоряя синтез белка. Длина 5'-UTR варьируется от десятков до сотен нуклеотидов, что влияет на скорость трансляции и защиту от разрушения ферментами. Важное значение имеют вторичная структура мРНК и наличие рибопереключателей (элементов, связывающих различные молекулы и влияющих на пространственную конфигурацию мРНК);
- 3) Кодировущая последовательность (открытая рамка считывания) — основная часть мРНК-вакцины, содержащая информацию о синтезе целевого антигена (например, вирусного белка). Начинается со старт-кодона AUG и заканчивается стоп-кодонами — UAA, UAG или UGA;
- 4) 3'-нетранслируемая область (3'-UTR) — расположена между стоп-кодоном и поли(А)-хвостом. Она влияет на стабильность и продолжительность жизни мРНК в клетке. Длина 3'-UTR часто

превышает длину 5'-UTR. Содержит регуляторные сайты, определяющие время существования мРНК и локализацию ее синтеза;

- 5) Поли(А)-хвост — последовательность из остатков адениловой кислоты (обычно от 50 до 250 нуклеотидов), добавляемая к 3'-концу мРНК в ходе процессинга. Увеличивает стабильность мРНК, предохраняя ее от расщепления экзонуклеазами, и способствует эффективной трансляции, помогая рибосомам распознать мРНК. Постепенное укорочение поли(А)-хвоста в цитоплазме служит механизмом контроля времени жизни молекулы.

Опыт разработки вакцин на основе мРНК-технологии

Опыт КИ мРНК-вакцин для профилактики инфекционных заболеваний (кроме COVID-19) ограничен. К настоящему времени опубликованы результаты исследований вакцин для профилактики РСВ-инфекции, ЦМВ-инфекции, сезонного гриппа (квадριвалентный и расширенные варианты с покрытием штаммов А/Н3N2), лихорадки Зика и бешенства. Дизайн исследований приведен в таблице 1, а основные результаты — в таблице S1 (Приложение 1 размещено на сайте журнала¹).

Таблица 1. Дизайн клинических исследований мРНК-вакцин для профилактики инфекционных заболеваний

Table 1. Design of clinical trials of mRNA vaccines for the prevention of infectious disease

Инфекция <i>Infection</i>	Вакцина-кандидат, антиген <i>Candidate vaccine, antigen</i>	Исследование, фаза, дизайн <i>Study, phase, design</i>	Конечные точки оценки эффективности и безопасности <i>Efficacy and safety endpoints</i>
Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция (РСВ-инфекция) <i>Respiratory syncytial virus infection (RSV infection)</i>	mRNA-1345 (префузионный белок F респираторно-синцитиального вируса) <i>mRNA-1345 (prefusion F protein of respiratory syncytial virus)</i>	NCT05127434 Фаза 2/3. Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование. Взрослые ≥60 лет. Однократная вакцинация 50 мкг. n=35541 <i>NCT05127434 Phase 2/3. Randomized, double-blind, placebo-controlled study. Adults ≥60 years. Single dose of 50 µg. n=35541</i>	Оценка заболеваемости по ≥2 клиническим признакам РСВ-инфекции. Оценка безопасности <i>Efficacy assessment based on ≥2 clinical signs of RSV infection. Safety assessment</i>
РСВ-инфекция <i>RSV infection</i>	mRNA-1345 (префузионный белок F респираторно-синцитиального вируса) <i>mRNA-1345 (prefusion F protein of respiratory syncytial virus)</i>	NCT05330975 Фаза 3. Одновременное введение с вакциной против сезонного гриппа у лиц ≥50 лет и вакциной для профилактики COVID-19 <i>NCT05330975 Phase 3. Co-administration with seasonal influenza vaccine in individuals ≥50 years and a vaccine for the prevention of COVID-19</i>	Оценка иммунологического ответа на совместно вводимые вакцины и вакцину-кандидат. Оценка безопасности <i>Evaluation of the immunological response to co-administered vaccines and the candidate vaccine. Safety assessment</i>
Сезонный грипп <i>Seasonal influenza</i>	mRNA-1010 (квадριвалентная вакцина) <i>mRNA-1010 (quadrivalent vaccine)</i>	NCT05827978 Фаза 3. Рандомизированное, двойное слепое контролируемое исследование. Лица ≥18 лет (включая когорту лиц ≥65 лет) <i>NCT05827978 Phase 3. Randomized, double-blind, controlled study. Individuals ≥18 years (including a cohort of individuals ≥65 years)</i>	Сравнительная оценка иммуногенности и безопасности с гриппозной четырехвалентной вакциной в стандартной дозировке у лиц 18–64 лет и в увеличенной дозировке у лиц ≥65 лет <i>Comparative assessment of immunogenicity and safety with a standard dose of a quadrivalent influenza vaccine in individuals 18–64 years and at an increased dose in individuals ≥65 years</i>
Сезонный грипп <i>Seasonal influenza</i>	mRNA-1010 (квадριвалентная вакцина) <i>mRNA-1010 (quadrivalent vaccine)</i>	NCT04956575 Фаза 1/2. Лица ≥18 лет <i>NCT04956575 Phase 1/2. Individuals ≥18 years</i>	Сравнительная оценка иммуногенности и безопасности по сравнению с гриппозной четырехвалентной вакциной в стандартной дозировке <i>Comparative assessment of immunogenicity and safety versus a standard dose of a quadrivalent influenza vaccine</i>

¹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-311-323-annex>

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Инфекция <i>Infection</i>	Вакцина-кандидат, антиген <i>Candidate vaccine, antigen</i>	Исследование, фаза, дизайн <i>Study, phase, design</i>	Конечные точки оценки эффективности и безопасности <i>Efficacy and safety endpoints</i>
Сезонный грипп (расширенный состав по штам- му А/Н3N2) <i>(Seasonal influenza (expanded A/ H3N2 strain composition))</i>	mRNA-1011.1 / mRNA- 1011.2 / mRNA-1012 (различные варианты вакцины) <i>mRNA-1011.1 / mRNA- 1011.2 / mRNA-1012 (different vaccine compositions)</i>	NCT05827068 Фаза 1/2. Лица 50–75 лет. <i>NCT05827068 Phase 1/2. Individuals 50–75 years</i>	Оценка иммуногенности и безопасности <i>Evaluation of immunogenicity and safety</i>
Цитомегало- вирусная инфекция <i>Cytomegalovirus infection</i>	mRNA-1647 (пентамерный комплекс) <i>mRNA-1647 (pentamer complex)</i>	NCT03382405 Фаза 1. 3 дозы (0–2–6). n=154 (118 в группе вакцины, 36 в группе плацебо) <i>NCT03382405 Phase 1. 3 doses (0–2–6). n=154 (118 in the vaccine group, 36 in the placebo group)</i>	Оценка иммуногенности и безопасности <i>Evaluation of immunogenicity and safety</i>
Лихорадка Зика <i>Zika fever</i>	mRNA-1325/mRNA-1893	NCT03014089 NCT04064905 Фаза 1 <i>NCT03014089 NCT04064905 Phase 1</i>	Оценка иммуногенности и безопасности <i>Evaluation of immunogenicity and safety</i>
Бешенство <i>Rabies</i>	CV7201 (гликопротеин вируса бешенства) <i>CV7201 (rabies virus glycoprotein)</i>	NCT02241135 Фаза 1 <i>NCT02241135 Phase 1</i>	Оценка иммуногенности и безопасности <i>Evaluation of immunogenicity and safety</i>

Таблица составлена авторами / The table was prepared by the authors

Вакцина для профилактики респираторно-синцитиальной вирусной инфекции

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) – один из наиболее распространенных патогенов, поражающих нижние дыхательные пути у детей и взрослых. Предпочтительным вакцинным антигеном является генетически консервативный F-белок в префузионной конформации, применение которого в составе рекомбинантных вакцин продемонстрировало благоприятный профиль безопасности, иммуногенности и клинической эффективности. На основе мРНК-технологии разработан препарат mRNA-1345 (Moderna, США), кодирующий pre-F белок РСВ. Иммунологические корреляты протекции против РСВ-инфекции после вакцинации в настоящее время не определены.

В КИ фазы 2/3 (NCT05127434) [17] был включен 35541 участник в возрасте ≥60 лет, распределенные на две равные группы, получившие однократную вакцинацию mRNA-1345 (17793 участника) или плацебо (17748 участников). Эффективность вакцины в профилактике РСВ-инфекции с ≥2 симптомами составила 83,7% (95,88% ДИ 66,0–92,0), с ≥3 симптомами – 82,4% (96,36% ДИ 34,8–95,3). Препарат обеспечивал

защиту от обоих субтипов РСВ (А и В). Частота местных нежелательных явлений (НЯ) была выше в группе mRNA-1345 – 58,7% против 16,2% в группе плацебо, системных НЯ – 47,7% против 32,9% соответственно. Большинство НЯ были легкой или средней степени и разрешались самостоятельно. Частота развития СНЯ в обеих группах составила 2,8%. Таким образом, однократная вакцинация mRNA-1345 показала эффективность в профилактике заболеваний нижних дыхательных путей, вызванных РСВ, без выявления дополнительных сигналов по безопасности.

Исследование было продолжено у лиц ≥50 лет для оценки одновременного введения mRNA-1345 с инактивированной четырехвалентной вакциной против сезонного гриппа (СИГВ-4) и мРНК-вакциной против COVID-19 [18]. В США проведено КИ фазы 3 (NCT05330975) в два этапа с участием лиц ≥50 лет в клинически стабильном состоянии. На первом этапе участники были рандомизированы (7:10:10) для получения следующей терапии: 50 мкг mRNA-1345 и плацебо (0,9% натрия хлорид); mRNA-1345 и 60 мкг СИГВ-4; СИГВ-4 и плацебо. На втором этапе участники были рандомизированы (1:1:1) для получения следующей терапии: 50 мкг

mRNA-1345 и плацебо; mRNA-1345 и 50 мкг mRNA1273.214 (бивалентная вакцина против SARS-CoV-2, штаммы Wuhan-Hu-1 и омикрон BA.1); mRNA1273.214 и плацебо. На каждом этапе участники были стратифицированы на подгруппы по возрасту (50–59, 60–74 и ≥75 лет). Основными целями КИ являлись оценка безопасности и иммуногенности. Оценку напряженности поствакцинального иммунитета проводили на 29 сут после вакцинации по следующим показателям: среднегеометрический титр (СГТ) нейтрализующих антител к РСВ (на обоих этапах); СГТ в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) к четырем штаммам гриппа вакцины СИГВ-4 (А/Н1N1, А/Н3N2, В/Victoria, В/Yamagata) (на 1 этапе); отношение СГТ к SARS-CoV-2 (D614G и омикрон BA.1) до и после вакцинации мРНК-вакциной против COVID-19 (на 2 этапе); разница показателей серологического ответа к РСВ типа А (на обоих этапах) и SARS-CoV-2 (D614G и омикрон BA.1) (на 2 этапе). Иммунный ответ считали не меньшим (*non-inferior*), если нижняя граница 95% ДИ для отношения СГТ превышала 0,667, а для разницы показателей серологического ответа не превышала -10% [18].

На 1 этапе (апрель–июнь 2022 г.) 1631 участник был рандомизирован в подгруппу А и 1623 получили вакцинацию: 685 (42%) участников получили mRNA-1345 и СИГВ-4; 249 (15%) – mRNA-1345 и плацебо; 689 (42%) – СИГВ-4 и плацебо. Группа с терапией mRNA-1345 и плацебо оказалась меньше запланированной из-за ошибки в интерактивной системе. Из 1623 участников в группе безопасности – 877 (54%) женщин и 746 (46%) мужчин. На 2 этапе (июль–сентябрь 2022 г.) 1691 участник был рандомизирован в подгруппу В и 1681 получил вакцинацию: 564 (34%) участника получили mRNA-1345 и mRNA-1273.214; 558 (33%) – mRNA-1345 и плацебо; 559 (33%) – mRNA-1273.214 и плацебо. Среди 1681 участника 924 (55%) женщины и 757 (45%) мужчин. Профили реактогенности совместно применяемых режимов вакцинации в целом были аналогичны таковым при раздельном применении вакцин. За 6–7 мес. наблюдения в подгруппах А и В не зарегистрировано СНЯ, НЯ особого интереса, случаев прекращения участия из-за НЯ или летальных исходов, связанных с вакцинацией [18].

В подгруппе А отношение СГТ к РСВ типа А в группе, получавшей mRNA-1345 и СИГВ-4, по сравнению с группой, получавшей только mRNA-1345, составило 0,81 (95% ДИ 0,67–0,97), а разница показателей СГТ между группами составила -11,2% (95% ДИ от -17,9 до -4,1). Отношение СГТ антител к вирусу гриппа А в группах, получавших mRNA-1345 и СИГВ-4, по сравнению

с группами, получавшими только СИГВ-4, составило 0,89 (95% ДИ 0,77–1,03) для штамма А/Н1N1, 0,97 (95% ДИ 0,86–1,09) для А/Н3N2, 0,93 (95% ДИ 0,82–1,05) для В/Victoria и 0,91 (95% ДИ 0,81–1,02) для В/Yamagata. В подгруппе В отношение СГТ к РСВ типа А в группах, получавших mRNA-1345 и mRNA-1273.214, по сравнению с группой, получавшей только mRNA-1345, составило 0,80 (95% ДИ 0,70–0,90), а разница частоты серологического ответа: -4,4% (95% ДИ от -9,9 до 1,0). При сравнении группы, получавшей mRNA-1345 и mRNA-1273.214, с группой, получавшей только mRNA-1273.214, отношение СГТ нейтрализующих антител составило 0,96 (95% ДИ 0,87–1,06) для исходного штамма вируса (D614G) и 1,00 (от 0,89 до 1,14) для омикрон BA.1. Разница частоты серологического ответа: 0,2% (95% ДИ от -6,0 до 6,3) для исходного штамма SARS-CoV-2 и -0,9% (от -6,6 до 4,7) для омикрон BA.1 [18].

Совместное введение вакцин mRNA-1345 с СИГВ-4 или mRNA-1273.214 продемонстрировало приемлемый профиль безопасности и в основном не меньший иммунный ответ по сравнению с изолированным введением вакцин у лиц ≥50 лет; исключение составила разница частоты серологического ответа к РСВ типа А в подгруппе А, которая не соответствовала критерию не меньшей эффективности [18].

Выбранный дизайн с последовательной вакцинацией разных групп (с разобщением по времени вакцинации против сезонного гриппа и COVID-19) обусловлен необходимостью раздельного введения вакцин, учитывая общность групп риска для РСВ-инфекции, сезонного гриппа и COVID-19 (хронические болезни легких, сердца, почек, печени, сахарный диабет, ожирение, иммунокомпрометирующие состояния и др.) [19, 20]. Одновременная вакцинация тремя препаратами в один визит трудно реализуема, поскольку внутримышечное введение осуществляется в дельтовидную мышцу.

Проведенные исследования подтвердили благоприятный профиль безопасности mRNA-1345 как при изолированном введении, так и в совместном применении с вакцинами против гриппа и COVID-19, а также выраженную сероконверсию специфических нейтрализующих антител. Иммунный ответ при совместной иммунизации может быть снижен по сравнению с изолированным введением (табл. 1; табл. S1, Приложение 1), однако такие различия показателей иммуногенности статистически не значимы. Полученные результаты стали основой для регистрации mRNA-1345 в США для профилактики РСВ-инфекции у лиц ≥60 лет (2024 г.).

Анализ иммунологических результатов подтвердил, что 10-кратное и выше нарастание концентраций поствакцинальных нейтрализующих антител к РСВ типов А и В является коррелятом протекции в отношении РСВ-инфекции с ≥ 2 симптомами и может использоваться для оценки иммуногенности вновь разрабатываемых РСВ-вакцин [21]. В то же время необходима дальнейшая оценка mRNA-1345 при совместном введении с другими вакцинами (например, против пневмококковой инфекции) ввиду общности групп риска и осложнений по аналогии с сезонным гриппом и COVID-19. Важное значение имеет пострегистрационное изучение эффективности и безопасности в группах риска, таких как пациенты с хронической обструктивной болезнью легких, сахарным диабетом, ятрогенной иммуносупрессией на фоне терапии аутоиммунных заболеваний, а также лица с особым социальным статусом (проживающие в домах престарелых, военнослужащие).

Вакцина для профилактики сезонного гриппа

Сезонный грипп остается одной из важнейших проблем мирового здравоохранения, особенно значимой для групп риска (дети раннего возраста, лиц пожилого и старческого возраста, пациенты с хроническими заболеваниями). Для профилактики гриппа применяются вакцины, включающие актуальные штаммы A/H1N1, A/H3N2, B/Victoria и B/Yamagata, однако с марта 2020 г. случаев заражения B/Yamagata не зафиксировано² и включение данного штамма в состав вакцин признано нерациональным.

Для профилактики гриппа разработана мРНК-вакцина mRNA-1010 (Moderna, США). Были проведены КИ фазы 1/2 (NCT04956575) и фазы 3 (NCT05827978). Исследование фазы 1/2 состояло из трех частей; участники в возрасте ≥ 18 лет были рандомизированы в группы, получавшие однократно mRNA-1010 (6,25–200 мкг) или плацебо (часть 1) или препарат сравнения СИГВ-4 (часть 2 или 3) [22]. Основными целями исследования были оценка безопасности, реактогенности и иммуногенности mRNA-1010 по сравнению с плацебо (часть 1) или препаратом сравнения (части 2 и 3). Дополнительно оценивался клеточный иммунный ответ (часть 1) и перекрестная реактивность к гетерологичным вакцинным штаммам A/H3N2 (части 2 и 3). НЯ чаще регистрировались при введении mRNA-1010, чем в группах плацебо или СИГВ-4, и носили легкий или средний характер. СНЯ или летальных исходов, связанных

с вакциной, не зарегистрировано. В частях 1 и 2 вакцина mRNA-1010 (25–200 мкг) на 29 сут после вакцинации индуцировала выраженные титры антител (по данным РТГА), сохранявшиеся 6 мес. В части 3 более низкие дозы mRNA-1010 (6,25–25 мкг) на 29 сут индуцировали титры, которые были выше или сопоставимы с иммунным ответом на СИГВ-4 к вариантам гриппа А. По сравнению с СИГВ-4, mRNA-1010 (50 мкг) индуцировала более выраженный антительный ответ к вирусу гриппа А/H3N2 (часть 2). Также mRNA-1010 индуцировала более высокий Т-клеточный ответ, чем плацебо, на 8 сут, который сохранялся или усиливался к 29 сут (часть 1) [22]. Полученные результаты обосновывают необходимость дальнейших исследований безопасности и иммуногенности mRNA-1010.

Включение дополнительных штаммов A/H3N2 в состав сезонных гриппозных вакцин позволит расширить охват против антигенно различных циркулирующих клонированных A/H3N2 и потенциально заменить B/Yamagata. В рандомизированном открытом КИ фазы 1/2 с участием 696 здоровых взрослых лиц 50–75 лет [23] участники были рандомизированы (1:1:1:1:1:1) для получения однократной дозы mRNA-1011.1 (пентавалентная вакцина с дополнительным штаммом A/H3N2 Newcastle), mRNA-1011.2 (квадριвалентная вакцина; B/Yamagata заменен на A/H3N2 Newcastle), mRNA-1012 в одной из двух дозировок (пентавалентная; B/Yamagata заменен на A/H3N2 Newcastle и Hong Kong) или одного из трех квадριвалентных контрольных препаратов mRNA-1010, каждый из которых кодирует один из исследуемых вариантов A/H3N2. Штаммовый состав соответствовал рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) на соответствующий эпидемиологический сезон, но с включением референтного штамма A/H3N2 Newcastle или A/H3N2 Hong Kong, что позволяет расширить штаммовый состав вакцин по необходимости без увеличения объемов выпуска. Основные конечные точки – оценка безопасности и реактогенности; вторичная конечная точка – оценка иммуногенности на 29 сут по сравнению с контрольными препаратами mRNA-1010 по результатам РТГА [23].

Частота ожидаемых НЯ была схожей во всех группах: 551 (79%) из 694 участников сообщили как минимум об одном ожидаемом НЯ в течение 7 сут, 83 (12%) из 696 участников – об одном непредвиденном НЯ в течение 28 сут после вакцинации. Летальных исходов и СНЯ, связанных с вакцинацией, не зарегистрировано. Все

² <https://www.who.int/ru/news/item/27-02-2026-recommendations-for-influenza-vaccine-composition-for-the-2026-2027-northern-hemisphere-season>

вакцины индуцировали выраженный антительный ответ к соответствующим штаммам на 29 сут, аналогичный контрольным группам, а также более высокий ответ к дополнительным штаммам A/H3N2. Нарастание СГТ РТГА на 29 сут по сравнению с исходным составило: для mRNA-1011.1 – 3,0 (95% ДИ 2,6–3,6; Darwin) и 3,1 (95% ДИ 2,6–3,8; Newcastle); для mRNA-1011.2 – 3,3 (95% ДИ 2,7–4,1; Darwin) и 4,2 (95% ДИ 3,4–5,2; Newcastle); для mRNA-1012 50,0 мкг – 3,4 (95% ДИ 2,9–4,0; Darwin), 4,5 (95% ДИ 3,6–5,5; Newcastle) и 5,1 (95% ДИ 4,2–6,2; Hong Kong); для mRNA-1012 62,5 мкг – 2,6 (95% ДИ 2,2–3,1; Darwin), 3,7 (95% ДИ 3,0–4,6; Newcastle) и 4,1 (95% ДИ 3,3–5,1; Hong Kong). Включение дополнительных штаммов A/H3N2 не снижало ответ к A/H1N1 или гриппу В, а удаление B/Yamagata не влияло на ответ на B/Victoria [23].

Таким образом, подтвержден благоприятный профиль безопасности различных мРНК-вакцин для профилактики сезонного гриппа. С учетом установленных коррелятов протекции мРНК-вакцины продемонстрировали выраженный потенциальный протективный эффект. Преимуществом мРНК-технологии является возможность быстрой смены штаммового состава и отсутствие зависимости от поставок куриных эмбрионов для культивирования вакцинных штаммов, а также возможность расширения штаммового состава новых вакцин по эпидемиологической необходимости без ущерба для объемов выпуска, что является неизбежным негативным эффектом внедрения квадριвалентных гриппозных вакцин вместо тривалентных.

При оценке иммуногенности по СГТ РТГА к вакцинным штаммам вируса гриппа мРНК-вакцины показали высокую иммуногенность по сравнению с традиционными, получаемыми путем выращивания штаммов в куриных эмбрионах. Однако частота местных и системных НЯ после вакцинации мРНК-вакцинами существенно превышала таковую после введения традиционных вакцин.

Параметры иммунного ответа на вакцинацию против сезонного гриппа хорошо изучены в отношении коррелятов протекции. Показатели гуморального поствакцинального ответа можно определять различными методами (РТГА, одинократная радиальная иммунодиффузия), однако на поздних стадиях разработки может потребоваться оценка клинической эффективности вновь разрабатываемых гриппозных вакцин (влияние на заболеваемость сезонным гриппом и исходы заболевания). Важным этапом является оценка эффективности и безопасности у групп повышенного риска (пожилые, пациенты с хроническими заболеваниями органов

дыхания, сердечно-сосудистыми заболеваниями, сахарным диабетом и ожирением, иммунокомпрометирующими состояниями, а также лица с профессиональными и социальными факторами риска). Учитывая опыт разработки других вакцин для профилактики инфекций нижних дыхательных путей (включая вакцины против РСВ-инфекции, COVID-19 и пневмококковой инфекции), необходимо изучение взаимного влияния мРНК-вакцин против гриппа при совместном применении с указанными препаратами в рамках предрегистрационных КИ.

Вакцина для профилактики цитомегаловирусной инфекции

Цитомегаловирус относится к семейству герпесвирусов (герпесвирус человека 5-го типа). Инфекция, вызываемая ЦМВ, часто протекает бессимптомно (инфицированность взрослого населения достигает 90%), однако главная опасность вируса связана с риском внутриутробных аномалий плода при заражении женщины во время беременности (TORCH-инфекция). В настоящее время вакцины для профилактики ЦМВ не зарегистрированы.

Вакцина-кандидат mRNA-1647 (Moderna, США) кодирует пентамерный комплекс (gH/gL/pUL128-131) – антиген, с помощью которого ЦМВ проникает в клетки-мишени (эпителиальные, эндотелиальные и миелоидные клетки-предшественники). В исследование фазы 1 (NCT03382405) были включены 154 участника (80 серонегативных к ЦМВ, 74 серопозитивных), из которых 118 получили mRNA-1647, 36 – плацебо. Изучены дозировки 30, 90, 180 и 300 мкг со схемой введения 0–2–6 (вторую дозу вводили через 2 мес. после первой дозы, третью дозу – через 6 мес. после первой дозы) [24]. Смертельных исходов, СНЯ или НЯ, представляющих особый интерес, не зарегистрировано; большинство НЯ были легкой или средней степени. Во всех группах, получавших mRNA-1647, наблюдалось повышение уровня нейтрализующих и связывающих антител, а также антигенспецифического клеточно-опосредованного ответа независимо от исходного статуса к ЦМВ.

Титры нейтрализующих антител, препятствующих инфицированию фибробластов и эпителиальных клеток, в сыворотке крови серонегативных участников, получавших mRNA-1647, были выше, чем в контрольных образцах сыворотки серопозитивных лиц, и сохранялись на высоком уровне в течение 12 мес. после третьей дозы [25]. Доля антигенспецифических В-клеток памяти увеличивалась после каждой дозы mRNA-1647 у серопозитивных и серонегативных

участников и оставалась повышенной до 6 мес. после третьей дозы.

Вакцинация mRNA-1647 индуцировала значительное увеличение доли и степени полифункциональности Т-хелперов клеток 1-го типа CD4⁺ и эффекторных Т-клеток CD8⁺ у серонегативных и серопозитивных участников после стимуляции ЦМВ-специфичными пептидами. Таким образом, трехкратная вакцинация mRNA-1647 стимулировала длительный иммунный ответ с образованием высоких титров нейтрализующих антител, активацией В-клеток памяти и Т-клеточного звена при благоприятном профиле безопасности, что обосновывает дальнейшую клиническую разработку вакцины.

Сравнительный анализ иммуногенности и безопасности вакцины-кандидата mRNA-1647 и ранее исследованной вакцины gB/MF59 (субъединичная вакцина на основе гликопротеина В (gB) с адъювантом MF59; профилактическая эффективность ≈50%) [26] выполнен на основе данных исследования NCT03382405. В ходе КИ у серопозитивных и серонегативных по ЦМВ участников были оценены уровни индуцированных mRNA-1647 нейтрализующих антител и Fc-опосредованных эффекторных антител (IgG) в течение года после введения третьей дозы. Сравнивались антительные ответы к gB у серонегативных участников, вакцинированных mRNA-1647, и серонегативных участников, получивших gB/MF59. Вакцинация mRNA-1647 индуцировала и усиливала IgG-ответ к ЦМВ у серонегативных и серопозитивных участников соответственно, включая выработку нейтрализующих антител и Fc-опосредованных эффекторных антител. При этом уровни IgG к gB были ниже, чем к пентамерному комплексу. Показатели IgG-ответа к gB и уровень антителозависимого клеточного фагоцитоза уступали значениям, индуцированным вакциной gB/MF59. Однако mRNA-1647 вызывала более выраженный гуморальный и цитотоксический иммунный ответ.

Ранее было объявлено о прекращении КИ фазы 3 вакцины mRNA-1647 для профилактики ЦМВ-инфекции ввиду недостижения первичной конечной точки эффективности³. Очевидно, что различные исследовательские группы в настоящее время далеки от создания эффективной вакцины против ЦМВ [27]. Оценить потенциальные иммунологические корреляты протекции можно будет только после успешной разработки вакцины с подтвержденной протективной эффективностью, что потребует значительного времени.

Вакцина для профилактики лихорадки Зика

Лихорадка Зика — острое вирусное заболевание, передающееся комарами рода *Aedes*. Инфекция проявляется легкой сыпью, лихорадкой, конъюнктивитом и артралгией, при этом до 70–80% случаев протекает бессимптомно. Основную угрозу представляет развитие микроцефалии у плода при инфицировании беременных, а также синдром Гийена — Барре. Заболевание эндемично для Южной и Центральной Америки, Центральной Африки и Юго-Восточной Азии. В настоящее время специфическое лечение и зарегистрированные вакцины отсутствуют.

Проведены два рандомизированных плацебо-контролируемых многоцентровых КИ фазы 1 по подбору дозы вакцин-кандидатов: mRNA-1325 (NCT03014089) и mRNA-1893 (NCT04064905) [28]. Вакцина mRNA-1325 кодировала структурные белки prM и E (prME) изолята вируса Зика 2007 г. (Микронезия), а mRNA-1893 — белки prME изолята вируса Зика RIO-U1. В обоих КИ участвовали здоровые взрослые 18–49 лет, серонегативные к вирусу Зика и другим флавивирусам. В исследовании mRNA-1325 (90 участников; США, 3 центра; 14.12.2016–16.08.2018) участники были рандомизированы (1:4) в группы плацебо или mRNA-1325 (3 группы: 10, 25 или 100 мкг) и получали две дозы вакцины. В исследовании mRNA-1893 (120 участников; США — 3 центра, Пуэрто-Рико — 1 центр; 23.07.2019–22.03.2021) участники были рандомизированы (1:4) в группы плацебо или mRNA-1893 (4 группы: 10, 30, 100 или 250 мкг) и получили первую дозу вакцины в 1 сут, вторую дозу — на 29 сут. Безопасность оценивали в популяции анализа безопасности (лица, получившие хотя бы одну дозу вакцины) и в популяции анализа запрашиваемых НЯ (лица, предоставившие запрашиваемые данные о НЯ). Конечными точками являлись ожидаемые НЯ в течение 7 сут и НЯ в течение 28 сут после вакцинации. Вторичной конечной точкой в обоих КИ была оценка иммуногенности по титру вируснейтрализующих антител [28].

В исследовании mRNA-1325 все дозы (10, 25, 100 мкг) хорошо переносились, однако вакцина индуцировала слабый ответ нейтрализующих антител к вирусу Зика. Через 28 сут после второй дозы значения СГТ антител были наибольшими в группе с дозировкой 10 мкг (10,3; 95% ДИ 5,9–18,2) [28].

В исследовании mRNA-1893 НЯ были легкой или средней степени, чаще при высоких дозах и после второй дозы; большинство не были

³ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05085366>

связаны с вакцинацией. На 57 сут (через 29 сут после введения второй дозы) во всех группах с введением mRNA-1893 был определен выраженный ответ нейтрализующих антител к вирусу Зика независимо от серологического статуса по флавивирусам, сохранявшийся до 13 мес. На 57 сут у серонегативных по флавивирусам участников значения СГТ нейтрализующих антител (по данным теста нейтрализации) были самыми высокими для mRNA-1893 в группе с дозировкой 100 мкг — 454,2 (95% ДИ 330,0–619,6); у серопозитивных участников — в группах с дозировками 10 мкг (224,1; 95% ДИ 43,5–1153,5) и 100 мкг (190,5; 95% ДИ 19,2–1887,2) [28].

Проблема разработки вакцины для профилактики лихорадки Зика обусловлена рядом факторов. Низкий уровень заболеваемости делает оценку протективной эффективности в рамках КИ труднореализуемой, так как для этого требуется привлечение чрезмерного числа участников. Оценка эффективности вакцин-кандидатов по показателям гуморального иммунитета невозможна из-за отсутствия данных о защите от заражения у привитых лиц, что не позволяет обосновать корреляты протекции и провести математическое моделирование защитных титров антител.

Вакцина для профилактики бешенства

Бешенство является зоонозной инфекцией с абсолютной летальностью при несвоевременной или неадекватной постэкспозиционной помощи, включающей курс вакцинации и введение антирабического иммуноглобулина (по показаниям). Вакцина-кандидат CV7201 (CureVac, Германия) на основе мРНК кодирует гликопротеин вируса бешенства. Открытое неконтролируемое проспективное КИ фазы 1 (101 участник; Германия, 1 центр; 21.10.2013–11.01.2016; NCT02241135) [29] проводилось с участием здоровых лиц в возрасте 18–40 лет (без вакцинации против бешенства в анамнезе) в группах с введением трех возрастающих доз CV7201 (внутрикожно или внутримышечно с использованием иглы-шприца или одного из трех безыгольных устройств) и одной группы с бустерной дозой через 1 год. Первичной конечной точкой была оценка безопасности и переносимости, вторичной — минимальная доза CV7201, индуцирующая титры нейтрализующих антител к вирусу бешенства $\geq 0,5$ МЕ/мл (защитный уровень, принятый ВОЗ).

Вакцинированные в ходе КИ получили в общей сложности 306 доз вакцины CV7201 (в дозировке 80–640 мкг): 18 внутрикожно и 24 внутримышечно с использованием шприца с иглой;

46 внутрикожно и 13 внутримышечно с применением безыгольных устройств. В течение 7 сут после вакцинации местные НЯ зарегистрированы у 60 из 64 (94%) участников при внутрикожном введении, и 36 из 37 (97%) — при внутримышечном; системные НЯ — у 50 из 64 (78%) и 29 из 37 (78%) соответственно, включая десять случаев тяжелой степени. Зафиксировано одно непредвиденное СНЯ (возможно, связанное с предыдущим введением), которое развилось через 7 сут после внутримышечной инъекции 640 мкг и разрешилось без последствий [29].

Вакцинация CV7201 с применением безыгольного устройства обеспечила достижение защитного уровня вируснейтрализующих антител ($\geq 0,5$ МЕ/мл) у 32 из 45 (71%) участников при внутрикожном введении (в дозах 80 или 160 мкг) и у 6 из 13 (46%) — при внутримышечном (200 или 400 мкг). Через год ревакцинация внутрикожно в дозе 80 мкг безыгольным устройством обеспечила защитные титры у 8 из 14 (57%) участников. Напротив, внутрикожное или внутримышечное введение с использованием иглы-шприца оказалось неэффективным: защитные титры выявлены только у одного участника (при внутрикожной инъекции 320 мкг). Таким образом, в КИ впервые показано, что профилактическая мРНК-вакцина способна индуцировать функциональные антитела при введении исключительно безыгольным устройством [29].

Эффективная постэкспозиционная вакцинапрофилактика бешенства является приоритетной задачей антирабической помощи. Критерием успешной вакцинации признан уровень вируснейтрализующих антител $\geq 0,5$ МЕ/мл после завершения курса. Недостаточная иммуногенность антирабической мРНК-вакцины ставит под сомнение целесообразность ее дальнейшей разработки, учитывая наличие высокоэффективных инаktivированных культуральных антирабических вакцин. Даже при создании новых вакцин с приемлемой иммуногенностью оценка их протективной эффективности в КИ этически невозможна из-за абсолютной летальности бешенства после развития заболевания.

Ограничения исследования

Проведенное исследование представляет собой описательный обзор результатов КИ мРНК-вакцин для профилактики инфекционных заболеваний (за исключением COVID-19) и не включает метаанализ данных. Поиск ограничен публикациями из стран европейского и североамериканского региона. Рассмотренные исследования являются преимущественно поисковыми, что не позволяет в полной мере оценить

истинную эффективность и безопасность изучаемых вакцин-кандидатов. Кроме того, для анализа отобраны публикации, подготовленные с участием разработчиков вакцин, которые уже коммерциализированы или имеют значительные перспективы регистрации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ результатов клинических исследований мРНК-вакцин для профилактики РСВ-, ЦМВ-инфекций, сезонного гриппа, лихорадки Зика и бешенства позволил обобщить данные об их эффективности и безопасности. Не для всех инфекционных заболеваний установлены иммунологические корреляты протекции, в частности для ЦМВ-инфекции и лихорадки Зика, что затрудняет оценку эффективности вакцин-кандидатов, особенно на ранних этапах клинической разработки. Одобренные вакцины для профилактики этих инфекций отсутствуют. Оценка эффективности новых мРНК-вакцин целесообразно проводить с использованием суррогатных маркеров (преимущественно по показателям гуморального иммунного ответа) на ранних этапах разработки, в том числе для профилактики хорошо изученных вакциноуправляемых инфекций. Профилактическую эффективность необходимо подтверждать на поздних этапах разработки в рамках масштабных клинических исследований с достаточной статистической мощностью и выборкой. Примером таких масштабных исследований протективной эффективности является программа клинической разработки мРНК-вакцины mRNA-1345 против РСВ-инфекции, которая продемонстрировала клиническую эффективность в профилактике симптоматических форм РСВ-инфекции. Показано, что различные варианты мРНК-вакцин для профилактики сезонного гриппа обладали достаточной иммуногенностью, в том числе при прямом сравнении

с зарегистрированными инактивированными вакцинами. В исследовании кандидатной мРНК-вакцины против бешенства продемонстрирована иммуногенность (индукция защитных титров антител по критериям ВОЗ), однако не у всех вакцинированных, что показало ограниченность потенциала данной разработки.

Оценка безопасности является обязательной на всех этапах клинических исследований. Профиль безопасности рассмотренных мРНК-вакцин является приемлемым в рамках ограниченных по масштабу исследований, хотя частота развития местных и системных НЯ, как правило, выше среди вакцинированных этими мРНК-вакцинами, чем в случае зарегистрированных препаратов сравнения или плацебо. Вместе с тем масштабный опыт применения мРНК-вакцин для профилактики COVID-19 выявил определенные проблемы безопасности (например, развитие поствакцинального миокардита), поэтому при разработке новых препаратов на основе мРНК-технологий и в пострегистрационный период необходимо учитывать возможность как известных, так и новых потенциальных рисков.

Проведенная работа подтверждает, что в отношении мРНК-вакцин для профилактики инфекционных болезней рационально применять те же подходы к оценке эффективности и безопасности, что к вакцинам, полученным традиционными биотехнологическими методами. При разработке новых мРНК-вакцин важным этапом при проведении клинических исследований должна стать сравнительная оценка их иммуногенности и безопасности по сравнению с зарегистрированными вакцинами (в соответствии с рекомендациями ВОЗ) для корректной оценки соотношения ожидаемой пользы к риску применения вакцин и параметров их эффективности, особенно при наличии общих антигенов с уже зарегистрированными препаратами.

Литература/References

1. Zinatizadeh MR, Zarandi PK, Zinatizadeh M, et al. Efficacy of mRNA, adenoviral vector, and perfusion protein COVID-19 vaccines. *Biomed Pharmacother*. 2022;146:112527. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112527>
2. Hogan MJ, Pardi N. mRNA vaccines in the COVID-19 pandemic and beyond. *Annu Rev Med*. 2022;73:17–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042420-112725>
3. Hussain A, Yang H, Zhang M, et al. mRNA vaccines for COVID-19 and diverse diseases. *J Control Release*. 2022;345:314–33. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.03.032>
4. Liu MA, Zhou T, Sheets RL, et al. WHO informal consultation on regulatory considerations for evaluation of the quality, safety and efficacy of RNA-based prophylactic vaccines for infectious diseases, 20–22 April 2021. *Emerg Microbes Infect*. 2022;11(1):384–91. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2026742>
5. Bozkurt B, Kamat I, Hotez PJ. Myocarditis with COVID-19 mRNA vaccines. *Circulation*. 2021;144(6):471–84. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.121.056135>
6. Patone M, Mei XW, Handunnetthi L, et al. Risks of myocarditis, pericarditis, and cardiac arrhythmias associated with COVID-19 vaccination or SARS-CoV-2 infection. *Nat Med*. 2022;28(2):410–22. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01630-0>
7. Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, et al. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res*. 1984;12(18):7035–56. <https://doi.org/10.1093/nar/12.18.7035>
8. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem*. 2002;48(10):1647–53. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.10.1647>
9. Kauffman KJ, Webber MJ, Anderson DG. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. *J Control Release*. 2016;240:227–34. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.032>
10. Young AP, Kanneganti TD. For “U” the bell tolls: Pseudouridine evades TLR detection. *Mol Cell*. 2025;85(17):3206–8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2025.08.008>

11. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*. 2005;23(2):165–75. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>
12. Guan S, Rosenecker J. Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems. *Gene Ther*. 2017;24(3):133–43. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.5>
13. Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, et al. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release*. 2015;217:345–51. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.007>
14. Patel S, Ashwanikumar N, Robinson E, et al. Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA. *Nat Commun*. 2020;11(1):983. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14527-2>
15. Голяк НС, Царенков ВМ, Сушинская ОА и др. Достижения в области разработки вакцин на основе мРНК. *Вестник фармации*. 2025;(2):77–97. Golyak NS, Tsarenkov VM, Sushinskaya OA, et al. Advances in the development of mRNA-vaccines. *Vestnik Farmatsii*. 2025;(2):77–97 (In Russ.). <https://doi.org/10.52540/2074-9457.2025.2.77>
16. Литвинова ВР, Рудометов АП, Карпенко ЛИ, Ильичев АА. Платформа мРНК-вакцин: особенности получения и доставки мРНК. *Биоорганическая химия*. 2023;49(2):134–52. Litvinova VR, Rudometov AP, Karpenko LI, Ilyichev AA. mRNA-vaccine platform: Features of obtaining and delivery of mRNA. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2023;49(2):134–52 (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S013234232302015X>
17. Wilson E, Goswami J, Baqui AH, et al. Efficacy and safety of an mRNA-based RSV PreF vaccine in older adults. *N Engl J Med*. 2023;389(24):2233–44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2307079>
18. Goswami J, Cardona JF, Hsu DC, et al. Safety and immunogenicity of mRNA-1345 RSV vaccine coadministered with an influenza or COVID-19 vaccine in adults aged 50 years or older: An observer-blinded, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis*. 2025;25(4):411–23. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(24\)00589-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00589-9)
19. Bajema KL, Bui DP, Yan L, et al. Severity and long-term mortality of COVID-19, influenza, and respiratory syncytial virus. *JAMA Intern Med*. 2025;185(3):324–34. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2024.7452>
20. Hitchens A, Candrilli SD, Carrico J, et al. Prevalence of health conditions associated with higher risk for severe respiratory syncytial virus, influenza, or COVID-19. *Curr Med Res Opin*. 2025;41(7):1353–61. <https://doi.org/10.1080/03007995.2025.2535456>
21. Ma C, Du J, Lan L, et al. Immune correlates analysis of mRNA-1345 RSV vaccine efficacy clinical trial. *Nat Commun*. 2025;16(1):6118. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-61153-x>
22. Ananworanich J, Lee IT, Ensz D, et al. Safety and Immunogenicity of mRNA-1010, an Investigational Seasonal Influenza Vaccine, in Healthy Adults: Final Results From a Phase 1/2 Randomized Trial. *J Infect Dis*. 2025 Feb 4;231(1):e113–e122. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiae329>
23. Hsu D, Jayaraman A, Pucci A, et al. Safety and immunogenicity of mRNA-based seasonal influenza vaccines formulated to include multiple A/H3N2 strains with or without the B/Yamagata strain in US adults aged 50–75 years: A phase 1/2, open-label, randomised trial. *Lancet Infect Dis*. 2025;25(1):25–35. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(24\)00493-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00493-6)
24. Fierro C, Brune D, Shaw M, et al. Safety and immunogenicity of a messenger RNA-based cytomegalovirus vaccine in healthy adults: results from a phase 1 randomized clinical trial. *J Infect Dis*. 2024;230(3):e668–78. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiae114>
25. Wu K, Hou YJ, Makrinos D, et al. Characterization of humoral and cellular immunologic responses to an mRNA-based human cytomegalovirus vaccine from a phase 1 trial of healthy adults. *J Virol*. 2024;98(4):e0160323. <https://doi.org/10.1128/jvi.01603-23>
26. Hu X, Karthigeyan KP, Herbek S, et al. Human cytomegalovirus mRNA-1647 vaccine candidate elicits potent and broad neutralization and higher antibody-dependent cellular cytotoxicity responses than the gB/MF59 vaccine. *J Infect Dis*. 2024;230(2):455–66. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad593>
27. Das R, Blázquez-Gamero D, Bernstein DI, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of a replication-defective human cytomegalovirus vaccine, V160, in cytomegalovirus-seronegative women: A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Infect Dis*. 2023;23(12):1383–94. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00343-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00343-2)
28. Essink B, Chu L, Seger W, et al. The safety and immunogenicity of two Zika virus mRNA vaccine candidates in healthy flavivirus baseline seropositive and seronegative adults: the results of two randomised, placebo-controlled, dose-ranging, phase 1 clinical trials. *Lancet Infect Dis*. 2023;23(5):621–33. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00764-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00764-2)
29. Alberer M, Gnad-Vogt U, Hong HS, et al. Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: An open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet*. 2017;390(10101):1511–20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31665-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31665-3)

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещено Приложение 1 (таблица S1). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-311-323-annex>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.Ю. Бутырский, А.С. Коровкин** – концепция работы, обработка и анализ данных литературы, написание текста рукописи; **Д.В. Горенков** – критическое обсуждение и редактирование текста рукописи; **В.А. Меркулов** – утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Использование генеративного искусственного интеллекта. Авторы заявляют, что не использовали генеративный ИИ при подготовке рукописи.

Supplementary information. Supplementary material 1 (Table S1) is available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-311-323-annex>

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.Yu. Butirskiy** and **A.S. Korovkin** conceptualized the study, reviewed and analysed literature data, and drafted the manuscript. **D.V. Gorenkov** participated in the critical discussion and editing of the manuscript. **V.A. Merkulov** approved the final version of the manuscript for publication.

Use of generative artificial intelligence. The authors declare that they did not use generative AI during the preparation of the manuscript.

Об авторах / Authors

Бутырский Алексей Юрьевич / Alexey Yu. Butirskiy

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X>

Коровкин Алексей Сергеевич, канд. мед. наук / Alexey S. Korovkin, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3241-1053>

Горенков Дмитрий Витальевич / Dmitry V. Gorenkov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф. / Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 21.05.2026

После доработки 10.09.2026

Принята к публикации 25.09.2026

Received May 21, 2026

Revised September 10, 2026

Accepted September 25, 2026

Вакцины для профилактики хантавирусных лихорадок: обзор результатов и перспектив разработок

Р.Д. Теодорович^{1,✉} , Т.К. Дзагурова¹ , С.С. Курашова¹ , М.С. Егорова¹ ,
Н.А. Коротина¹ , М.В. Баловнева¹ , А.А. Ишмухаметов^{1,2} 

¹ Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), поселок Института Полиомиелита, д. 8, корп. 1, вн. тер. г. муниципальный округ Филimonковский, Москва, 108819, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Теодорович Ростислав Дмитриевич; teodorovich_rd@chumakovs.su

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Хантавирусные лихорадки, регистрируемые как геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) на Евроазиатском и хантавирусный пульмональный синдром (ХПС) на Американском континентах, представляют собой природно-очаговые болезни с широким диапазоном клинических проявлений. Возбудители — представители рода *Orthohantavirus*, резервуаром которых в природе являются грызуны различных видов. Этиотропной терапии хантавирусных лихорадок в настоящее время не существует. Специфическая профилактика в форме вакцинации проводится только в КНДР, Республике Корея и КНР. Важной задачей является обеспечение российского и европейского рынка актуальной вакциной для профилактики ГЛПС. Противохантавирусная вакцина должна разрабатываться как с учетом подходов, доказавших временем свою эффективность, так и опыта современных разработок.

ЦЕЛЬ. Анализ применения существующих хантавирусных и особенностей разрабатываемых вакцин, а также оценка перспектив создания вакцин для профилактики ГЛПС в Российской Федерации.

ОБСУЖДЕНИЕ. Все коммерчески доступные вакцинные препараты являются инактивированными цельновирионными вакцинами на основе вирусов Хантаан и Сеул. Эффективность этих препаратов различается, но отмечается существенное снижение заболеваемости в регионах с массовой вакцинацией и низкая частота побочных явлений. В России разработаны несколько инактивированных цельновирионных вакцин на основе актуальных штаммов ортохантавирусов. Некоторые из разработок успешно прошли доклинические испытания. Спектр разрабатываемых хантавирусных вакцинных препаратов представлен субъединичными вакцинами, вакцинами на основе вирусоподобных частиц и вирусных векторов, ДНК- и мРНК-вакцин. В качестве основных иммуногенов используются поверхностные гликопротеины G₁ и G₂ хантавирусов. Наиболее близко к внедрению в медицинскую практику оказались ДНК-вакцины на основе вирусов Пуумала и Хантаан, прошедшие клинические исследования (фаза I).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Ни один вакцинный препарат для профилактики хантавирусных инфекций, разработанный на основе вирусоподобных частиц, вирусных векторов, нуклеиновых кислот, не прошел полного цикла клинических испытаний и не лицензирован в мире. Напротив, отлаженные традиционные технологии изготовления инактивированных вакцин и их доказанная временем эффективность обуславливают реальные перспективы их практического применения в России и других европейских странах.

Ключевые слова: вакцины; ортохантавирусы; хантавирусные лихорадки; геморрагическая лихорадка с почечным синдромом; вирус Пуумала; вирус Хантаан; вирус Сеул; вирус Син Номбр; вирус Андес

Для цитирования: Теодорович Р.Д., Дзагурова Т.К., Курашова С.С., Егорова М.С., Коротина Н.А., Баловнева М.В., Ишмухаметов А.А. Вакцины для профилактики хантавирусных лихорадок: обзор результатов и перспектив разработок. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(3):324–335. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-324-335>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) № FNZG20240006.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Vaccines for the prevention of hantavirus fevers: An overview of results and development prospects

Rostislav D. Theodorovich¹, Tamara K. Dzagurova¹,
Svetlana S. Kurashova¹, Maria S. Egorova¹, Natalia A. Korotina¹,
Mariya V. Balovneva¹, Aydar A. Ishmukhametov^{1,2}

¹ Chumakov Federal Scientific Centre for Research and Development of Immune-and-Biological Products (Institute of Poliomyelitis), 8/1 Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement "Moskovskiy", Moscow 108819, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Rostislav D. Theodorovich; teodorovich_rd@chumakovs.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Hantavirus fevers, known as hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Eurasia and hantavirus pulmonary syndrome (HPS) in the Americas, are natural focal diseases with a wide range of clinical manifestations. The causative agents are members of the genus *Orthohantavirus*, whose natural reservoirs are rodents of various species. There is currently no etiotropic therapy for these diseases. Specific prophylaxis through vaccination is available only in the DPRK, the Republic of Korea, and the People's Republic of China. An important objective is to provide the Russian and European markets with a relevant vaccine for HFRS prevention. Such a vaccine should be developed based on both time-proven approaches and the experience of modern developments.

AIM. Analysis of the use of existing hantavirus vaccines and the specific features of vaccines under development, as well as assessment of the prospects for creating vaccines for HFRS prevention in the Russian Federation.

DISCUSSION. All commercially available vaccine preparations are inactivated whole-virion vaccines based on the Hantaan and Seoul viruses. The effectiveness of these preparations varies, but a significant reduction in the incidence rate in regions with mass vaccination and a low incidence of adverse events have been noted. Several inactivated whole-virion vaccines based on relevant orthohantavirus strains have been developed in Russia. Some of these developments have successfully completed preclinical studies. The spectrum of hantavirus vaccine preparations under development includes subunit vaccines, vaccines based on virus-like particles (VLPs) and viral vectors, DNA vaccines, and mRNA vaccines. The primary immunogens are the surface glycoproteins Gn and Gc of hantaviruses. The closest to implementation into clinical practice are the DNA vaccines based on the Puumala and Hantaan viruses, which have undergone clinical trials (phase I).

CONCLUSIONS. No vaccine for the prevention of hantavirus infections developed using virus-like particles (VLPs), viral vectors, or nucleic acids (DNA or mRNA) has undergone a full cycle

of clinical trials or been licensed worldwide. On the contrary, well-established traditional technologies for manufacturing inactivated vaccines and their time-proven effectiveness provide a basis for their real prospects of practical application in the Russian Federation and other European countries.

Keywords: vaccines; orthohantaviruses; hantavirus fevers; hemorrhagic fever with renal syndrome; Puumala virus; Hantaan virus; Seoul virus; Sin Nombre virus; Andes virus

For citation: Theodorovich R.D., Dzagurova T.K., Kurashova S.S., Egorova M.S., Korotina N.A., Balovneva M.V., Ishmukhametov A.A. Vaccines for the prevention of hantavirus fevers: An overview of results and development prospects. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(3):324–335. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-26-3-324-335>

Funding. The research was funded by the state assignment of the Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis). Registration number: FNZG20240006.

Disclosure. The authors declare no conflicts of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Хантавирусные инфекции зарегистрированы по всему миру, за исключением Австралии, и известны под названием «геморрагическая лихорадка с почечным синдромом» (ГЛПС) на Евроазиатском и «хантавирусный пульмональный синдром» (ХПС) — на Американском континентах. Заболевания являются зоонозами вирусной природы с аэрогенным механизмом передачи возбудителя, характеризуются системным поражением мелких сосудов, геморрагическим диатезом, гемодинамическими расстройствами с преимущественным поражением почек и легких при ГЛПС и ХПС соответственно.

В России ГЛПС регистрируется в 64 из 89 субъектов со средней заболеваемостью 7155 случаев/год (2 289–13 996 случаев/год). Около 98% всей заболеваемости вызывает *Orthohantavirus puumalaense* (вирус Пуумала, ПУУ); ≈1,5% приходится на ГЛПС, вызываемой *Orthohantavirus hantaanense* (вирусы Хантаан — ХТН и Амур), и *Orthohantavirus seulense* (вирус Сеул, СЕУ); <0,5% вызывается *Orthohantavirus dobravaense* (вирусы Куркино и Сочи). Более 98% от общего числа случаев ГЛПС выявлено в европейской части России и <2% — в азиатской, главным образом на Дальнем Востоке [1].

Этиотропная терапия хантавирусных лихорадок отсутствует. Лечение носит патогенетический и симптоматический характер. Тяжелые формы заболевания сопровождаются инфекционно-токсическим шоком, ДВС-синдромом, отеком легких, мозга, полиорганной недостаточностью, что приводит к летальному исходу [2]. Противоэпидемические мероприятия при ГЛПС ограничены неспецифической профилактикой и направлены в основном на ограничение возможных контактов людей с грызунами с целью снижения риска заражения.

Принимая во внимание тенденцию к увеличению регистрируемых случаев ГЛПС за последнее десятилетие [3], наиболее перспективной стратегией для борьбы с ГЛПС может стать применение профилактических вакцин. В настоящее время ни одна вакцина против ГЛПС не одобрена ВОЗ. В то же время в КНР, КНДР и Республике Корея цельновирионные инактивированные вакцины на основе вирусов Хантаан и Сеул успешно применяются с конца 80-х годов XX века. Россия занимает второе место после КНР по числу ежегодно регистрируемых случаев ГЛПС. Однако существующие коммерческие вакцины не могут использоваться на территории европейских стран, где основным возбудителем является вирус Пуумала.

В мире активно разрабатываются ДНК- и мРНК-вакцины и другие генно-инженерные противохантавирусные вакцинные препараты. Но лицензированных вакцин против хантавирусных инфекций ни в одной стране на данный момент нет. Многие из разрабатываемых препаратов проходят различные этапы доклинических и клинических испытаний [4]. Учитывая отсутствие актуальных для европейских стран и России противохантавирусных вакцин и эффективных методик лечения хантавирусных лихорадок, большое значение приобретает вопрос их разработки. При создании вакцинного препарата в первую очередь следует определиться с его дизайном и платформой для наработки активного компонента. Опыт производства и применения существующих вакцин и результаты разработок новых могут послужить опорой при создании препарата, имеющего перспективы применения не только в России, но и на территории других европейских государств.

Цель работы — анализ применения существующих хантавирусных вакцин и особенностей

разрабатываемых вакцин, а также оценка перспектив создания вакцин для профилактики ГЛПС в Российской Федерации.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Краткая характеристика хантавируса

Хантавирусы являются оболочечными вирусами (рис. 1), геном представляет собой одноцепочечную (-)РНК и состоит из трех сегментов, заключенных в индивидуальную спиральную оболочку из белка нуклеокапсида N. Сегменты S, М и L кодируют различные белки: S-сегмент кодирует белок нуклеокапсида (N),

М-сегмент — предшественник гликопротеинов Gn и Gc, L-сегмент — РНК-зависимую РНК-полимеразу. На 3'- и 5'-концах сегментов находятся нетранслируемые области, специфичные для различных видов хантавирусов, которые участвуют в формировании особой петлеобразной структуры (panhandle-like structure), что необходимо для регуляции репликации и упаковки генома вируса в вирион [5, 6]. Поверхность вируса покрыта тетрамерными шипами из димеров белков Gn:Gc. В целом все известные хантавирусные белки являются структурными, но наиболее важными для формирования гуморального

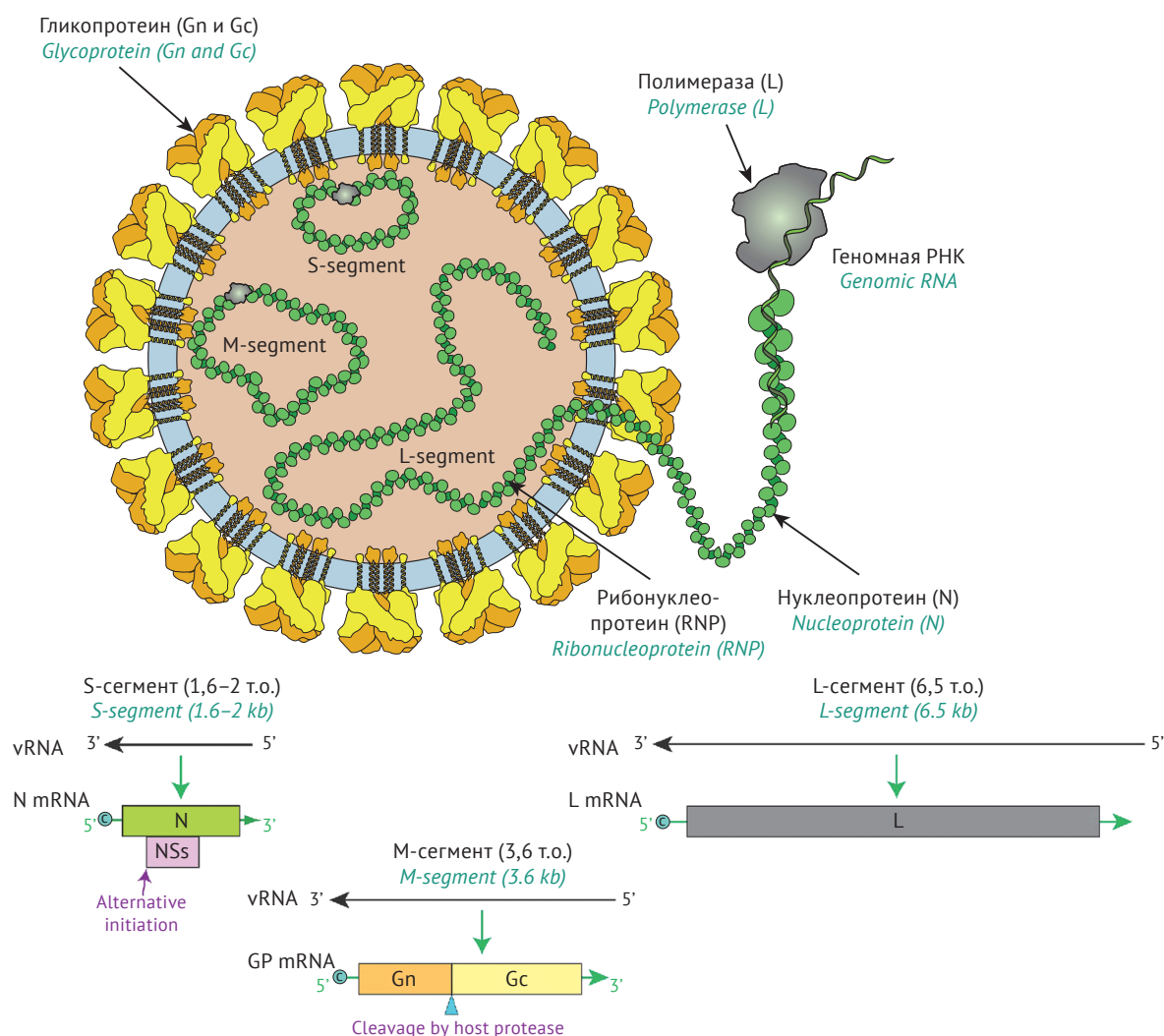


Рисунок заимствован авторами из источника ViralZone [56] (<https://viralzone.expasy.org/>) с модификациями, лицензия CC BY 4.0 / The figure was reproduced from ViralZone [56] (<https://viralzone.expasy.org/>) under CC BY 4.0 (with modifications)

Рис. 1. Структура вириона и организация генома хантавирусов. РНК-геном отрицательной полярности служит матрицей для синтеза матричной РНК, содержащей кэп на 5'-конце. т.о. — тыс. оснований; NSs — неструктурный белок; alternative initiation — альтернативная инициация трансляции; GP mRNA — мРНК гликопротеина; N mRNA — мРНК, кодирующая нуклеопротеин (N); L mRNA — мРНК, кодирующая L-белок (полимеразу); vRNA — вирусная РНК; cleavage by host protease — расщепление протеазой организма-хозяина.

Fig. 1. Virion structure and organization of the hantavirus genome. The negative-sense RNA genome serves as a template for the synthesis of messenger RNA containing a cap at the 5' end. kb, kilobases; NSs, nonstructural protein; GP mRNA, glycoprotein mRNA; N mRNA, mRNA encoding the nucleoprotein (N); L mRNA, mRNA encoding the L protein (polymerase); vRNA, viral RNA

иммунного ответа с образованием вируснейтрализующих АТ являются гликопротеины G_n и G_s. Именно они и/или их отдельные эпитопы являются целевыми при создании субъединичных и некоторых рекомбинантных вакцин. N-белок — многофункциональный иммунодоминантный белок, вызывающий сильный, преимущественно Т-клеточный иммунитет. Известны как консервативные так и видоспецифичные эпитопы N-белка хантавирусов [7].

Коммерческие вакцины для профилактики ГЛПС

Со времени выделения и описания первого штамма хантавирусов в 1976 г. было создано несколько целновирионных инактивированных вакцинных препаратов для профилактики ГЛПС, которые используются на протяжении нескольких десятилетий в КНР, КНДР и Республике Корея [4]. Все коммерчески доступные вакцины против ГЛПС приготовлены на основе штаммов вирусов Хантаан и Сеул, эндемичных для азиатской части континента, включая Дальний Восток России. Их краткая характеристика представлена в таблице 1.

Прототипом для производства первой хантавирусной вакцины послужила технология производства коммерческой вакцины против японского энцефалита, что объясняет первоначальный выбор мозга новорожденных грызунов в качестве субстрата для наработки вирусной биомассы [16]. Вакцины следующего поколения производились на основе первичных культур клеток монгольской песчанки и золотистого хомячка. Применение разных систем наработки вируса не приводит к значительным различиям в эффективности вакцин [17, 18], но обуславливает различия в частоте побочных явлений. Показано, что клеточные вакцины вызывают меньше побочных явлений, причем среднее соотношение побочных явлений составило 2,6% по сравнению с 7,3% для препаратов из мозга мышей [19]. Такие различия в целом закономерны; даже небольшие количества основного белка миелина (myelin basic protein) могут приводить к развитию аутоиммунных процессов. По этой причине во многих странах мира сталкиваются с дополнительными трудностями в процессе регистрации из-за проблем безопасности вакцин, наработку биомассы для которых

Таблица 1. Коммерчески доступные в мире инактивированные хантавирусные вакцины
Table 1. Commercially available inactivated hantavirus vaccines worldwide

Страна <i>Country</i>	Вид хантавируса <i>Hantavirus species</i>	Система наработки биомассы <i>Production system</i>	Инактиваторы <i>Inactivators</i>	Схема иммунизации (недели) <i>Vaccination schedule (weeks)</i>	Источник <i>References</i>
Республика Корея (Хантавакс) <i>Republic of Korea (Hantavax)</i>	ХТН <i>HTNV</i>	Мозг новорожденных мышей <i>Suckling mouse brain</i>	Формалин <i>Formalin</i>	0, 4, 52	[8]
КНДР <i>DPRK</i>	ХТН <i>HTNV</i>	Мозг новорожденных крыс <i>Suckling rat brain</i>	Формалин <i>Formalin</i>	н/д <i>nd</i>	[9, 10]
Китай <i>China</i>	ХТН <i>HTNV</i>	Мозг новорожденных мышей <i>Suckling mouse brain</i>	β-пропиолактон <i>β-propiolactone</i>	0, 2, 4, 52	[11, 12]
Китай <i>China</i>	СЕУ <i>SEOV</i>	Культура клеток почек золотистого хомячка <i>Golden hamster kidney cells</i>	Формалин <i>Formalin</i>	0, 2, 4, 52	[13]
Китай <i>China</i>	ХТН-СЕУ <i>HTNV-SEOV</i>	Культура клеток почек золотистого хомячка <i>Golden hamster kidney cells</i>	Формалин <i>Formalin</i>	0, 2, 4	[13]
Китай <i>China</i>	ХТН <i>HTNV</i>	Культура клеток почек монгольской песчанки <i>Mongolian gerbil kidney cells</i>	β-пропиолактон <i>β-propiolactone</i>	0, 1, 2, 52	[13]
Китай <i>China</i>	ХТН-СЕУ <i>HTNV-SEOV</i>	Культура клеток почек монгольской песчанки <i>Mongolian gerbil kidney cells</i>	β-пропиолактон <i>β-propiolactone</i>	н/д <i>nd</i>	[14]
Китай <i>China</i>	ХТН-СЕУ <i>HTNV-SEOV</i>	Клеточная линия Vero <i>Vero cells</i>	β-пропиолактон <i>β-propiolactone</i>	0, 2, 52	[15]

Таблица составлена авторами по литературным данным / The table was prepared by the authors based on the literature data

Примечание. ХТН — вирус Хантаан; СЕУ — вирус Сеул; н/д — нет данных.
Note. HTNV, Hantaan virus; SEOV, Seoul virus; nd, no data.

проводят в субстратах на основе мозга зараженных вирусом животных.

Очистку вирусосодержащих препаратов, инаktivированных формалином или β -пропиолактоном, проводили с использованием гelfильтрации или градиентного ультрацентрифугирования. В качестве адъюванта готовая лекарственная форма вакцин содержит гидроксид алюминия [13]. Из рассматриваемых препаратов наиболее соответствует современным рекомендациям ВОЗ китайская бивалентная вакцина (AIM Weixin) с технологией наработки вирусной биомассы в перевиваемой культуре клеток Vero и инаktivированная β -пропиолактоном. Использование β -пропиолактона вместо формалина повышает безопасность препарата и облегчает дальнейшую очистку целевого компонента. Комбинация инаktivированных препаратов вирусов Хантаан и Сеул и трехдозовая схема вакцинации (в отличие от четырехдозовой для некоторых других китайских вакцин) позволяет уменьшить общее количество иммунизаций и увеличить охват территорий [20].

Эффективность инаktivированных вакцин для профилактики ГЛПС

Значительная часть исследований посвящена эффективности вакцины Хантавакс, применяемой с начала 90-х годов XX века. Y.M. Sohn с соавт. продемонстрировали 99% сероконверсии у получивших 3 дозы вакцины Хантавакс. При этом уровни нейтрализующих антител (АТ) были невысокими: только у 33% вакцинированных двумя дозами вакцины обнаружен титр АТ в реакции нейтрализации (РН) 1:10 и более [18]. H.W. Cho с соавт. показали, что сероконверсия после двукратной вакцинации с ревакцинацией спустя год составила 62 и 79% по данным иммуноферментного анализа (ИФА) и метода флуоресцирующих АТ (МФА) через месяц после первой дозы вакцины и 97% через месяц после ревакцинации. В РН через месяц после первичной вакцинации и спустя месяц после ревакцинации количество участников исследования со статистически значимым уровнем нейтрализующих антител составило 13 и 75% соответственно. Через год после первой вакцинации серопозитивными оставались 37 и 43% участников по данным МФА и ИФА соответственно. Ревакцинация приводила к росту количества серопозитивных лиц до 94% (данные МФА), 100% (ИФА) и 50% (РН) [21].

Другим аспектом, касающимся эффективности вакцины Хантавакс, является длительность иммунитета. Средняя продолжительность серопозитивного ответа составила

735 и 845 сут по данным РН и МФА соответственно. Нежелательные явления (НЯ) местного и системного характера наблюдались у 47,79 и 25,22% участников исследования соответственно, а большинство НЯ были 1-й степени. Авторы статьи сделали вывод о том, что иммунный ответ после первоначальных двух доз вакцины достаточно низок и при наличии высокой вероятности заражения хантавирусами ревакцинация может быть проведена через 2–6 мес. [22].

Опубликованы результаты исследований, подвергающие сомнению эффективность вакцины Хантавакс. Так, при анализе случаев заболевания ГЛПС за период с января 2002 по январь 2004 гг. среди военнослужащих армии Южной Кореи эффективность вакцины составила 25% у получивших одну дозу, 46% – две дозы и 75% – три дозы вакцины. Но доверительные интервалы для средних значений пересекали нулевое значение, что делает эти оценки статистически недостоверными. Более того, один из трех погибших от ГЛПС до начала заболевания был абсолютно здоров и получил две дозы вакцины. Авторы выдвинули предположение, что иммунный ответ после получения двух доз вакцины достаточно слабый и существующая схема вакцинации требует модификации [23].

В исследованиях эпидемиологической эффективности вакцины (Югославия) с участием 3 900 волонтеров, из которых 1 900 были вакцинированы тремя дозами вакцины по стандартной схеме и 2 000 не вакцинированы (контрольная группа), было показано, что ни один из вакцинированных волонтеров не заболел ГЛПС, тогда как в контрольной группе выявлено 25 случаев заболевания [24]. В целом отмечалось снижение случаев заболевания ГЛПС в Южной Корее на 45% в период с 1991 по 1996 гг., после начала применения вакцины Хантавакс, но связано ли снижение только с вакцинацией, остается спорным [23, 25].

Исследование эффективности китайских хантавирусных вакцин, используемых в том числе для массовых программ вакцинации (>2 млн доз в год) [26], описано во многих публикациях. Китайские ученые продемонстрировали, что через год после вакцинации только 36–41% вакцинированных оставались серопозитивными по уровню нейтрализующих антител; выявлено 14 и 431 случай заболевания в группе вакцинированных и группе контроля соответственно (коэффициент предотвращения заболевания >90%) [19].

Zheng Y. с соавт. изучили иммунный ответ на вакцину среди людей в возрасте от 16 до 60 лет. Уровень серопозитивности составил 7,7%

перед вакцинацией; 40,6% — через 1 мес. после первых двух доз вакцины; 62,2% — через 1 мес. после бустерной вакцинации; 48,2% — через 18 мес. после бустерной вакцинации. Авторы предположили, что двухдозовая схема первичной вакцинации достаточна для формирования иммунного ответа, но трехдозовая схема может быть лучше в этом плане [27].

Dong G. с соавт. исследовали эффективность бивалентной вакцины на основе штаммов вирусов ХТН и СЕУ, сравнивая трех- (292 участника в группе) и двухдозовую (226 участников) схемы вакцинации. Сероконверсия для обеих схем вакцинации составила >85% (для обоих вирусов), и, хотя для трехдозовой схемы вакцинации она была выше, статистически значимой разницы обнаружено не было. Уровень побочных реакций составил менее 0,5%. Таким образом, результаты исследования свидетельствуют, что двухдозовая схема вакцинации достаточно для формирования иммунитета [28].

В целом с началом массовых программ вакцинации в Китае удалось достичь существенного снижения уровня заболеваемости и смертности от ГЛПС. Если в период с 1950 по 2007 гг. в Китае было зарегистрировано 1 557 622 случая заболевания с 46 427 смертельными исходами (3%), то с началом применения инактивированных хантавирусных вакцин заболеваемость снизилась более чем в 2 раза по сравнению со среднегодовой заболеваемостью за период, указанный выше (например, в 2007 г. заболеваемость составила 11 248 случаев), а смертность снизилась до уровня ≈1% в период с 1995 по 2007 гг. [29].

Xiao D. с соавт. изучали динамику заболеваемости в одном из районов Китая с высокой заболеваемостью ГЛПС (третий по количеству случаев ГЛПС среди районов Китая в 2010 г.). В 1994 г. охват вакцинацией в районе составлял 4,55%, а в 2010 г. — 83,67%. Уровень заболеваемости в 1984 г. составлял 300,57 на 100 тыс. населения, а в 2005 г. — 9,53 на 100 тыс. населения [20]. Эти данные убедительно свидетельствуют об эффективности инактивированных хантавирусных вакцин при должном подходе к вакцинации на эндемичных территориях.

По результатам метаанализа 1 807 статей, из которых только 15 соответствовали всем критериям достоверности результатов, уровень протективности китайских вакцин составил >90%, тогда как корейских вакцин — ≈50%. Четыре исследования, в которых описаны показатели

сероконверсии, проведены через 14 сут после первичной иммунизации, два — через 42 и 56 сут. Из 7 исследований, в ходе которых оценивали уровни нейтрализующих АТ, 5 были проведены через 14 сут после первичной иммунизации, еще два — через 42 и 56 сут [30].

Разрабатываемые вакцинные препараты для профилактики ГЛПС

Инактивированные экспериментальные вакцины

Производимые в КНР и Республике Корея вакцины на основе вирусов Хантаан и Сеул не могут применяться в России, так как около 98% заболеваемости ГЛПС в нашей стране обусловлены вирусом Пуумала [1]. В России разработаны и прошли доклинические испытания несколько инактивированных вакцин. Первые отечественные разработки — инактивированные «мозговые» вакцины: моновакцина на основе вируса Пуумала и бивалентная на основе вирусов Пуумала и Хантаан были выполнены в 1998 г. в сотрудничестве с учеными Национального института здоровья (Республика Корея) [8].

В связи с одновременной циркуляцией хантавирусов Пуумала и Добrava/Белград в странах Европы и на европейской части России эффективной для применения на этих территориях может быть вакцина, содержащая антигены этих вирусов¹. После оптимизации технологии изготовления инактивированной формалином вакцины на основе перевиваемой линии клеток Vero был разработан экспериментальный бивалентный препарат ПУУ-ДОБ на основе вирусов Пуумала, штамм ТКД/Уфа-97 и Куркино, штамм ЕАТ/Липецк-06². В 2018 г. поливалентная вакцина «ГЛПС-Вак», инактивированная формалином и сорбированная на гидроокиси алюминия, на основе хантавирусов Пуумала, Хантаан, Сочи успешно прошла доклинические испытания [31]. По результатам испытания различных инактиваторов в составе экспериментальных вакцинных препаратов показано преимущество β-пропиолактона в сравнении с формальдегидом, для которого требовалось 30 сут при 6±2 °С и постоянном перемешивании для полной инактивации вируса в сравнении с 1 ч для β-пропиолактона [32]. На модели мышей BALB/c было показано, что индукция нейтрализующих антител после двукратной и трехкратной иммунизации моновалентным экспериментальным вакцинным препаратом на основе вируса Пуумала с 14-суточным интервалом статистически значимо

¹ Ткаченко ЕА, Дзагурова ТК, Михайлов МИ. Штамм вируса-возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом для изготовления вакцинных препаратов (варианты). Патент Российской Федерации № 2423520; 2009.

² Ткаченко ЕА, Дзагурова ТК, Набатников ПА и др. Разработка экспериментальной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Медицинская вирусология*. 2009;XXVI:194–6.

не различалась [31]. В связи с этим были определены оптимальные схемы иммунизации на модели морских свинок. Показано, что интенсивность гуморального иммунного ответа прямо пропорциональна дозе вводимого иммуногена в вакцинном препарате на основе вируса Пуумала, а выраженная динамика нарастания нейтрализующих АТ после бустерного введения того же препарата через год в сравнении с ответом после первой и второй иммунизациями указывает на формирование устойчивой иммунологической памяти [33].

Для определенных групп населения (дети, пожилые люди, лица с хроническими заболеваниями), возможно, более целесообразно использование низких доз иммуногена в вакцине. Ограничением является величина протективной дозы вакцинного препарата, определить которую можно только по результатам клинических испытаний [33]. Из рассмотренных схем иммунизаций бивалентным вакцинным препаратом на основе вирусов Пуумала и Хантаан на модели морских свинок в качестве приоритетных для клинических испытаний были выбраны 3 варианта с двух- и трехкратной иммунизацией и последующей бустерной вакцинацией через год (0, 150, 300 сут; 0, 14, 182, 364 сут; 0, 30, 364 сут) [34].

Применение различных адъювантов углеводного происхождения в составе экспериментального вакцинного препарата продемонстрировало перспективность использования низкодотоксичного апиrogenного липополисахарида *Shigella sonnei*, а также эмульсии сквалена животного происхождения Sepivac SWE (аналог MF59) [35]. Эффективность этих адъювантов даже для минимальных доз иммуногена объясняется иммуномодулирующим эффектом, увеличивая время персистенции нейтрализующих АТ [35].

Субъединичные вакцины и вакцины на основе вирусных векторов

Экспериментальные вакцины этого типа разрабатывались в отношении хантавирусов Пуумала, Добrava/Белград, Хантаан и Сеул. Для наработки вирусных антигенов использовали различные экспрессионные системы: клетки *Escherichia coli*, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, культуру клеток COS-1, а также бакуловиральную систему экспрессии. Чаще всего в качестве целевого антигена выбирали N-белок, но экспрессировали также поверхностные гликопротеины G_п и G_с как совместно, так и по отдельности. Использование N-белка в качестве иммуногена объясняется отсутствием сайтов

гликозилирования, меньшим размером и формированием перекрестной защиты против хантавирусов различных филогенетических групп.

В экспериментах при иммунизации рыжих полевок рекомбинантными N-белками (rN) различных хантавирусов ПУУ, Топографов, ДОБ, Андес (АНД) с последующим заражением вирусом ПУУ наибольший перекрестный иммунитет наблюдался при иммунизации rN вируса Андес. В реакции пролиферации Т-лимфоциты, иммунизированные любыми гетерологичными rN, взаимодействовали с rN вируса ПУУ так же эффективно, как и гомологичные [36]. C.S. Schmaljohn с соавт. показали, что вектор, экспрессирующий G_п или G_с по отдельности, индуцировал только частичную защиту и что как РН, так и защита от инфекции были удовлетворительными только тогда, когда G_п и G_с экспрессировались совместно с одной мРНК [37].

В качестве вирусного вектора, продуцирующего структурные белки хантавирусов, использовали вирус коровьей оспы. Эта векторная система применялась для экспрессии N-белка, белка G_п или G_с по отдельности, или G_п+G_с, которые способны обеспечивать различную степень защиты от хантавирусной инфекции на модели хомячков [38]. Рекомбинантный вирус коровьей оспы, несущий кодирующие последовательности М- и S-сегментов вируса ХТН, обеспечивал защиту на модели хомячков от ХТН и СЕУ инфекции, но не ПУУ инфекции [39]. Этот же препарат, несущий последовательности М- и S-сегментов вируса ХТН, исследовали в I и II фазах клинических испытаний. Рекомбинантная вакцина на основе вируса коровьей оспы продуцировала нейтрализующие АТ у 72% участников исследования, не имеющих предсуществующего иммунитета к вирусу-вектору, но лишь 26% участников с иммунитетом к вирусу-вектору продуцировали нейтрализующие АТ к вирусу ХТН [40].

Вакцины на основе вирусоподобных частиц

В небольшом числе публикаций описаны вопросы разработки и оценки эффективности вакцин на основе вирусоподобных частиц (VLP). Ниже приведены примеры исследований, в которых для формирования VLP напрямую использовались структурные белки вируса ХТН и в которых их отдельные эпитопы были вставлены в белки, способные к формированию VLP, например коровий антиген вируса гепатита В (HBcAg).

При использовании пептидов на основе N-белка вируса ПУУ длиной 45-аминокислотных остатков, включенных в HBcAg VLP, на модели инфекции рыжей полевки вирусом ПУУ

была достигнута частичная протективность — 4 из 5 иммунизированных животных были защищены от последующего заражения вирусом ПУУ [41]. L.F. Cheng с соавт. продемонстрировали, что экспрессия VLP вируса ХТН, содержащая лиганд рецептора CD40 (CD40L) или гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) мышей, в клетках насекомых Sf9 или клетках яичника китайского хомячка (CHO) усиливала активацию макрофагов и дендритных клеток. Иммунизация мышей химерными VLP вызывала формирование стойкого клеточного и гуморального иммунного ответа, сопоставимого с таковым при иммунизации китайскими коммерческими вакцинами [42]. Y. Dong с соавт. показали, что иммунизация препаратом на основе VLP с включением CD40L или GM-CSF защищает мышей от заражения вирусом ХТН через полгода после иммунизации [43]. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что вакцины на основе VLP являются перспективными кандидатными вакцинами для профилактики ГЛПС, принимая во внимание высокую интенсивность иммунных реакций, формируемых в ответ на введение VLP.

Вакцины на основе нуклеиновых кислот

Большой вклад в разработку вакцин на основе нуклеиновых кислот (НК вакцины) для профилактики хантавирусных инфекций внесен исследовательской группой под руководством J.W. Ноорег. Иммунизация препаратами на основе некомплексированной ДНК-плазмиды, кодирующей S- или M-сегмент (S- и M-плазмиды соответственно) генома вируса СЕУ, стимулировала появление специфических антител к вирусу у 4/5 и 5/5 сирийских хомячков соответственно. Иммунизированные M-плазмидой животные были защищены от инфекции [44]. Дальнейшие исследования были сфокусированы на создании генетических конструкций, кодирующих M-сегмент генома хантавирусов. Иммунизация хомячков M-плазмидой вируса ХТН защищала от инфекции вирусами ХТН, СЕУ и ДОБ, но не ПУУ. Иммунизация макак-резус плазмидами, несущими последовательности M-сегмента вирусов СЕУ или ХТН, приводила к формированию высокого титра нейтрализующих АТ [45]. Далее была создана M-плазида вируса АНД. Иммунизация макак-резусов этой вакциной приводила к возникновению высокого титра нейтрализующих АТ не только к вирусу АНД, но и к другим хантавирусам — возбудителям ХПС, например к вирусу Син Номбр (СИН) в *in vitro* тестах. Пассивная иммунизация сирийских хомячков сыворотками иммунизированных обезьян защищала 100%

хомячков от летального заболевания вирусом АНД [46].

Ноорег J.W. с соавт. сконструировали комплексную ХТН и АНД вирусную M-плазмиду. Иммунизация макак-резусов такой плазмидой стимулировала выработку нейтрализующих АТ к обоим вирусам. Уровень нейтрализующих АТ быстро повышался при бустерном введении как комплексной M-плазмиды, так и отдельными M-плазмидами вирусов АНД и ХТН через 1–2 года после первичной иммунизации. Кроме того, повышался уровень перекрестной нейтрализации вирусов по сравнению с уровнем перекрестной нейтрализации после первичной вакцинации [47]. Далее была сконструирована кодон-оптимизированная M-плазида вируса ПУУ, иммунизация которой стимулировала выработку высоких титров нейтрализующих АТ у хомячков и нечеловеческих приматов. Иммунизация хомячков приводила к формированию защиты от инфекции вирусом ПУУ, но не от инфекции другими патогенными хантавирусами. Примечательно, что иммунизация хомячков ПУУ M-плазмидой защищала и от летальной инфекции вирусом АНД в отсутствие нАТ к данному вирусу [48].

Во всех описанных выше исследованиях для доставки плазмид в организм животных использовали генные пушки. В последующем использовали также внутримышечную электропорацию. J.W. Ноорег с соавт. получили M-плазмиду вируса СИН, которой иммунизировали кроликов, что приводило к выработке высокого титра нАТ. Иммунизированные хомячки были полностью защищены от инфекции вирусом СИН. Далее кроликов иммунизировали смесью M-плазмид вирусов ПУУ, ХТН, АНД, СИН или всеми плазмидами. Бивалентные препараты стимулировали выработку антител в основном к вирусам ПУУ/ХТН или АНД/СИН. Тетравалентный препарат стимулировал выработку нейтрализующих АТ к четырем вирусам. Эта работа продемонстрировала возможность создания пан-хантавирусного вакцинного препарата [49]. Однако K.W. Spik с соавт. показали, что совместное введение M-плазмид вирусов ПУУ и ХТН приводит к формированию нейтрализующих АТ только к одному из вирусов, в то время как раздельное введение M-плазмид вирусов ПУУ и ХТН стимулирует выработку нейтрализующих АТ к обоим вирусам [50].

До настоящего времени остается актуальной проблема эффективной доставки ДНК-конструкций в клетки. Безыгольные инъекционные системы (NFIS) нового поколения позволяют использовать меньшие количества ДНК на одну

дозу вакцинного препарата по сравнению с традиционными игольными шприцами при большей эффективности и характеризуются большей простотой в обращении по сравнению с устройствами для электропорации [51]. Проведены клинические испытания (фаза I) кодон-оптимизированных ДНК-вакцин вирусов ПУУ и ХТН, вводимых в организм посредством NFIS по отдельности и в комбинации. После 4-кратной вакцинации в группе ХТН ($n=9$) серопозитивными в РН были 43 и 100% участников исследования относительно ПУУ и ХТН соответственно; в группе ПУУ ($n=9$) – 83 и 33% относительно ПУУ и ХТН соответственно; в группе ПУУ/ХТН ($n=9$) – 78, 44 и 44% относительно ПУУ, ХТН и обоих вирусов соответственно. Иммунный ответ на ДНК-вакцину вируса ХТН был выше, чем ПУУ, но при введении комбинированного препарата наблюдалось усиление иммунного ответа на ПУУ и снижение ответа на ХТН, хотя доза каждой из плазмид была вдвое ниже дозы в препаратах индивидуальных плазмид. J.W. Ноорег с соавт. отмечают, что интерференция между компонентами комбинированного препарата устранена оптимизацией кодового состава, а изменения иммунного ответа могут объясняться уменьшением дозы плазмид в комбинированном препарате [52].

Разработки ДНК-вакцин ведутся также китайскими исследователями. С. Zhao с соавт. сконструировали химерную плазмиду, кодирующую 25 гликопротеиновых эпитопов вирусов СЕУ, ХТН и ПУУ. Иммунизация мышей линии Balb/c плазмидой приводила к стимуляции клеточного и гуморального иммунитета с минимальным риском интеграции плазмиды в геном: титры нейтрализующих АТ в РН составляли 1:10–1:20, 1:10–1:40 и <1:10 для вирусов ХТН, СЕУ и в контроле соответственно; индекс стимуляции (IS) пролиферации спленоцитов статистически значимо ($p<0,05$) отличался от контроля (введение PBS) [53].

Jiang D.B. с соавт. сконструировали плазмиду, кодирующую ХТН Gn и белок LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein 1). После иммунизации мышей линии Balb/c плазмидой, АТ в ИФА с высоким титром (среднее геометрическое значение >1:100) сохранялись через 24 нед. после первичной иммунизации, тогда как в контроле (введение коммерческой инактивированной вакцины) титры АТ в этой временной точке снижались до уровня предела отсекающей методики (титр 1:20) [54].

Meyer M. с соавт. изучили эффективность двух мРНК-вакцин на основе кодирующей последовательности гликопротеинов Gn

и Gс вируса АНД. Сирийских хомячков каждой из групп ($n=10$ в группе) с различной дозировкой плазмиды в препарате (1, 5, 25 мкг) через 4 нед. после однократной иммунизации заражали вирусом АНД. Ни одно животное в испытываемых группах, даже с дозой вакцины 1 мкг, не погибло и не снизило массу тела в течение 28 сут после заражения. Титры АТ в ИФА у животных во всех группах статистически значимо отличались от титров АТ в контроле. Однако стоит отметить, что в контрольной группе было одно животное, которое за время после заражения не имело симптомов заболевания и в печени которого не обнаружено вирусной нагрузки, хотя после заражения у него наблюдалась потеря массы тела [55].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенный анализ данных об эффективности существующих хантавирусных вакцин, а также разрабатываемых по новым технологиям перспективных вакцинных препаратов указывает на широкий диапазон исследований и интерес мирового научного сообщества к данной тематике. Любые разработки данных вакцинных препаратов, особенно генно-инженерных, даже без практического результата в виде вывода на рынок лицензированного препарата, способствуют получению фундаментальных знаний об иммунитете при хантавирусных инфекциях, то есть обладают научной ценностью. Появление простых и удобных в обращении коммерчески доступных способов введения вакцины, таких как NFIS, позволяет преодолеть некоторые ограничения использования ДНК-вакцин.

Однако недостаточный объем реальных клинических исследований, большие интеллектуальные и материальные вложения в начальные этапы разработки таких препаратов, как и отсутствие лицензированных генно-инженерных вакцин, ставят под вопрос возможность практического применения вакцин этого типа в краткосрочной перспективе. В то же время классические цельновирионные инактивированные вакцины уже доказали свою эффективность при должном подходе к вакцинации населения эндемичных регионов. Из вариантов классических инактивированных вакцин, с учетом опыта китайского рынка и российских разработок, наиболее перспективным представляется производство цельновирионного препарата с обработкой биомассы в перевиваемых клеточных субстратах, инактивацией β -пропиолактоном, хроматографической очисткой и, возможно, добавлением адъювантов.

Литература/References

1. Tkachenko EA, Kurashova SS, Balkina AS, et al. Cases of hemorrhagic fever with renal syndrome in Russia during 2000–2022. *Viruses*. 2023;15(7):1537. <https://doi.org/10.3390/v15071537>
2. Jiang H, Du H, Wang LM, et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome: Pathogenesis and clinical picture. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:1. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00001>
3. Савицкая ТА, Иванова АВ, Зубова АА и др. Хантавирусные болезни: обзор эпидемиологической ситуации в мире. Анализ эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024;(1):113–24. Savitskaya TA, Ivanova AV, Zubova ID, et al. Hantavirus infections: Review of the epidemiological situation around the world. Analysis of the epidemiological situation on hemorrhagic fever with renal syndrome in the Russian Federation in 2023 and forecast of its development for 2024. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2024;(1):113–24 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-1-113-124>
4. Liu R, Ma H, Shu J, et al. Vaccines and therapeutics against hantaviruses. *Front Microbiol*. 2020;10:2989. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02989>
5. Kabwe E, Davidyuk Yu, Shamsutdinov A, et al. Orthohantaviruses, emerging zoonotic pathogens. *Pathogens*. 2020;9(9):775. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090775>
6. Mir MA, Panganiban AT. The hantavirus nucleocapsid protein recognizes specific features of the viral RNA panhandle and is altered in conformation upon RNA binding. *J Virol*. 2005;79(3):1824–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.3.1824-1835.2005>
7. Reuter M, Krüger DH. The nucleocapsid protein of hantaviruses: Much more than a genome-wrapping protein. *Virus Genes*. 2018;54(1):5–16. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1522-3>
8. Lee HW, Chu YK, Woo YD, et al. Vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome. In: *Factors in the emergence and control of rodent-borne diseases*. Paris: Elsevier; 1999. P. 267–72.
9. Ким Р, Ру Ч, Ким ГМ. Специфическая профилактика ГЛПС в КНДР. В кн.: *Тезисы международного симпозиума по ГЛПС*. Л.; 1991. С. 16–7. Kim R, Ryu Ch, Kim GM. Specific prophylaxis of HFRS in DPRK. In: *Abstracts of the international symposium on HFRS*. Leningrad; 1991. P. 16–7 (In Russ.).
10. Kim R, Ryu C, Kim G. Antibody formation and epidemiological preventive effect after vaccination with the inactivated vaccine against HFRS. In: *Abstract of 2nd symposium on arboviruses in the Mediterranean countries*. Dubrovnik; 1989.
11. Sun Z, Yu Y, Wang W, Wang D. Studies on the purified inactivated epidemic hemorrhagic fever vaccine. Clinical trial of type 1 EHf vaccine in volunteers. In: *Abstract of 2nd international conference on HFRS*. Beijing; 1992. P. 109–10.
12. Yu YX, Yao XJ, Dong GM, et al. Antibody response of inactivated HFRS vaccine to homologous and heterologous types of the virus. *Chin J Biol*. 1990;3:14–6.
13. Schmaljohn C. Vaccines for hantaviruses. *Vaccine*. 2009;27:D61–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.096>
14. Tkachenko EA, Dzagurova TK, Tkachenko PE. Current status of hantavirus vaccines development. In: Lukashovich IS, Shirwan H, eds. *Novel technologies for vaccine development*. Vienna: Springer Vienna; 2014. P. 113–51. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1818-4_5
15. Li Z, Zeng H, Wang Y, et al. The assessment of Hantaan virus-specific antibody responses after the immunization program for hemorrhagic fever with renal syndrome in northwest China. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(4):802–7. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1253645>
16. Синюгина АА, Ишмухаметов АА, Дзагурова ТК и др. Вакцины для профилактики хантавирусных лихорадок. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019;18(5):98–108. Sinyugina AA, Ishmukhametov AA, Dzagurova TK, et al. Vaccines for prevention of hantaviral fevers. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2019;18(5):98–108 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-5-98-108>
17. Song G, Huang YC, Hang CS, et al. Preliminary human trial of inactivated golden hamster kidney cell (GHKC) vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). *Vaccine*. 1992;10(4):214–6. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(92\)90154-C](https://doi.org/10.1016/0264-410X(92)90154-C)
18. Sohn YM, Rho HO, Park MS, et al. Primary humoral immune responses to formalin inactivated hemorrhagic fever with renal syndrome vaccine (Hantavax®): consideration of active immunization in South Korea. *Yonsei Med J*. 2001;42(3):278–84. <https://doi.org/10.3349/ymj.2001.42.3.278>
19. Hjelle B. Vaccines against hantaviruses. *Expert Rev Vaccines*. 2002;1(3):373–84. <https://doi.org/10.1586/14760584.1.3.373>
20. Xiao D, Wu K, Tan X, et al. The impact of the vaccination program for hemorrhagic fever with renal syndrome in Hu County, China. *Vaccine*. 2014;32(6):740–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.024>
21. Cho HW, Howard CR, Lee HW. Review of an inactivated vaccine against hantaviruses. *Intervirology*. 2002;45(4–6):328–33. <https://doi.org/10.1159/000067925>
22. Song JY, Woo HJ, Cheong HJ, et al. Long-term immunogenicity and safety of inactivated Hantaan virus vaccine (Hantavax®) in healthy adults. *Vaccine*. 2016;34(10):1289–95. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.031>
23. Park K, Kim CS, Moon KT. Protective effectiveness of hantavirus vaccine. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(12):2218–20. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040684>
24. Chu YK, Gligic A, Bozovic B, et al. A field efficacy trial of inactivated Hantaan virus vaccine (Hantavax®) against hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in the endemic areas of Yugoslavia from 1996 to 1998. *J Korean Soc Virol*. 1999;29(2):55–64 (In Korean).
25. Krüger DH, Ulrich R, Lundkvist Å. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes Infect*. 2001;3(13):1129–44. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01474-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01474-5)
26. Schmaljohn CS. Vaccines for hantaviruses: Progress and issues. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(5):511–3. <https://doi.org/10.1586/erv.12.15>
27. Zheng Y, Zhou BY, Wei J, et al. Persistence of immune responses to vaccine against haemorrhagic fever with renal syndrome in healthy adults aged 16–60 years: Results from an open-label 2-year follow-up study. *Infect Dis (Lond)*. 2018;50(1):21–6. <https://doi.org/10.1080/23744235.2017.1353704>
28. Dong G, Han L, An Q, et al. Immunization effect of purified bivalent vaccine to haemorrhagic fever with renal syndrome manufactured from primary cultured hamster kidney cells. *Chin Med J (Engl)*. 2005;118(9):766–8. PMID: 15899141
29. Zhang YZ, Zou Y, Fu ZF, et al. Hantavirus infections in humans and animals, China. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(8):1195–203. <https://doi.org/10.3201/eid1608.090470>
30. Wu W, Liu J, Guo S, et al. The protective efficacy of inactivated vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2025;104(20):e2463. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000042463>
31. Dzagurova TK, Siniugina AA, Ishmukhametov AA, et al. Pre-clinical studies of inactivated polyvalent HFRS vaccine. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:545372. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.545372>
32. Курашова СС, Егорова МС, Баловнева МВ и др. Сравнение физических и химических инактиваторов при разработке технологии создания вакцины на основе вируса Пуумала. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2024;23(4):34–43. Kurashova SS, Egorova MS, Balovneva MV, et al. Physical and chemical inactivators evaluation for the Puumala virus vaccine technology development. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2024;23(4):34–43 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-4-34-43>
33. Курашова СС, Баловнева МВ, Ишмухаметов АА и др. Гуморальный иммунный ответ после иммунизации морских свинок вакцинным препаратом на основе вируса Пуумала. *Инфекция и иммунитет*. 2022;12(5):971–5. Kurashova SS, Balovneva MV, Ishmukhametov AA, et al. Immune response evaluation in the guinea pigs after immunization with the experimental Puumala virus vaccine. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022;12(5):971–5 (In Russ.). <https://doi.org/10.15789/2220-7619-IRE-1956>
34. Курашова СС, Егорова МС, Ветрова АН и др. Иммуногенность кандидат-вакцин против геморрагической лихорадки с почечным синдромом на модели морских свинок. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2026;103(2):246–57. Kurashova SS, Egorova MS, Vetrova AN, et al. Immunogenicity of candidate HFRS vaccines based on guinea pig models. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2026;103(2):246–57 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-789>
35. Курашова СС, Егорова МС, Ветрова АН и др. Влияние углеводных адъювантов в составе экспериментального хантавирусного вакцинного препарата на динамику нейтрализующих антител в сыворотках крови морских свинок. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(3):383–92. Kurashova SS, Egorova MS, Vetrova AN, et al. The effect of carbohydrate adjuvants in the composition of the experimental hantavirus vaccine on the dynamics of neutralizing antibodies in the blood sera of guinea pigs. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2024;101(3):383–92 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-523>
36. de Carvalho Nicacio C, Gonzalez Della Valle M, Padula P, et al. Cross-protection against challenge with Puumala virus after immunization with nucleocapsid proteins from different hantaviruses. *J Virol*. 2002;76(13):6669–77.

- <https://doi.org/10.1128/JVI.76.13.6669-6677.2002>
37. Schmaljohn CS, Chu YK, Schmaljohn AL, et al. Antigenic subunits of Hantaan virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants. *J Virol.* 1990;64(7):3162–70. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.7.3162-3170.1990>
 38. Xu X, Ruo SL, McCormick JB, et al. Immunity to hantavirus challenge in meriones unguiculatus induced by vaccinia-vectored viral proteins. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;47(4):397–404. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.47.397>
 39. Chu YK, Jennings GB, Schmaljohn CS. A vaccinia virus-vectored Hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul viruses but not Puumala virus. *J Virol.* 1995;69(10):6417–23. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.10.6417-6423.1995>
 40. McClain DJ, Summers PL, Harrison SA, et al. Clinical evaluation of a vaccinia-vectored Hantaan virus vaccine. *J Med Virol.* 2000;60(1):77–85. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(200001\)60:1%3C77::aid-jmv13%3E3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(200001)60:1%3C77::aid-jmv13%3E3.0.co;2-s)
 41. Ulrich R, Lundkvist Å, Meisel H, et al. Chimeric HBV core particles carrying a defined segment of Puumala hantavirus nucleocapsid protein evoke protective immunity in an animal model. *Vaccine.* 1998;16(2–3):272–80. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(97\)00172-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(97)00172-2)
 42. Cheng LF, Wang F, Zhang L, et al. Incorporation of GM-CSF or CD40L enhances the immunogenicity of Hantaan virus-like particles. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:185. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00185>
 43. Dong Y, Ma T, Zhang X, et al. Incorporation of CD40 ligand or granulocyte-macrophage colony stimulating factor into Hantaan virus (HTNV) virus-like particles significantly enhances the long-term immunity potency against HTNV infection. *J Med Microbiol.* 2019;68(3):480–92. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000897>
 44. Hooper JW, Kamrud KI, Elgh F, et al. DNA vaccination with hantavirus M segment elicits neutralizing antibodies and protects against Seoul virus infection. *Virology.* 1999;255(2):269–78. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9586>
 45. Hooper JW, Custer DM, Thompson E, et al. DNA vaccination with the Hantaan virus M gene protects hamsters against three of four HFRS hantaviruses and elicits a high-titer neutralizing antibody response in rhesus monkeys. *J Virol.* 2001;75(18):8469–77. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.18.8469-8477.2001>
 46. Custer DM, Thompson E, Schmaljohn CS, et al. Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine. *J Virol.* 2003;77(18):9894–905. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.18.9894-9905.2003>
 47. Hooper JW, Custer DM, Smith J, et al. Hantaan/Andes virus DNA vaccine elicits a broadly cross-reactive neutralizing antibody response in nonhuman primates. *Virology.* 2006;347(1):208–16. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.035>
 48. Brocato RL, Joselyn MJ, Wahl-Jensen V, et al. Construction and non-clinical testing of a puumala virus synthetic M gene-based DNA vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20(2):218–26. <https://doi.org/10.1128/CI.00546-12>
 49. Hooper JW, Joselyn M, Ballantyne J, et al. A novel Sin Nombre virus DNA vaccine and its inclusion in a candidate pan-hantavirus vaccine against hantavirus pulmonary syndrome (HPS) and hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). *Vaccine.* 2013;31(40):4314–21. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.025>
 50. Spik KW, Badger C, Mathiessen I, et al. Mixing of M segment DNA vaccines to Hantaan virus and Puumala virus reduces their immunogenicity in hamsters. *Vaccine.* 2008;26(40):5177–81. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.097>
 51. Ledesma-Feliciano C, Chapman R, Hooper JW, et al. Improved DNA vaccine delivery with needle-free injection systems. *Vaccines.* 2023;11(2):280. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020280>
 52. Hooper JW, Kwilas SA, Joselyn M, et al. Phase 1 clinical trial of Hantaan and Puumala virus DNA vaccines delivered by needle-free injection. *npj Vaccines.* 2024;9(1):221. <https://doi.org/10.1038/s41541-024-00998-7>
 53. Zhao C, Sun Y, Zhao Y, et al. Immunogenicity of a multi-epitope DNA vaccine against hantavirus. *Hum Vaccin Immunother.* 2012;8(2):208–15. <https://doi.org/10.4161/hv.18389>
 54. Jiang DB, Sun LJ, Cheng LF, et al. Recombinant DNA vaccine of hantavirus Gn and LAMP1 induced long-term immune protection in mice. *Antiviral Res.* 2017;138:32–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.12.001>
 55. Meyer M, Kuzmin IV, Dewes EA, et al. Single-dose mRNA vaccines against Andes hantavirus. *Lancet.* 2026;407(10547):2495–7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(26\)01124-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(26)01124-4)
 56. Hulo C, de Castro E, Masson P, et al. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D576–82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq901>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Р.Д. Теодорович** – концепция работы, написание текста рукописи, формулировка выводов; **Т.К. Дзагурова** – редактирование текста рукописи; **С.С. Курашова** и **М.С. Егорова** – работа с источниками литературы; **Н.А. Коротина** и **М.В. Баловнева** – форматирование текста рукописи в соответствии с требованиями журнала, написание отдельных разделов статьи; **А.А. Ишмухаметов** – участие в формулировке выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Использование генеративного искусственного интеллекта. Авторы заявляют, что не использовали генеративный ИИ при подготовке рукописи.

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **R.D. Theodorovich** conceptualized the study, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. **T.K. Dzagurova** edited the text of the article. **S.S. Kurashova** and **M.S. Egorova** analyzed literature data. **N.A. Korotina** and **M.V. Balovneva** formatted the article in accordance with the requirements of the journal and wrote some sections of the article. **A.A. Ishmukhametov** participated in formulating the conclusions and approved the final version of the manuscript for publication.

Use of generative artificial intelligence. The authors declare that no generative AI was used during the preparation of this manuscript.

Об авторах / Authors

Теодорович Ростислав Дмитриевич / Rostislav D. Theodorovich

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2117-597X>

Дзагурова Тамара Казбековна, д-р мед. наук / Tamara K. Dzagurova, Dr. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6656-1682>

Курашова Светлана Сергеевна, канд. мед. наук / Svetlana S. Kurashova, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9934-699X>

Егорова Мария Сергеевна, канд. биол. наук / Maria S. Egorova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3642-6444>

Коротина Наталья Александровна / Natalia A. Korotina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9038-7717>

Баловнева Мария Владимировна, канд. биол. наук / Mariya V. Balovneva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2198-7521>

Ишмухаметов Айдар Айратович, д-р мед. наук, проф., академик РАН / Aydar A. Ishmukhametov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Поступила 19.06.2026

После доработки 10.08.2026

Принята к публикации 25.09.2026

Received June 19, 2026

Revised August 10, 2026

Accepted September 25, 2026

Генетическая характеристика производственных штаммов вирусов кори, краснухи и паротита методом высокопроизводительного секвенирования

А.И. Желтухина¹ , А.Б. Комиссаров¹ , А.В. Фадеев¹ , Н.Д. Ёлшин¹ ,
М.М. Писарева¹ , В.А. Едер¹ , М. Коржанова¹ , А.Д. Ксенафонов¹ ,
А.А. Передерий¹ , О.В. Охлопкова¹ , Л.А. Саушкина² , Е.В. Шведова² ,
Е.А. Гришина² , Д.А. Лиознов¹ 

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Профессора Попова, д. 15/17, Санкт-Петербург, 197376, Российская Федерация

² Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», 2-й Волконский переулок, д. 10, Москва, 127473, Российская Федерация

✉ Комиссаров Андрей Борисович; andrey.komissarov@influenza.spb.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Спонтанные мутации часто возникают и накапливаются в геноме РНК-содержащих вирусов, таких как вирусы кори, краснухи и паротита. Современные требования к производству вакцинных препаратов, содержащих живые вакцинные штаммы вирусов, предполагают контроль генетической стабильности производственных штаммов. Метод высокопроизводительного секвенирования позволяет выявить все мутации, возникшие в вирусной популяции, и оценить генетическую стабильность производственных штаммов. **ЦЕЛЬ.** Анализ нуклеотидных последовательностей геномов посевных и производственных штаммов вирусов кори (Ленинград-16), краснухи (RA-27/3) и паротита (Ленинград-3) в сравнении с референсными нуклеотидными последовательностями геномов вакцинных штаммов, депонированных ранее в базу данных GenBank.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использовали посевные вирусы и производственные штаммы вакцин: коревая культуральная живая, паротитная культуральная живая и вакцина против краснухи культуральная живая. Проведено полногеномное секвенирование с использованием генетических анализаторов MGI DNBSEQ G-400 и Illumina NextSeq2000. Для обработки и анализа данных секвенирования использовали программы и инструменты FastQC v.0.12.1, FastP v.0.23.4, BWA-MEM2 v.2.2.1, VizCoV.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Анализ распространения однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) внутри вирусной популяции в исследованных образцах выявил ряд минорных вариантов, способных при дальнейшем накоплении привести к изменению консенсусных последовательностей белков вакцинных штаммов. В образцах вируса кори не выявлено полиморфизмов в белке Н, при этом обнаружен несинонимичный полиморфизм в белке F, встречающийся в 30,0–40,9% вирусных геномов. В капсидном белке С и в поверхностном гликопротеине Е2 вируса краснухи выявлены полиморфизмы, встречающиеся в вирусной популяции с частотой до 30%. В поверхностных антигенах — гемагглютинин-нейраминидаза HN и белок слияния F вируса паротита обнаружены полиморфизмы, встречающиеся в геномах менее чем в 20% вирусной популяции. Мутации в геномах производственных штаммов, которые могли бы оказывать влияние на иммуногенность вакцин против кори, краснухи и паротита, не найдены.

ВЫВОДЫ. Выявленный набор минорных вариантов с частотой встречаемости в популяции более 10%, которые при дальнейшем накоплении могут привести к изменению консенсусных последовательностей вакцинных штаммов, актуализирует задачу контроля стабильности вакцинных штаммов методом высокопроизводительного секвенирования.

Ключевые слова: корь; краснуха; паротит; вакцинный штамм; высокопроизводительное полногеномное секвенирование; SNP; NGS; геном вирусов; однонуклеотидный полиморфизм

Для цитирования: Желтухина А.И., Комиссаров А.Б., Фадеев А.В., Ёлшин Н.Д., Писарева М.М., Едер В.А., Коржанова М., Ксенафонтов А.Д., Передерий А.А., Охлопкова О.В., Саушкина Л.А., Шведова Е.В., Гришина Е.А., Лioзнов Д.А. Генетическая характеристика производственных штаммов вирусов кори, краснухи и паротита методом высокопроизводительного секвенирования. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(3):336–348. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-750>

Финансирование. Работа выполнена в рамках договора № 916/24 на выполнение научно-исследовательской работы между АО «НПО «Микроген» и ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Потенциальный конфликт интересов. Научно-исследовательская работа была выполнена по заказу АО «НПО «Микроген». Л.А. Саушкина, Е.В. Шведова, Е.А. Гришина являются сотрудниками АО «НПО «Микроген». Однако при написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Genetic characterization of production strains of measles, rubella, and mumps viruses by high-throughput sequencing

Alyona I. Zheltukhina¹ , Andrey B. Komissarov¹ , Artem V. Fadeev¹ ,
Nikita D. Yolshin¹ , Maria M. Pisareva¹ , Veronika A. Eder¹ ,
Margarita Korzhanova¹ , Andrey D. Ksenafontov¹ , Alexander A. Perederiy¹ ,
Olesia V. Ohlopkova¹ , Lyudmila A. Saushkina² , Evgenia V. Shvedova² ,
Elena A. Grishina² , Dmitry A. Lioznov¹ 

¹ A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, 15/17 Professor Popov St., St. Petersburg 197376, Russian Federation

² Scientific and Production Association Microgen, 10 2nd Volkonsky Lane, Moscow 127473, Russian Federation

✉ Andrey B. Komissarov; andrey.komissarov@influenza.spb.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Spontaneous mutations often arise and accumulate in the genome of RNA-containing viruses, for example measles, rubella and mumps. Modern requirements for the production of vaccine products containing live vaccine viruses suggest control of the genetic stability of production strains. The method of high throughput sequencing allows to determine all mutations arisen in viral population, and to assess genetic stability of production strains.

AIM. Analysis of nucleotide sequence of the genomes of seed and production strains of measles (Leningrad-16), rubella (RA27/3) and mumps (Leningrad-3) viruses, in comparison with the reference nucleotide sequences of vaccine strains genomes (submitted in the GenBank database).

MATERIALS AND METHODS. Production strains of vaccines (measles culture live, rubella culture live and mumps culture live) were used in this study. Whole genome sequencing was performed using the MGI DNBSEQ G-400 and Illumina NextSeq2000 genetic analyzers. When processing and analyzing the sequencing data, the following programs and tools were used: FastQC v.0.12.1, FastP v.0.23.4, BWA-MEM2 v.2.2.1, VizCoV tool.

RESULTS. Analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the viral population in the studied samples revealed a number of minor variants that, and after further accumulation, may lead to changes in the consensus sequences of the vaccine strains proteins. For the studied measles virus samples, no SNPs were found in the main measles virus antigen H protein, however, a nonsynonymous polymorphism was detected in the F protein, occurring in 30.0–40.9% of the viral genomes. SNPs were found in the capsid protein C and in the surface glycoprotein E2 rubella virus, occurring in the viral population with a frequency of up to 30%. SNPs were found in surface antigens hemagglutinin neuraminidase HN and fusion protein F of mumps virus, occurring in the genomes of less than 20% of viral population. Mutations in the genomes of production strains that could affect the immunogenicity of measles, rubella, and mumps vaccines were not detected.

CONCLUSIONS. The identified set of minor variants with a frequency of occurrence in viral population of more than 10%, which, with further accumulation, can lead to changes in the consensus sequences of vaccine strains, makes the monitoring of vaccine strains stability using high-throughput sequencing relevant.

Keywords: measles; rubella; mumps; vaccine strain; whole genome sequencing; high-throughput sequencing; SNP; NGS; virus genome; single nucleotide polymorphism

For citation: Zheltukhina A.I., Komissarov A.B., Fadeev A.V., Yolshin N.D., Pisareva M.M., Eder V.A., Korzhanova M., Ksenafontov A.D., Perederiy A.A., Ohlopko O.V., Saushkina L.A., Shvedova E.V., Grishina E.A., Lioznov D.A. Genetic characterization of production strains of measles, rubella, and mumps viruses by high-throughput sequencing. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(3):336–348. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-750>

Funding. The study reported in this publication was supported by the JSC Scientific and Production Association for Medical Immunobiological Products Microgen (contract No. 916/24).

Disclosure. The research work was carried out by order of JSC Scientific and Production Association for Medical Immunobiological Products Microgen. L.A. Saushkina, E.V. Shvedova, E.A. Grishina are employees of JSC Scientific and Production Association for Medical Immunobiological Products Microgen. However, when writing the manuscript, the authors were guided by considerations of the scientific value of the obtained material and declare the impartiality of the assessment of the obtained data. Other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Одними из самых распространенных высококонтагиозных вирусных заболеваний являются корь, краснуха и эпидемический паротит¹. Многолетний опыт эпидемиологического надзора за корью, краснухой и паротитом подтверждает высокую эффективность применяемой тактики вакцинопрофилактики данных инфекций². Известно, что в геноме РНК-содержащих вирусов, в том числе вирусов кори, краснухи и паротита, часто возникают и накапливаются спонтанные мутации [1]. Процесс производства вакцин также нередко сопровождается возникновением и накоплением мутаций в вакцинных штаммах, некоторые из которых способны привести к изменениям антигенных свойств вируса. Помимо вакцинных штаммов кори [2], краснухи [3] и паротита [4], это установлено и для других РНК-содержащих вирусов, против которых разработаны вакцины, например

для вакцинного штамма 17-D вируса желтой лихорадки [5], что, как следствие, может оказать отрицательное влияние на защитные функции препарата, а также привести к частичному восстановлению вирулентности вируса.

В настоящее время одним из требований к производству вакцинных препаратов, содержащих живые вакцинные штаммы вирусов, является контроль генетической стабильности производственных штаммов, рекомендованный руководством ICH³ и Государственной фармакопеей Российской Федерации (ГФ РФ) XIV изд.⁴ Для РНК-вирусов, в том числе для вирусов эпидемического паротита, кори и краснухи, характерно накопление мутаций при репликации, в результате которого препарат вируса представляет собой гетерогенную смесь молекул геномной РНК с отличающимися нуклеотидными последовательностями (квазивиды) [1, 6]. В зависимости от условий рост вируса как *in vitro*,

¹ Measles, mumps, rubella (MMR) vaccine safety. <https://www.cdc.gov/vaccine-safety/vaccines/mmr.html>

² МУ 3.1.2.1177–02 Эпидемиологический надзор за корью, краснухой и эпидемическим паротитом. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России; 2003.

³ ICH Q5D Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products. EMA; 1998.

⁴ ФС.3.3.1.0024.15 Вакцина против краснухи культуральная живая, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. 2018.

так и *in vivo* приводит к отбору различных субпопуляций, что может влиять на свойства вируса, включая вирулентность. Для некоторых вакцинных штаммов вируса эпидемического паротита (в частности, Urabe AM9) было показано возникновение вакцино-ассоциированных осложнений в результате частичного восстановления вирулентности, однако клинические случаи протекали легко и не приводили к неблагоприятным исходам [7, 8]. Поскольку вакцинные штаммы подвержены генетической изменчивости, которая может повлиять на их профиль безопасности, выяснение молекулярного механизма ослабления живых вакцин и путей их реверсии к вирулентности может помочь в разработке методов молекулярного контроля качества, что особенно важно в случае живой вакцины против эпидемического паротита [9].

Хотя в ряде исследований для вакцинных штаммов вирусов кори и краснухи была продемонстрирована высокая степень генетической стабильности в процессе длительного пассирования, в их геномах могут накапливаться минорные мутации, которые при дальнейшем накоплении могут привести к изменению консенсусных аминокислотных последовательностей вакцинных штаммов, что делает актуальной задачу периодического контроля стабильности вакцинных штаммов [4, 10–13]. В настоящее время стандартной практикой для решения этой задачи стало применение методов высокопроизводительного секвенирования (методов секвенирования нового поколения, далее NGS-секвенирование), которые обладают высокой чувствительностью и дают возможность определить даже минорные мутации, возникшие в вирусной популяции [11, 12, 14–16].

Высокопроизводительное полногеномное секвенирование позволяет не только осуществлять эпидемиологический надзор за социально значимыми инфекциями, но и проводить контроль качества при производстве вакцин с целью долгосрочного мониторинга стабильности, поскольку он обеспечивает высокую точность и раннее выявление новых вариантов, что подтверждают ранее проведенные исследования для вирусов кори и паротита [2, 17]. В отношении вакцинных штаммов краснухи отсутствуют исследования, в которых проводилось NGS-секвенирование данных штаммов, в том числе RA27/3 (исследования молекулярно-генетической характеристики данного штамма ограничены секвенированием по Сэнгеру). В то же время для некоторых вакцинных штаммов кори и паротита имеются данные об NGS-секвенировании и секвенировании по Сэнгеру [18, 19].

Для отечественных вакцинных штаммов кори (Ленинград-16) и паротита (Ленинград-3), которые входят в состав живых аттенуированных вакцин, применяемых на территории России, в настоящее время также доступны в GenBank только полные геномы, полученные методом капиллярного секвенирования по Сэнгеру. Таким образом, генетическая характеристика с оценкой генетической стабильности полногеномных последовательностей данных штаммов методами высокопроизводительного секвенирования, имеет важное практическое значение.

Цель работы – анализ нуклеотидных последовательностей геномов посевных и производственных штаммов вирусов кори (Ленинград-16), краснухи (RA-27/3) и паротита (Ленинград-3), в сравнении с референсными нуклеотидными последовательностями геномов вакцинных штаммов, ранее депонированных в базу данных GenBank.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнялось на базе лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России в январе 2025 г.

Материалы

Исследуемые образцы. В работе использованы производственные штаммы трех культуральных живых вакцин против кори, краснухи и паротита. Производственные штаммы предоставлены АО «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген». В *таблице 1* представлена характеристика образцов, используемых в работе.

Методы

Выделение РНК исследованных образцов проводили с применением набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя, от каждого образца на выделение было взято 140 мкл. Предварительно лиофилизаты образцов CS1154, CS1159 и CS1160 были разведены в 1 мл питательной среды 199. Лيوфилизат образца CS1157 был разведен в 1 мл питательной среды F-12/MEM.

Получение кДНК осуществляли методом обратной транскрипции с использованием M-MLV-ревертазы (набор Magnus Reverse transcriptase, «Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Амплификацию продуктов обратной транскрипции для последующего секвенирования осуществляли с использованием

Таблица 1. Используемые в исследовании производственные штаммы и посевные вирусы
Table 1. Production strains and seed viruses used in the study

Тип материала <i>Material type</i>	Штамм <i>Strain</i>	Серия <i>Series</i>	Дата изготовления <i>Production date</i>	№ <i>No.</i>	Пассажная история <i>Passage history</i>
Производственный штамм вакцины коревой* <i>Production strain of measles vaccine*</i>	Ленинград-16 <i>Leningrad-16</i>	10	05.1993 ГПМ/ <i>MSL</i>	CS1154	21 ПМС/ <i>ГПК</i> 4 ФЭП/ <i>QEF</i>
Посевной вирус для вакцины коревой* <i>Seed virus for measles vaccine*</i>	Ленинград-16 <i>Leningrad-16</i>	199	13.02.2003 РПМ/ <i>WSL</i>	CS1155	21 ПМС/ <i>ГПК</i> 6 ФЭП/ <i>QEF</i>
Посевной вирус для вакцины коревой* <i>Seed virus for measles vaccine*</i>	Ленинград-16 <i>Leningrad-16</i>	201	22.03.2006 РПМ/ <i>WSL</i>	CS1156	21 ПМС/ <i>ГПК</i> 6 ФЭП/ <i>QEF</i>
Производственный штамм вакцины против краснухи* <i>Production strain of rubella vaccine*</i>	RA-27/3	2	03.2008 ГПМ/ <i>MSL</i>	CS1157	26 WI-38 3 MRC-5**
Посевной вирус для вакцины против краснухи* <i>Seed virus for rubella vaccine*</i>	RA-27/3	4	26.10.2012 РПМ/ <i>WSL</i>	CS1158	26 WI-38 4 MRC-5**
Производственный штамм вакцины паротитной* <i>Production strain of mumps vaccine*</i>	Ленинград-3 <i>Leningrad-3</i>	6	08.1980 ГПМ/ <i>MSL</i>	CS1159	15 ПМС/ <i>ГПК</i> 4 ФЭП/ <i>QEF</i>
Производственный штамм вакцины паротитной* <i>Production strain of mumps vaccine*</i>	Ленинград-3 <i>Leningrad-3</i>	8	11.2006 ГПМ/ <i>MSL</i>	CS1160	15 ПМС/ <i>ГПК</i> 6 ФЭП/ <i>QEF</i>
Посевной вирус для вакцины паротитной* <i>Seed virus for mumps vaccine*</i>	Ленинград-3 <i>Leningrad-3</i>	76	04.2006 РПМ/ <i>WSL</i>	CS1161	15 ПМС/ <i>ГПК</i> 6 ФЭП/ <i>QEF</i>
Посевной вирус для вакцины паротитной* <i>Seed virus for mumps vaccine*</i>	Ленинград-3 <i>Leningrad-3</i>	69	11.2000 РПМ/ <i>WSL</i>	CS1162	15 ПМС/ <i>ГПК</i> 6 ФЭП/ <i>QEF</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ГПМ — главный посевной материал; РПМ — рабочий посевной материал; ПМС — почки морских свинок; ФЭП — фибробласты эмбрионов японского перепела.

* вакцина культуральная живая.

** диплоидные линии фибробластов легких человека WI-38 и MRC-5.

Note. MSL, master seed lot; WSL — working seed lot; GPK — guinea pig kidneys; QEF — Japanese quail embryo fibroblasts.

* live culture vaccine.

** diploid human lung fibroblast lines WI-38 and MRC-5.

набора «БиоМастер LR HS-ПЦР (2X)» (ООО «Биолабмикс», Россия) согласно инструкции производителя. Накопление кДНК для последующего секвенирования проводили с использованием методов SMART и SISPA, демонстрирующих высокую специфичность при тестировании как на клинических образцах, так и на изолятах возбудителей [20, 21]. Для образца кори CS1156 дополнительно проводилась независимая амплификация полного генома с применением специфичной праймерной панели для вируса кори для сравнения полученных консенсусных последовательностей и подтверждения воспроизводимости данных NGS-секвенирования.

После амплификации продуктов обратной транскрипции и их очистки для последующего секвенирования проводили оценку концентрации очищенных продуктов перед приготовлением библиотек. Объем каждого образца ДНК на вход в реакцию подбирали таким образом, чтобы концентрация ДНК всех образцов находилась в диапазоне от 50 до 80 нг/образец. Концентрации полученных ДНК-библиотек составили от 70,0 до 87,8 нг/мкл.

Подготовка библиотек и NGS-секвенирование.

Подготовка ДНК-библиотек проведена с использованием набора реагентов DNBSEQ VANTS Universal Plus DNA Library Prep Kit for MGI (Vazyme, КНР). Протокол включает предварительную очистку ДНК, ферментативную фрагментацию, лигирование адаптеров и амплификацию. Предварительную очистку продуктов амплификации методом SMART и SISPA проводили на магнитных частицах. Качество полученных ДНК-библиотек оценивали с использованием флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США) и набора Equalbit dsDNA HS Assay Kit (Vazyme, КНР) для анализа двухцепочечной ДНК.

Далее ДНК-библиотеки пулировали по массе в равном соотношении. Готовые пулы проходили этап циркуляризации с использованием набора MGIEasy Circularization Kit (MGI, КНР). Приготовление ДНК-наноприцелов из циркуляризованных библиотек и последующее секвенирование было выполнено с использованием набора реагентов для одноконцового прочтения и проточной ячейки DNBSEQ-G400RS

High-throughput Sequencing Set FCL SE100 (MGI, KHP) на секвенаторе MGI DNBSEQ G-400.

Для приготовления ДНК-библиотеки для NGS-секвенирования на платформе Illumina использовали набор реагентов Illumina DNA Prep и набор индексирующих олигонуклеотидов Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation. Секвенирование проводили на приборе Illumina NextSeq 2000 с использованием набора реагентов NextSeq 1000/2000 P2 Reagent Cartridge (100 Cycles).

Сборка и обработка данных секвенирования. Для оценки качества первичных данных секвенирования использовали программное обеспечение FastQC v.0.12.1 (лицензия GPL v3)⁵. Для фильтрации низкокачественных данных и адаптерных последовательностей применяли программное обеспечение FastP v.0.23.4 (лицензия MIT)⁶ [22]. Прочтения были картированы на эталонные последовательности вакцинных штаммов с использованием BWA-MEM2 v.2.2.1 (лицензия MIT) [23]. Для получения черновых консенсусных последовательностей по правилу наибольшей представленности использовали утилиту iVar v.1.4.3 (лицензия GPL v3)⁷ [24]. Глубина покрытия рассчитывалась с использованием samtools depth, с последующим построением графиков распределения покрытия с помощью библиотеки python matplotlib. Визуализацию графиков покрытий проводили с помощью инструмента VizCoV⁸.

Биоинформатический анализ полученных последовательностей. Проведено сравнение консенсусных последовательностей исследованных образцов с референсными последовательностями вакцинных штаммов из базы данных GenBank для кори (Ленинград-16, GenBank Acc. No. JF727649.1), краснухи (RA 27/3, GenBank Acc. No. JF727653.2) и паротита (Ленинград-3, GenBank Acc. No. JF727651.1). Данные референсные последовательности были ранее депонированы в GenBank компанией АО «НПО «Микроген» [25, 26].

Дополнительно проводился поиск однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) с использованием lofreq (лицензия MIT)⁹ [27]. Выявленные полиморфизмы с аллельной частотой более 50% далее применялись к черновой консенсусной последовательности с помощью bcftools consensus (лицензия GPL v3)¹⁰ [28] для получения финальной

сборки в формате fasta. Выявленные полиморфизмы с частотой встречаемости 10–50% в позициях с глубиной покрытия 20× и более использовались для анализа гетерогенности вирусной популяции в исследованных образцах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании было проведено секвенирование 9 образцов производственных штаммов и посевных вирусов для культуральных живых вакцин коревой и паротитной, а также вакцины против краснухи (табл. 1). Качество полученных сырых данных секвенирования для всех образцов было оценено как удовлетворительное, прочтения были картированы на эталонные последовательности вакцинных штаммов. В качестве целевой минимальной глубины покрытия было принято значение 20× [29, 30]. Позиции с глубиной прочтения ниже 20× рассматривались как неопределенные. Для всех образцов были получены консенсусные последовательности геномов. Данные по глубине покрытия геномов секвенированных образцов приведены в таблице 2. На рисунках 1–3 представлены графики покрытий.

Для всех образцов, кроме образцов вакцины против краснухи и производственного штамма коревой вакцины, удалось достичь медианного покрытия более 10000×, что соответствует ультраглубокому секвенированию [31]. Глубокое и ультраглубокое секвенирование позволяет проводить не только сравнение консенсусных последовательностей, но также и анализ минорных вариантов вируса в исследуемых образцах [32].

Для всех исследованных последовательностей не было выявлено нуклеотидных и аминокислотных различий между консенсусными последовательностями геномов главного и рабочего посевных материалов, что свидетельствует о генетической стабильности штаммов на данном этапе производства.

На рисунке 4 представлено распределение выявленных замен в геномах исследованных образцов главного посевного материала (ГПМ) и рабочего посевного материала (РПМ) вирусов кори, краснухи и паротита. Интересно отметить, что существуют как более консервативные блок-кодирующие участки геномов, в которых не были выявлены мутации и однонуклеотидные

⁵ <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

⁶ <https://github.com/OpenGene/fastp>

⁷ <https://github.com/andersen-lab/ivar>

⁸ <https://github.com/LMV-NIC-St-Petersburg/VizCoV>

⁹ <https://github.com/CSB5/lofreq>

¹⁰ <https://github.com/samtools/bcftools>

Таблица 2 Данные по покрытию секвенированных образцов
Table 2. Sequenced sample coverage data

№ образца <i>Sample No.</i>	Штамм <i>Strain</i>	Количество прочтений на образец <i>Number of reads per sample</i>	Медианное покрытие <i>Median coverage</i>
CS1154	Вирус кори Ленинград-16 <i>Measles virus Leningrad-16</i>	1212956	8350×
CS1155		2912753	20700×
CS1156		2327286	16600×
CS1157	Вирус краснухи RA27/3 <i>Rubella virus RA27/3</i>	6168	64×
CS1158		8007	82×
CS1159	Вирус паротита Ленинград-3 <i>Mumps virus Leningrad-3 strain</i>	5206884	38100×
CS1160		4147086	31000×
CS1161		1977249	14100×
CS1162		4654467	35100×

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

полиморфизмы (SNP), так и наиболее вариабельные участки генома. Для исследованных образцов вируса кори (CS1154–CS1156) продемонстрировано, что наиболее консервативными участками генома оказались участки, кодирующие N-белок и H-белок, а для исследованных образцов вируса паротита (CS1159–CS1162) – участки, кодирующие Р-белок и М-белок. При этом для исследованных образцов вирусов краснухи (CS1157–CS1158) не выявлено генов, в которых не были бы выявлены нуклеотидные замены.

Сравнение консенсусных последовательностей из идентичных образцов вируса кори, амплифицированных разными методами. С целью

подтверждения выявленных замен было проведено сравнение консенсусных последовательностей генома вируса кори из образца CS1156, который был амплифицирован методом универсальной амплификации вирусных геномов SISPA и с использованием специфичной праймерной панели для вируса кори. Не выявлены отличия между консенсусными последовательностями исследованных образцов, амплифицированных разными методами (табл. 3).

Сравнение консенсусных последовательностей с референсными последовательностями, депонированными ранее в GenBank. В таблице 4 приведены нуклеотидные замены в белок-кодирующих

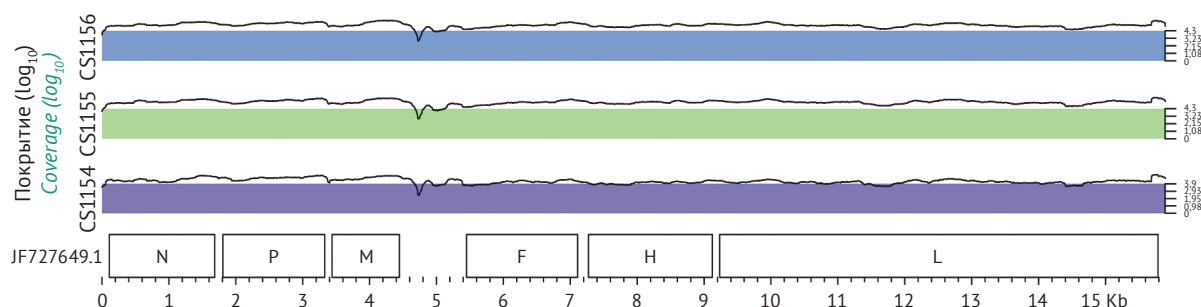


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Графики покрытия для исследованных образцов вируса кори (CS1154–CS1156).

Fig. 1. Coverage plots for the tested measles virus samples (CS1154–CS1156).

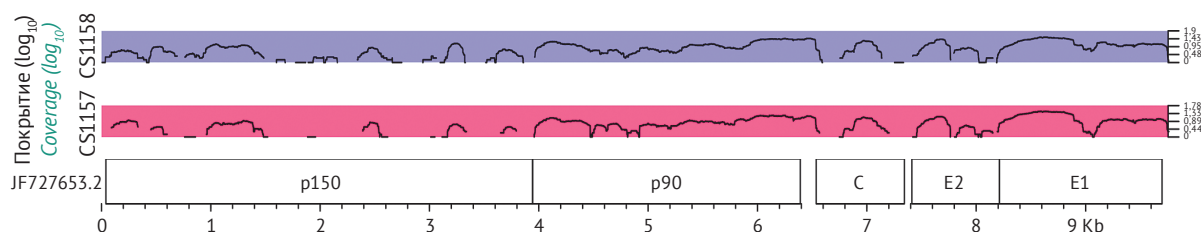


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Графики покрытия для исследованных образцов вируса краснухи (CS1157–CS1158).

Fig. 2. Coverage plots for the tested rubella virus samples (CS1157–CS1158).

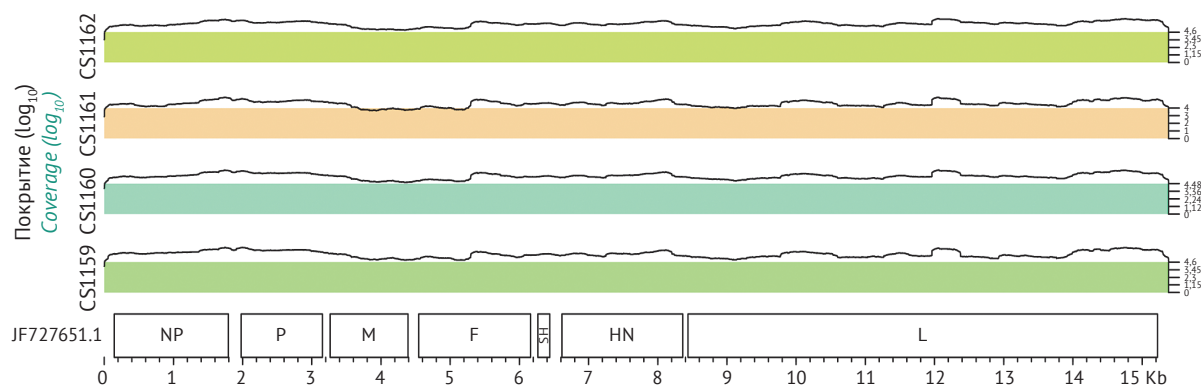


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Графики покрытия для исследованных образцов вируса паротита (CS1159–CS1162).

Fig. 3. Coverage plots for the tested mumps virus samples (CS1159–CS1162).

участках генома вирусов кори, краснухи и паротита в исследованных образцах относительно референсных последовательностей вакцинных штаммов АО «НПО «Микроген» из базы данных GenBank. Аннотирование образцов проводилось на референсные последовательности кори (вакцинный штамм Ленинград-16, GenBank Acc. No., JF727649.1), краснухи (вакцинный штамм RA 27/3, GenBank, Acc. No. JF727653.2) и паротита (вакцинный штамм Ленинград-3, GenBank, Acc. No. JF727651.1).

Для исследованных образцов вируса кори (CS1154–CS1156) при сравнении с референсной последовательностью не выявлено аминокислотных замен, оказывающих влияние на антигенные свойства и иммуногенность, в том числе в Н-белке [33]. Также было выявлено 9 нуклеотидных замен в межгенных участках генома.

Из-за высокого содержания GC% в составе генома вируса краснухи, обусловленного

природой вируса, не удалось достигнуть достаточной 20× глубины покрытия в некоторых областях генома, что не позволило достоверно определить нуклеотидные полиморфизмы в позициях генома штаммов вируса краснухи 2018–2349, 2724–3003, 3799–3889, 6607–6709. Однако по данным литературы установлено, что такие области кодируют NS-белок и часть белка С и не затрагивают участки, кодирующие поверхностные гликопротеины вируса краснухи, определяющие его антигенные свойства [34, 35]. Анализ исследованных образцов вируса краснухи показал наличие миссенс-мутации С140W в аминокислотной последовательности NS-белка, не влияющей на антигенные свойства вакцинного вируса. Мутаций в межгенных участках генома не выявлено.

Анализ исследованных образцов вируса паротита (CS1159–CS1162) в сравнении с референсной последовательностью показал наличие миссенс-мутации в белке F (T239I),

Таблица 3. Сравнение мутаций и замен в белок-кодирующих участках генома вируса кори (образец CS1156), выявленных разными методами, относительно вакцинных штаммов

Table 3. Mutations and substitutions in protein coding genome sites of measles (sample CS1156) detected by different methods compared to vaccine strains

Метод амплификации <i>Amplification method</i>	Позиция в геноме <i>Genome position</i>	Аннотация <i>Annotation</i>	Кодируемые белки <i>Encoded proteins</i>	Покрытие <i>Coverage</i>	Замена нуклеотида <i>Nucleotide substitution</i>	Замена аминокислоты <i>Amino acid substitution</i>
Относительно вакцинного штамма кори Ленинград-16 (GenBank, Acc. No. JF727649.1) <i>Compared to Leningrad-16 measles vaccine strain (GenBank Acc. No. JF727649.1)</i>						
SISPA	2292	SS	Р-белок <i>P-protein</i>	14015×	с.486A>G	Нет <i>No</i>
Панель праймеров <i>Primer panel</i>				22892×		
SISPA	12521	SS	L-белок <i>L-protein</i>	8230×	с.3288A>C	Нет <i>No</i>
Панель праймеров <i>Primer panel</i>				20201×		

Таблица составлена авторами по собственным данным и данным GenBank / The table is prepared by the authors using their own data and GenBank data

Примечание. SS – синонимичная замена; SISPA – сиквенс-независимая амплификация с использованием одного праймера.

Note. SS, synonymous substitution; SISPA, Sequence-Independent, Single-Primer Amplification.

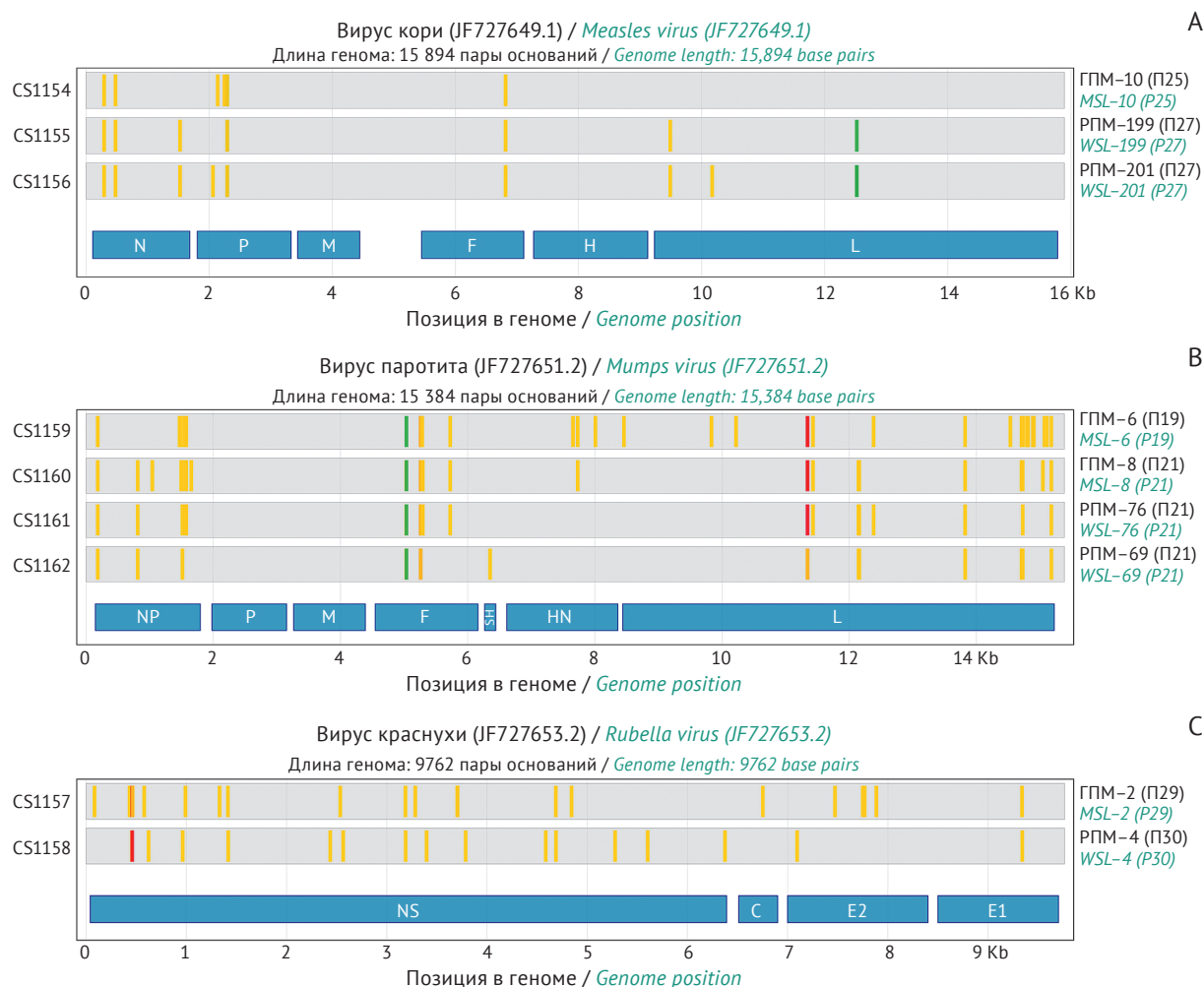


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Распределение выявленных мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов в геномах исследованных образцов вирусов: А – кори (CS1154–CS1156), В – паротита (CS1159–CS1162), С – краснухи (CS1157–CS1158). Желтым цветом отмечены минорные мутации, красным – миссенс-мутации, зеленым – синонимичные замены. ГПМ – главный посевной материал; РПМ – рабочий посевной материал.

Fig. 4. Distribution of identified single nucleotide polymorphisms in the genomes of the measles virus (CS1154–CS1156) (A), mumps virus (CS1159–CS1162) (B) and rubella virus (CS1157–CS1158) (C) specimens. Minor mutations are marked in yellow, missense mutations are marked in red, and synonymous substitutions are marked in green. MSL, master seed lot; WSL, working seed lot.

однако данная замена находится вне сайтов гликозилирования и не относится к нейтрализующим эпитопам [36]. В настоящее время отсутствуют данные литературы, свидетельствующие о возможном влиянии такой замены на антигенные свойства штаммов вируса паротита и их иммуногенность. Помимо указанной замены было выявлено 3 нуклеотидные замены в некодирующих областях генома.

Анализ минорных полиморфизмов в вирусной популяции в исследованных образцах. Проведен анализ распространения SNP внутри вирусной популяции в исследованных образцах. Аннотирование образцов проводилось на те же

референсные последовательности вирусов кори, краснухи и паротита, которые использовались для выявления нуклеотидных замен в белок-кодирующих участках генома. Выявлен ряд минорных вариантов, которые при дальнейшем накоплении могут привести к изменению консенсусных аминокислотных последовательностей белков вакцинных штаммов (табл. S1–S3, онлайн-приложение 1 опубликовано на сайте журнала¹¹).

В результате анализа полиморфизмов внутри вирусной популяции в исследованных образцах вируса кори (CS1154–CS1156) был выявлен полиморфизм в белке F, приводящий

¹¹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-750-annex>

Таблица 4. Мутации и замены в белок-кодирующих участках генома вирусов кори, краснухи и паротита в исследованных образцах относительно вакцинных штаммов**Table 4.** Mutations and substitutions in protein-coding genome sites of measles, rubella and mumps virus specimens compared to vaccine strains

Образец <i>Sample</i>	Позиция в геноме <i>Genome position</i>	Аннотация <i>Annotation</i>	Кодируемые белки <i>Encoded proteins</i>	Покрывтие <i>Coverage</i>	Замена нуклеотида <i>Nucleotide substitution</i>	Замена аминокислоты <i>Amino acid substitution</i>
Относительно вакцинного штамма кори Ленинград-16 (GenBank, Acc. No. JF727649.1) <i>Compared to Leningrad-16 measles vaccine strain (GenBank Acc. No. JF727649.1)</i>						
CS1154	2292	SS	Р-белок <i>P-protein</i>	15396×	с.486A>G	Нет <i>No</i>
CS1155				21463×		
CS1156				20437×		
CS1155	12521	SS	L-белок <i>L-protein</i>	9106×	с.3288A>C	Нет <i>No</i>
CS1156				29070×		
CS1156				20187×		
Относительно вакцинного штамма краснухи RA 27/3 (GenBank, Acc. No. JF727653.2) <i>Compared to RA 27/3 rubella vaccine strain (GenBank Acc. No. JF727653.2)</i>						
CS1157	460	MM	NS-белок <i>NS-protein</i>	26×	с.420C>G	C140W
CS1158				9×		
CS1156	12521	SS	NS-белок <i>NS-protein</i>	42×	с.3141T>C	Нет <i>No</i>
CS1156				9×		
Относительно вакцинного штамма паротита Ленинград-3 (GenBank, Acc. No. JF727651.2) <i>Compared to Leningrad-3 mumps vaccine strain (GenBank Acc. No. JF727651.2)</i>						
CS1159	5037	SS	F-белок <i>F-protein</i>	7474×	с.492G>A	Нет <i>No</i>
CS1160				6989×		
CS1161				2858×		
CS1162				8920×		
CS1159	5261	MM	F-белок <i>F-protein</i>	7227×	с.716C>T	T239I
CS1160				7854×		
CS1161				3299×		
CS1162				10544×		
CS1159	11345	MM	L-белок <i>L-protein</i>	24436×	с.2908G>T	V970L
CS1160				19613×		
CS1161				8591×		
CS1162				24831×		

Таблица составлена авторами по собственным данным и данным GenBank / The table is prepared by the authors using their own data and GenBank data

Примечание. SS — синонимичная замена; MM — миссенс-мутация.*Note.* SS, synonymous substitution; MM, missense mutation.

к аминокислотной замене S456P (доля вирусных геномов с такой заменой в образцах составляла 30,0–40,9%; данные приведены в таблице S1, онлайн-приложение 1), однако для замены S456P отсутствуют данные литературы о ее возможном влиянии на иммуногенность вакцинного штамма

[37, 38]. Важно подчеркнуть, что для исследованных образцов вируса кори не выявлено наличие полиморфизмов в белке Н, который является главным антигеном вируса кори [39]. Стоит отметить, что в участках, кодирующих Р-белок и L-белок, были выявлены замены в геномах всех

исследованных образцов, что также согласуется с данными литературы о том, что распределение мутаций в геноме вируса кори происходит не случайным образом, а имеет определенную закономерность [2].

Для исследованных образцов вируса краснухи (CS1157–CS1158) были выявлены полиморфизмы в капсидном белке (С-белок) и в поверхностном гликопротеине E2, встречающиеся в вирусной популяции с частотой до 30% (табл. S2, онлайн-приложение 1). Хотя имеются данные о выявлении нейтрализующих антител как к гликопротеинам E1 и E2, так и к С-белку вируса краснухи [40], анализ данных литературы показал отсутствие информации о влиянии аминокислотных замен в С-белке на иммуногенность вакцинного штамма [41]. Для аминокислотных замен T413I и G458V в белке E2 также отсутствуют данные литературы об их влиянии на иммуногенность [35].

Для исследованных образцов вируса паротита (CS1159–CS1162) были выявлены полиморфизмы в гемагглютинин-нейраминидазе (белок HN) и белке слияния (белок F), которые играют важную роль в формировании иммунного ответа (табл. S3, онлайн-приложение 1). Замены N348T и R373P в белке HN, к которым приводят полиморфизмы, находятся вне известных потенциальных сайтов гликозилирования и участков, изменения в которых могли бы оказывать влияние на иммуногенность вакцинных штаммов [42]. Для аминокислотных замен в белке F (I163T, L250V и I394R), возникающих в результате имеющихся полиморфизмов, отсутствуют данные литературы о влиянии этих замен на иммуногенность вакцинных штаммов [42]. Остальные структурные белки (NP, P, M, SH и L) вируса паротита не играют важной роли в формировании иммунного ответа, в связи с чем анализ выявленных в них полиморфизмов не проводился.

Следует отметить, что для образцов РПМ кори (CS1155 и CS1156) и паротита (CS1160–CS1162) с одинаковой пассажной историей наблюдались

некоторые отличия в наборе однонуклеотидных полиморфизмов, вероятно, возникшие при пассировании ГПМ для получения РПМ в разные годы с использованием различного сырья (разные партии питательных сред, разные серии клеточных линий и др.), не приводящие к изменениям в консенсусных последовательностях.

ВЫВОДЫ

1. Отличия между нуклеотидной последовательностью геномов исходных производственных штаммов вирусов кори, краснухи, паротита и соответствующих посевных вирусов не обнаружены.
2. Выявленный набор минорных вариантов нуклеотидных замен с частотой встречаемости в вирусной популяции более 10%, которые при дальнейшем накоплении могут привести к изменению консенсусных аминокислотных последовательностей вакцинных штаммов, делает актуальной задачу периодического контроля стабильности вакцинных штаммов методом высокопроизводительного секвенирования на различных этапах производственного процесса (ГПМ, РПМ).
3. Использование высокопроизводительного секвенирования позволило не только оценить стабильность производственных штаммов кори, краснухи и паротита после пассирования, но и оценить гетерогенность вирусных популяций производственных штаммов и посевных вирусов кори (Ленинград-16), краснухи (RA-27/3) и паротита (Ленинград-3) на данных этапах культивирования. При этом выявленные минорные нуклеотидные полиморфизмы внутри вирусных популяций по имеющимся данным литературы не оказывают влияния на иммуногенность штаммов.
4. Анализ результатов исследования демонстрирует эффективность метода высокопроизводительного секвенирования для оценки генетической стабильности производственных штаммов вирусов.

Литература/References

1. Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y. Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype. *Nat Commun.* 2012;3:1235. <https://doi.org/10.1038/ncomms2252>
2. Leber MF, Hoyer B, Prien S, et al. Sequencing of serially passaged measles virus affirms its genomic stability and reveals a nonrandom distribution of consensus mutations. *J Gen Virol.* 2020;101(4):399–409. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001395>
3. Дмитриев ГВ, Борисова ТК, Файзулов ЕБ и др. Изучение молекулярных механизмов аттенуации вируса краснухи на примере отечественного штамма С-77. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2012;(3):28–34. EDN: PUJLXL Dmitriev GV, Borisova TK, Faizuloev EB, et al. A study of molecular mechanisms of rubella virus attenuation evidenced from the Russian C-77 strain. *Mol Genet Microbiol Virol.* 2012;27(3):120–6. <https://doi.org/10.3103/S0891416812030032>
4. Almansour I. Mumps vaccines: Current challenges and future prospects. *Front Microbiol.* 2020;11:1999. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01999>
5. Serrão de Andrade AA, Soares AER, Paula de Almeida LG, et al. Testing the genomic stability of the Brazilian yellow fever vaccine strain using next-generation sequencing data. *Interface Focus.* 2021;11(4):20200063. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2020.0063>
6. Mandary MB, Masomian M, Poh CL. Impact of RNA virus evolution on quasispecies formation and virulence. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4657. <https://doi.org/10.3390/ijms20184657>
7. Su SB, Chang HL, Chen AK. Current status of mumps virus infection: Epidemiology, pathogenesis, and vaccine.

- Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(5):1686. <https://doi.org/10.3390/ijerph17051686>
8. Shah N, Ghosh A, Kumar K, et al. A review of safety and immunogenicity of a novel measles, mumps, rubella (MMR) vaccine. *Hum Vaccin Immunother*. 2024;20(1):2302685. <https://doi.org/10.1080/21645515.2024.2302685>. Erratum in: *Hum Vaccin Immunother*. 2024;20(1):2367876. <https://doi.org/10.1080/21645515.2024.2367876>
 9. Brown EG, Wright KE. Genetic studies on a mumps vaccine strain associated with meningitis. *Rev Med Virol*. 1998;8(3):129–42. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1654\(199807/09\)8:3%3C129::aid-rmv213%3F3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1654(199807/09)8:3%3C129::aid-rmv213%3F3.0.co;2-z)
 10. Perelygina L, Chen MH, Suppiah S, et al. Infectious vaccine-derived rubella viruses emerge, persist, and evolve in cutaneous granulomas of children with primary immunodeficiencies. *PLoS Pathog*. 2019;15(10):e1008080. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008080>
 11. Wilson SE, Zubach V, Lew B, et al. Measles vaccine virus mutation following vaccination in a healthy child resulting in a false negative vaccine specific PCR test: Ontario, Canada, 2025. *Euro Surveill*. 2025;30(43):2500774. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2025.30.43.2500774>
 12. Gruber CEM, Gioacchini S, Fabeni L, et al. Molecular investigation on measles cases rise and variants co-circulation in the Lazio region, Italy. *Virol J*. 2025;22(1):288. <https://doi.org/10.1186/s12985-025-02910-8>
 13. Hiebert J, Zubach V, Schulz H, Severini A. Genomic tools for post-elimination measles molecular epidemiology using Canadian surveillance data from 2018–2020. *Front Microbiol*. 2024;15:1475144. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1475144>
 14. Zubach V, Osahan G, Kolsun K, et al. Development and evaluation of a next-generation sequencing methodology for measles virus using Oxford Nanopore Technology. *J Clin Microbiol*. 2025;63(3):e0145624. <https://doi.org/10.1128/JCM.01456-24>
 15. Bryant P, Caldwell H, Lamson DM, et al. Streamlined whole-genome sequencing of mumps virus for high-resolution outbreak analysis. *J Clin Microbiol*. 2022; 60(1):e0084121. <https://doi.org/10.1128/JCM.00841-21>
 16. Lu IN, Muller CP, He FQ. Applying next-generation sequencing to unravel the mutational landscape in viral quasispecies. *Virus Res*. 2020;283:197963. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197963>
 17. Ikegame S, Beaty SM, Stevens C, et al. Genome-wide transposon mutagenesis of paramyxoviruses reveals constraints on genomic plasticity. *PLoS Pathog*. 2020;16(10):e1008877. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008877>
 18. Parks CL, Lerch RA, Walpita P, et al. Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol*. 2001;75(2):910–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.2.910-920.2001>
 19. Dilcher M, Barratt K, Douglas J, et al. Monitoring viral genetic variation as a tool to improve molecular diagnostics for mumps virus. *J Clin Microbiol*. 2018;56(10):e00405–18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00405-18>
 20. Claro IM, Ramundo MS, Coletti TM, et al. Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing. *Wellcome Open Res*. 2023;6:241. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.17170.2>
 21. Fitzpatrick AH, Rupnik A, O'Shea H, et al. High throughput sequencing for the detection and characterization of RNA viruses. *Front Microbiol*. 2021;12:621719. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.621719>
 22. Chen S. fastp 1.0: An ultra-fast all-round tool for FASTQ data quality control and preprocessing. *iMeta*. 2025;4(5):e70078. <https://doi.org/10.1002/imt2.70078>
 23. Vasimuddin M, Misra L, Li H, Aluru S. Efficient architecture-aware acceleration of BWA-MEM for multicore systems. In: *IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium*, 2019. <https://doi.org/10.1109/IPDPS.2019.00041>
 24. Grubaugh ND, Gangavarapu K, Quick J, et al. An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biol*. 2019;20(1):8. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1618-7>
 25. Игнатъев ГМ, Отрашевская ЕВ, Суханова ЛЛ и др. Молекулярно-генетическое исследование штамма Ленинград-16, используемого для производства вакцины кори. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(2):182–9.
 - Ignatyev GM, Atrasheuskaya AV, Sukhanova LL, et al. Molecular genetic analysis of the strain Leningrad-16 used for the production of measles vaccine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(2):182–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-2-182-189>
 26. Игнатъев ГМ, Отрашевская ЕВ, Суханова ЛЛ и др. Молекулярно-генетическое исследование штамма RA-27/3, используемого для производства вакцины против краснухи. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;96(4):38–46. Ignatyev GM, Atrasheuskaya AV, Sukhanova LL, et al. Molecular-genetic study of the RA-27/3 strain used for production of rubella vaccine. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;96(4):38–46 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-4-38-46>
 27. Wilm A, Aw PP, Bertrand D, et al. LoFreq: A sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(22):11189–201. <https://doi.org/10.1093/nar/gks918>
 28. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*. 2021;10(2):giab008. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
 29. Illingworth CJR, Roy S, Beale MA, et al. On the effective depth of viral sequence data. *Virus Evol*. 2017;3(2):vex030. <https://doi.org/10.1093/ve/vex030>
 30. Zhao L, Illingworth CJR. Measurements of intrahost viral diversity require an unbiased diversity metric. *Virus Evol*. 2019;5(1):vey041. <https://doi.org/10.1093/ve/vey041>
 31. Beerenwinkel N, Zagordi O. Ultra-deep sequencing for the analysis of viral populations. *Curr Opin Virol*. 2011;1(5):413–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.07.008>
 32. Huang SW, Hung SJ, Wang JR. Application of deep sequencing methods for inferring viral population diversity. *J Virol Methods*. 2019;266:95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.01.013>
 33. Zemella A, Beer K, Ramm F, et al. Vaccine-induced neutralizing antibodies bind to the H protein of a historical measles virus. *Int J Med Microbiol*. 2024;314:151607. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2024.151607>
 34. Das PK, Kielian M. Molecular and structural insights into the life cycle of rubella virus. *J Virol*. 2021;95(10):e02349–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02349-20>
 35. Das PK, Kielian M. Rubella virus assembly requirements and evolutionary relationships with novel rubiviruses. *mBio*. 2024;15(10):e0196524. <https://doi.org/10.1128/mbio.01965-24>
 36. Gouma S, Vermeire T, Van Gucht S, et al. Publisher Correction: Differences in antigenic sites and other functional regions between genotype A and G mumps virus surface proteins. *Sci Rep*. 2020;10(1):5456. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62301-7>. Erratum for: *Sci Rep*. 2018;8(1):13337. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31630-z>
 37. Hirai Y, Takemoto R, Yanagi Y, Shirogane Y. Amino acid changes accumulated in the fusion protein allow neuropathogenic measles viruses to use a broad repertoire of host factors for cell fusion triggering. *J Virol*. 2025; 99(5):e0230724. <https://doi.org/10.1128/jvi.02307-24>
 38. Angius F, Smuts H, Rybkina K, et al. Analysis of a subacute sclerosing panencephalitis genotype B3 virus from the 2009–2010 South African measles epidemic shows that hyperfusogenic F proteins contribute to measles virus infection in the brain. *J Virol*. 2019;93(4):e01700–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01700-18>
 39. Bianchi S, Canuti M, Ciceri G, et al. Molecular epidemiology of B3 and D8 measles viruses through hemagglutinin phylogenetic history. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4435. <https://doi.org/10.3390/ijms21124435>
 40. Petrova EK, Dmitrieva AA, Trifonova EA, et al. The key role of rubella virus glycoproteins in the formation of immune response, and perspectives on their use in the development of new recombinant vaccines. *Vaccine*. 2016;34(8):1006–11. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.010>
 41. Cusi MG, Valassina M, Bianchi S, et al. Evaluation of rubella virus E2 and C proteins in protection against rubella virus in a mouse model. *Virus Res*. 1995;37(3):199–208. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(95\)00037-q](https://doi.org/10.1016/0168-1702(95)00037-q)
 42. Frost JR, Shaikh S, Severini A. Exploring the mumps virus glycoproteins: A review. *Viruses*. 2022;14(6):1335. <https://doi.org/10.3390/v14061335>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещено онлайн-приложение 1 (таблицы S1–S3): <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-750-annex>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.И. Желтухина** — написание текста рукописи, анализ данных; **А.Б. Комиссаров** — редактирование текста рукописи, руководство исследованием, анализ данных; **А.В. Фадеев** — применение метода SMART для проведения NGS секвенирования вакцинных штаммов, анализ минорных вариантов; **Н.Д. Ёлшин** — анализ сырых данных секвенирования, сборка вирусных геномов; **М.М. Писарева** — редактирование текста рукописи, анализ результатов; **В.А. Едер** — редактирование текста рукописи, работа с источниками литературы; **М. Коржанова** — подготовка библиотек для секвенирования; **А.Д. Ксенафонтов** — проведение прободготовки образцов; **А.А. Передерий** — анализ данных, визуализация полученных результатов, написание скриптов на языке программирования R; **О.В. Охлопкова** — редактирование текста рукописи, методологическое руководство секвенированием вирусов кори; **Л.А. Саушкина** — подготовка производственных штаммов для исследования; **Е.В. Шведова** — концепция исследования, участие в формулировке выводов, редактирование текста рукописи; **Е.А. Гришина** — утверждение окончательной версии статьи для публикации; **Д.А. Лioзнов** — общее руководство проектом, редактирование рукописи, участие в формулировке выводов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Additional information. Supplement 1 (Table S1–S3) is published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-750-annex>

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.I. Zheltukhina** analyzed the data and drafted the manuscript. **A.B. Komissarov** edited the test of the manuscript, supervised the laboratory part of the project, and participated in data analysis. **A.V. Fadeev** implemented SMART technology for NGS sequencing of vaccine strains, minor variants analysis. **N.D. Yolsin** analyzed raw sequencing data, performed genome assembly. **M.M. Pisareva** edited the text of the manuscript and participated in analysis. **V.A. Eder** edited the text of the manuscript and worked with literature sources. **M. Korzhanova** conducted NGS library preparation. **A.D. Ksenafontov** did sample processing. **A.A. Perederiy** participated in data analysis, data visualization and coding in R. **O.V. Ohlopkova** edited the text of the manuscript and supervised the measles sequencing. **L.A. Saushkina** prepared production strains for research. **E.V. Shvedova** conceptualised the study, participated in formulating the conclusions, and edited the text of the manuscript. **E.A. Grishina** approved the final version of the manuscript for publication. **D.A. Lioznov** supervised the project, participated in formulating the conclusions, edited the text and approved the final version of the manuscript for publication.

Об авторах / Authors

Желтухина Алена Игоревна / Alyona I. Zheltukhina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8674-6097>

Комиссаров Андрей Борисович / Andrey B. Komissarov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1733-1255>

Фадеев Артем Викторович / Artem V. Fadeev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3558-3261>

Ёлшин Никита Дмитриевич / Nikita D. Yolsin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1050-5817>

Писарева Мария Михайловна, канд. биол. наук / Maria M. Pisareva, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1499-9957>

Едер Вероника Анатольевна, канд. биол. наук / Veronika A. Eder, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9970-3325>

Коржанова Маргарита / Margarita Korzhanova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2512-2517>

Ксенафонтов Андрей Дмитриевич / Andrey D. Ksenafontov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4532-6210>

Передерий Александр Александрович / Alexander A. Perederiy

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5961-1856>

Охлопкова Олеся Викторовна, канд. биол. наук / Olesia V. Ohlopkova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8214-7828>

Саушкина Людмила Александровна / Lyudmila A. Saushkina

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-2369-3767>

Шведова Евгения Владимировна, канд. биол. наук / Evgenia V. Shvedova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9229-3677>

Гришина Елена Анатольевна, д-р биол. наук, проф. / Elena A. Grishina, Dr. Sci. (Biol.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5621-8266>

Лioзнов Дмитрий Анатольевич, д-р мед. наук, проф. / Dmitry A. Lioznov, Dr. Sci. (Med.), Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3643-7354>

Статья поступила 07.11.2025

После доработки 18.03.2026

Принята к публикации 19.06.2026

Online first 12.08.2026

Received November 7, 2025

Revised March 18, 2026

Accepted June 19, 2026

Online first August 12, 2026

УДК 615.371

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-729>

Оригинальная статья | Original article



Инаktivация *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* при производстве гриппозных вакцин

Н.Н. Савина¹, М.Ш. Алиев¹, А.И. Реутский¹, Т.В. Горохова¹,
О.С. Бабкина¹, С.В. Панкратов², Н.Ю. Серова³

¹ Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства, ул. Свободы, д. 52, г. Красное Село, Санкт-Петербург, 198320, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», ул. Черниговская, д. 5, Санкт-Петербург, 196084, Российская Федерация

³ Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственное предприятие «Авивак», промзона Орлинская зона, д. 21, лит А, д. Горбунки, Ломоносовский район, Ленинградская область, 188502, Российская Федерация

✉ Савина Наталья Николаевна; n.n.savina@niivs.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. При производстве гриппозных вакцин используются куриные эмбрионы, что сопровождается рисками контаминации конечного продукта микоплазмами птиц *Mycoplasma gallisepticum* и *M. synoviae*, представляющими потенциальную опасность для человека. В связи с этим актуальной представляется оценка эффективности инаktivации указанных контаминантов на полупродуктах гриппозных вакцин с использованием инаktivаторов (β -пропиолактон, ультрафиолетовое облучение) и детергентов.

ЦЕЛЬ. Оценить динамику инаktivации *M. gallisepticum* и *M. synoviae* в полупродуктах гриппозных вакцин при воздействии β -пропиолактона, ультрафиолетового облучения и детергентов (н-октил- β -D-глюкопиранозид, тетрадецилтриметиламмоний бромид) для определения эффективности этих воздействий в условиях производства вакцин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе использовали *M. synoviae* штамм WVU1853 (ATCC) и *M. gallisepticum* (ФГБУ «ВГНКИ»). Для оценки динамики инаktivации проводили контаминацию полупродуктов гриппозных вакцин, содержащих вирус гриппа человека, культурами микоплазм в концентрации не менее 4 lg КОЕ/мл. Инаktivацию осуществляли при следующих условиях: 0,09% β -пропиолактон при температуре 4 °C в течение 12 ч; ультрафиолетовое облучение (мощность 60 Вт) при толщине слоя контаминированных полупродуктов $\leq 1,1$ мм в течение 5 мин; 0,98% н-октил- β -D-глюкопиранозид и 0,07% тетрадецилтриметиламмоний бромид при температуре 18 °C в течение 60 мин. Концентрацию микоплазм *M. gallisepticum* и *M. synoviae* в испытуемых образцах оценивали методом определения колониеобразующих единиц (КОЕ).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Сразу после внесения β -пропиолактона концентрация *M. gallisepticum* снижалась на $1,88 \pm 0,20$ lg КОЕ/мл, *M. synoviae* — на $2,17 \pm 0,37$ lg КОЕ/мл. Через 4 ч инаktivации жизнеспособные микоплазмы обоих видов не обнаруживались. При воздействии ультрафиолетового облучения жизнеспособные *M. gallisepticum* не обнаруживались через 1 мин, а *M. synoviae* — через 0,5 мин. Сразу после добавления детергентов (н-октил- β -D-глюкопиранозид или тетрадецилтриметиламмоний бромид) жизнеспособные *M. gallisepticum* и *M. synoviae* не выявлялись.

ВЫВОДЫ. Все исследованные типы инаktivации микоплазм при производстве гриппозных вакцин (β -пропиолактон, ультрафиолетовое облучение, н-октил- β -D-глюкопиранозид

и тетрадецилтриметиламмония бромид) обеспечивают снижение жизнеспособности *M. gallisepticum* и *M. synoviae* более чем на 4 lg КОЕ/мл. Описанные подходы к оценке динамики инактивации микоплазм птиц могут быть использованы для изучения устойчивости других контаминантов к различным способам инактивации и химическим реагентам.

Ключевые слова: микоплазмы; *Mycoplasma gallisepticum*; *Mycoplasma synoviae*; гриппозные вакцины; инактивация; β -пропиолактон; УФ-облучение; n-октил- β -D-глюкопиранозид; тетрадецилтриметиламмония бромид

Для цитирования: Савина Н.Н., Алиев М.Ш., Реутский А.И., Горохова Т.В., Бабкина О.С., Панкратов С.В., Серова Н.Ю. Инактивация *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* при производстве гриппозных вакцин. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026;26(3):349–358. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-729>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Существует потенциальный конфликт интересов в связи с аффилиацией авторов данной научной работы с ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» и ООО «Авивак». Однако при написании рукописи авторы руководствовались соображениями научной ценности полученного материала и заявляют о беспристрастности оценки полученных данных и отсутствии конфликта интересов.

Inactivation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* during influenza vaccine production

Natalya N. Savina¹ , Magomed Sh. Aliev¹ , Alexander I. Reutskiy¹ ,
Tamara V. Gorokhova¹ , Olga S. Babkina¹ , Sergei V. Pankratov² ,
Natalia Yu. Serova³ 

¹ Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Sera and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations, 52 Svobody St., Krasnoe Selo, Saint Petersburg 198320, Russian Federation

² Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, 5 Chernigovskaya St., Saint Petersburg 196084, Russian Federation

³ AVIVAC NPP LLC, 21A Orlinskaya zona, Gorbunki, Lomonosovskiy district, Leningrad region 188502, Russian Federation

✉ Natalya N. Savina; n.n.savina@niivs.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The use of chicken embryos in influenza vaccine production carries the risk of contaminating the final product with the avian mycoplasmas, *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*, which pose a potential hazard to humans. Therefore, evaluating the effectiveness of inactivating these contaminants in influenza vaccine intermediates using inactivators (β -propiolactone, ultraviolet irradiation) and detergents is important.

AIM. This study aimed to evaluate the inactivation dynamics of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* in influenza vaccine intermediates following exposure to β -propiolactone, ultraviolet irradiation, and detergents (n-octyl- β -D-glucopyranoside, tetradecyltrimethylammonium bromide) to determine their effectiveness under vaccine production conditions.

MATERIALS AND METHODS. *M. synoviae* strain WVU1853 (ATCC) and *M. gallisepticum* (VGNKI) were used. To assess inactivation dynamics, influenza vaccine intermediates containing human influenza virus were spiked with mycoplasma cultures at a concentration of at least 4 lg CFU/mL. Inactivation was performed under the following conditions: 0.09% β -propiolactone at 4 °C for 12 hours; ultraviolet irradiation (60 W) with a layer thickness of the contaminated intermediates ≤ 1.1 mm for 5 min; 0.98% n-octyl- β -D-glucopyranoside and 0.07% tetradecyltrimethylammonium bromide at 18 °C for 60 min. The concentrations of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* in the test samples were determined by the colony-forming unit (CFU) assay.

RESULTS. Immediately after β -propiolactone addition, the concentration of *M. gallisepticum* decreased by 1.88 ± 0.20 lg CFU/mL, and that of *M. synoviae* decreased by 2.17 ± 0.37 lg CFU/mL. After 4 hours of inactivation, no viable mycoplasmas of either species were detected. Under ultraviolet irradiation, viable *M. gallisepticum* were not detected after 1 min, and *M. synoviae* were not detected after 0.5 min. No viable *M. gallisepticum* or *M. synoviae* were detected immediately after the addition of detergents (n-octyl- β -D-glucopyranoside or tetradecyltrimethylammonium bromide).

CONCLUSIONS. All studied mycoplasma inactivation methods used in influenza vaccine production (β -propiolactone, ultraviolet irradiation, n-octyl- β -D-glucopyranoside, and tetradecyltrimethylammonium bromide) reduce the viability of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* by more than 4 lg CFU/mL. The described approaches for assessing the inactivation dynamics of avian mycoplasmas can be used to study the resistance of other contaminants to various inactivation methods and chemical reagents.

Keywords: mycoplasmas; *Mycoplasma gallisepticum*; *Mycoplasma synoviae*; influenza vaccines; inactivation; β -propiolactone; ultraviolet irradiation; n-octyl- β -D-glucopyranoside; tetradecyltrimethylammonium bromide

For citation: Savina N.N., Aliev M.Sh., Reutskiy A.I., Gorokhova T.V., Babkina O.S., Pankratov S.V., Serova N.Yu. Inactivation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* during influenza vaccine production. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026;26(3):349–358. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-729>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. There is a potential conflict of interest related to the authors' affiliation with Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Sera and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations of the Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, and AVIVAC LLC. However, when writing this paper, the authors were guided by considerations of the scientific value of the material obtained and declare impartiality in their data assessment and no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Производство гриппозных вакцин сопровождается рисками контаминации готовой продукции возбудителями зоонозных инфекций, в частности лейкозом птиц, аденовирусной инфекцией и микоплазмозом птиц, поскольку основным сырьем при производстве вакцины являются куриные эмбрионы. Для производства инактивированных гриппозных вакцин необходимо большое количество яиц, поэтому требование об использовании куриных эмбрионов, полученных от стад, свободных от патогенной микрофлоры (specific pathogen free, spf), практически нецелесообразно¹. Несмотря на то, что куриные эмбрионы должны быть получены из хозяйств, благополучных по возбудителям, патогенным для человека², риск контаминации сохраняется. Следовательно, необходимо доказать, что выбранный метод инактивации вируса гриппа обеспечивает также инактивацию других потенциально опасных для человека патогенов, включая микоплазмы птиц³.

У птиц обнаружено 23 вида микоплазм, из которых наиболее патогенными и распространенными являются *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae* и *M. meleagridis* [1]. Некоторые штаммы этих микоплазм сохраняют жизнеспособность на слизистой оболочке носа человека до 24 ч после экспериментальной инокуляции [2]. *M. gallisepticum* и *M. synoviae* являются единственными из контролируемых микоплазм у стад кур, свободных от специфической патогенной микрофлоры, используемых для производства и контроля качества вакцин согласно Европейской фармакопее, в связи с чем они считаются приемлемыми объектами для выполнения оценки контаминации вакцин против гриппа [3].

M. gallisepticum и *M. synoviae* могут распространяться как горизонтальным, так и вертикальным (трансовариальным) путем и хорошо выживают в аллантоисной жидкости и желтке куриного эмбриона [4]. Микоплазмы не имеют клеточной стенки, ограничены трехслойной

¹ Recommendations for the production and control of influenza vaccine (inactivated). Annex 3, TRS No 927. WHO. 2005.

² ГОСТ Р 70610-2022 Яйца куриные инкубационные для иммунобиологических производств.

ФС.3.3.1.0028.20 Вакцина гриппозная инактивированная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. 2023.

³ Recommendations for the production and control of influenza vaccine (inactivated). Annex 3, TRS No 927. WHO. 2005.

2.6.7. Mycoplasmas. European Pharmacopoeia. 11th ed. Suppl. 11.5. 2024.

Guideline on influenza vaccines – Quality module (EMA/CHMP/BWP/310834/2012 Rev.1). EMA. 2017.

Note for guidance on virus validation studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (EMA/CPMP/BWP/268/95). EMA. 1996.

мембраной, что обуславливает их неустойчивость к факторам внешней среды, где они погибают за короткий срок. Устойчивость микоплазм к способам инактивации зависит от используемых реагентов и условий [3, 5]. Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) выбранный метод инактивации должен обеспечивать инактивацию потенциально опасных для человека патогенов, включая микоплазмы птиц⁴.

Для расщепления вируса гриппа в производстве вакцин применяют формальдегид, β-пропиолактон (BPL) или ультрафиолетовое (УФ) облучение [6–8]. BPL инактивирует вирусы гриппа полнее и быстрее формалина, обеспечивая безопасность и антигенность вакцины. Выбор концентрации BPL (0,09%) основан на требованиях Европейской фармакопеи, производственных протоколах [9–11] и данных о том, что снижение концентрации BPL до 0,05% недостаточно для удаления микоплазменных контаминантов из богатых белком сред. Инкубация при температуре 4 °C резко уменьшает микоплазмостойкую активность BPL [3] и предпочтительна для снижения роста бионагрузки в процессе производства гриппозных вакцин.

Ультрафиолетовое облучение применяется как антимикробная мера более 100 лет; чувствительность вирусов гриппа к УФ не меняется, поэтому ожидается, что эффективность УФ в отношении новых штаммов вируса сохранится [12]. Выбор параметров УФ-облучения (мощность 60 Вт при толщине слоя контаминированных полупродуктов ≤1,1 мм) обусловлен конструктивными особенностями промышленных установок, используемых при производстве гриппозных вакцин.

Для расщепления вируса гриппа также используют детергенты: катионные (тетрадецилтриметиламмония бромид, цетилтриметиламмония бромид), анионные (дезоксихолат натрия, н-октил-β-D-глюкопиранозид), неионные (октоксинол 10, полисорбат 80) [8–10]. Микоплазмостойкая активность цетилтриметиламмония бромида, дезоксихолата натрия и октоксинола 10 была показана ранее [3]. Концентрации детергентов могут варьировать в зависимости от протоколов производства вакцин. Выбранные в работе концентрации являются наиболее распространенными в производстве гриппозных вакцин [13, 14].

Актуальность данной работы обусловлена распространением микоплазмоза птиц:

серопревалентность к возбудителю респираторного микоплазмоза птиц в хозяйствах яичного направления, откуда поступают куриные эмбрионы, за пятилетний период варьировала от 16,70 до 61,50%, к возбудителю инфекционного синюита – от 50,00 до 78,57%⁵.

Цель работы – оценить динамику инактивации *M. gallisepticum* и *M. synoviae* в полупродуктах гриппозных вакцин при воздействии β-пропиолактона, ультрафиолетового облучения и детергентов (н-октил-β-D-глюкопиранозид, тетрадецилтриметиламмония бромид) для определения эффективности этих воздействий в условиях производства вакцин.

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи: накопить штаммы *M. gallisepticum* и *M. synoviae* в концентрации не менее 4 lg КОЕ/мл; провести контаминацию полупродуктов гриппозных вакцин, содержащих вирус гриппа человека; оценить снижение жизнеспособности микоплазм при воздействии инактиваторов и детергентов, используемых при производстве гриппозных вакцин, эффективность которых ранее не изучалась.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

- *Mycoplasma synoviae*, штамм WVU1853 (ATCC 25204);
- *Mycoplasma gallisepticum*, штамм S6 (ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»);
- стандартный образец (СО) тест-штамма *Mycoplasma arginini* G230 (ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России);
- газогенераторная система Anaerocult C mini (Merck KGaA, Германия);
- детергент β-пропиолактон, BPL (Ferak Berlin, Германия);
- детергент н-октил-β-D-глюкопиранозид (OGP) (кат. № DO05161, Carbosynth, Англия);
- детергент тетрадецилтриметиламмоний бромид (TTAB) (кат. № 152109, MP Biomedicals, США).

Методы

Получение полупродуктов гриппозных вакцин

Получение вирусосодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ). 9–11-дневные куриные эмбрионы заражали актуальными рекомендованными ВОЗ вакцинными штаммами вируса гриппа человека (доза: 0,2 мл с инфекционной

⁴ Recommendations for the production and control of influenza vaccine (inactivated). Annex 3, TRS No 927. WHO. 2005.

⁵ Козлов ДА, Меньщикова АЭ, Брундакова ТН, Волков МС. Серологический мониторинг инфекций птиц микоплазменной этиологии на территории Российской Федерации (2016–2020 гг.). ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных». 2022.

активностью $10^{2,0}$ – $10^{4,5}$ ЭИД₅₀). Инкубацию проводили при 35 °С в течение 48 ч для вируса гриппа А и в течение 72 ч – для вируса гриппа В. После инкубации эмбрионы охлаждали и собирали ВАЖ [6, 15, 16].

Получение вирусных концентратов (ВК). ВАЖ фильтровали через каскад фильтров (диаметр пор 10, 6 и 1 мкм) с последующим концентрированием с использованием ультрафильтрационной установки (предел отсека 300 кДа). Далее ВАЖ ультрацентрифугировали в градиенте плотности сахарозы (60–20%) и собирали фракции 40–25% сахарозы. ВК разводили до 1,0 мг/мл (для УФ-облучения) и до 1,5 мг/мл (для обработки детергентами) [15, 16]. Для экспериментов с детергентами предварительно инактивировали вирус гриппа на стадии ВАЖ для моделирования процесса производства.

Культивирование *M. gallisepticum* и *M. synoviae*

Для исключения возможности контаминирования гриппозных вакцин потенциально опасными для человека патогенами необходимо обеспечить снижение нагрузки контаминанта не менее чем на 4 lg. Этот критерий (снижение на 4 lg и более) ранее использован в работах по инаktivации возбудителей лейкоза и аденовируса птиц [15, 16] и свидетельствует о выраженной эффективности в отношении исследуемого патогена⁶. Поэтому накапливали микоплазмы до концентрации ≥ 4 lg КОЕ/мл.

Для накопления и культивирования *M. gallisepticum* и *M. synoviae* использовали жидкую питательную среду на основе Mycoplasma Broth Base (HiMedia, Индия), лошадиной сыворотки (АО «НПО «Микроген», Россия), экстракта дрожжей (HiMedia, Индия), глюкозы (кат. № 143140, PanReac, Испания), оксациллина (ОАО «Синтез», Россия) и 1% фенолового красного (кат. № UVCH-5170, ООО «Невареактив», Россия)⁷. Проводили серийные десятикратные разведения. Для контроля процесса роста культуры использовалась неинокулированная пробирка с ростовой средой.

M. gallisepticum инкубировали в течение 7 сут в аэробных условиях при температуре 37 ± 1 °С (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия). Рост оценивали по мутности и изменению цвета среды с красного на желтый. В первых разведениях штамма *M. gallisepticum* наблюдали повышение

мутности и изменение цвета через 48–72 ч, в последующих пассажах – через 24–48 ч.

M. synoviae инкубировали в течение 14 сут при температуре 37 ± 1 °С. Повышение мутности первых разведений штамма наблюдали через 13–14 сут; цвет среды приобретал слабооранжевый оттенок.

Оценка динамики инаktivации

Оценку динамики инаktivации микоплазм осуществляли путем определения концентрации колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) *M. gallisepticum* и *M. synoviae* в отобранных в разные периоды времени пробах с использованием чашечного метода на жидкой питательной среде для накопления микоплазм с добавлением 1,3% агара⁸. Готовую плотную среду разливали по 7–9 мл в чашки Петри (диаметр 60 мм). Избыток влаги удаляли короткой инкубацией при 37 °С. Чашки хранили при температуре 2–8 °С до 14 сут.

Для оценки жизнеспособности бульонную культуру микоплазм (0,2 мл) наносили на агар и равномерно распределяли. Чашки переворачивали и помещали в термостат для инкубации. Показатель КОЕ/мл определяли поверхностным методом посева десятикратных разведений бульонной культуры на плотную питательную среду с последующей инкубацией и подсчетом колоний (каждая колония – из одной жизнеспособной клетки); из каждого разведения делали параллельные высева на несколько чашек.

Чашки инкубировали, используя газогенерирующие пакеты Anaerocult C mini (аэрофильные условия). Через 7 сут поверхность агара просматривали под микроскопом Eclipse E200 (Nicon, Япония; увеличение 40× и 100× в косопроходящем свете), определяли среднее количество колоний, выросших при посеве каждого разведения. Значение КОЕ/мл выражали в lg; снижение показателя рассчитывали как разность между lg КОЕ/мл до и после инаktivации.

Оценка инаktivации микоплазм β -пропиолактоном в вирусосодержащей аллантоисной жидкости.

Эксперимент проводили на трех сериях ВАЖ [15, 16]. Исследовательские образцы контаминировали *M. gallisepticum* или *M. synoviae*. Далее проводили инаktivацию BPL: к 45,0 мл ВАЖ добавляли 5,0 мл культуры микоплазм, 2,5 М NaCl (0,23 М) и BPL (до конечной концентрации 0,09%). В образцы положительного контроля вместо

⁶ Note for guidance on virus validation studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses (EMA/CPMP/BWP/268/95). EMA. 1996.

⁷ ОФС.1.7.2.0031.15 Испытание на присутствие микоплазм. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. 2023.

⁸ ОФС.1.7.2.0008.15 Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. 2023.

BPL вносили фосфатно-буферный раствор (ФБР, pH 7,2–7,6, кат. № В60201, ООО «Эко-сервис», Россия) в объеме, равном BPL. Образцы отрицательного контроля готовили аналогично исследовательским образцам, вместо культуры микоплазм вносили 5,0 мл ФБР. Далее все образцы выдерживали при температуре 4 °С в течение 12 ч с перемешиванием в первые 2 ч. Отбор образцов проводили через 0, 4, 6, 10 и 12 ч после сведения всех компонентов. Все эксперименты выполняли в трех повторностях. Расчет доверительного интервала проводили с использованием коэффициента Стьюдента при доверительной вероятности 95%.

Оценка инаktivации микоплазм в вирусных концентратах с помощью ультрафиолетового облучения. Эксперимент проводили на трех сериях ВК [15, 16]. Исследовательские образцы контаминировали *M. gallisepticum* или *M. synoviae*. Далее проводили УФ-облучение с помощью бактерицидных ламп (15W G13 G15T8/OF, Россия). К 36,0 мл ВК добавляли 4,0 мл культуры микоплазм. Каждый образец разливали по 7 мл в пять чашек Петри (диаметр 9 см, толщина слоя ≤1,1 мм). Чашки помещали под установкой из четырех ламп (общая мощность 60 Вт) на расстоянии 20 см, изолировали фольгой для минимизации рассеивания УФ-облучения. Инаktivацию проводили при температуре 18 °С при облучении по следующей схеме: 1-я чашка — 0 с; 2-я чашка — 30 с; 3-я чашка — 1 мин; 4-я чашка — 2 мин; 5-я чашка — 5 мин. В качестве положительного контроля служили чашки с исследовательским образцом без облучения. В отрицательном контроле вместо культур микоплазм добавляли 4,0 мл ФБР. Эксперименты выполняли в трех повторностях. Доверительный интервал рассчитывали с использованием коэффициента Стьюдента при доверительной вероятности 95%.

Оценка динамики инаktivации микоплазм *n*-октил-β-D-глюкопиранозидом в вирусных концентратах. Эксперимент проводили на трех сериях ВК. Исследовательские образцы ВК с концентрацией белка 1,5 мг/мл контаминировали *M. gallisepticum* или *M. synoviae*. К 13,5 мл ВК добавляли 1,5 мл культуры микоплазм и 1,5 мл ФБР с 162 мг OGP. К положительному контролю вместо OGP добавляли 1,5 мл ФБР. К отрицательному контролю вместо культур микоплазм добавляли 1,5 мл ФБР. Далее образцы инкубировали при температуре 18 °С в течение 60 мин с периодическим отбором проб для определения КОЕ. Эксперименты выполняли в трех повторностях. Доверительный интервал рассчитывали с использованием коэффициента Стьюдента при доверительной вероятности 95%.

Оценка динамики инаktivации микоплазм тетрадецилтриметиламмоний бромидом в вирусных концентратах. Исследовательские образцы ВК (концентрация белка 1,5 мг/мл) контаминировали *M. gallisepticum* или *M. synoviae*. К 13,5 мл ВК добавляли 1,5 мл культуры микоплазм и 0,1 мл ФБР с 10,0 мг ТТАВ. К положительному контролю вместо ТТАВ добавляли 1,5 мл ФБР. К отрицательному контролю вместо культур микоплазм добавляли 1,5 мл ФБР. Эксперименты выполняли в трех повторностях. Доверительный интервал рассчитывали с использованием коэффициента Стьюдента при доверительной вероятности 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полная инаktivация микоплазм *M. gallisepticum* и *M. synoviae* в ВАЖ под действием BPL с концентрацией 0,09% достигалась за 4 ч (табл. 1).

После воздействия УФ-облучения полная инаktivация *M. gallisepticum* в вирусных концентратах происходила через 1 мин, *M. synoviae* — через 30 с (табл. 2).

Под влиянием детергентов OGP (соотношение белок:детергент — 1:8) и ТТАВ (соотношение 1:0,5) полная инаktivация *M. gallisepticum* и *M. synoviae* в вирусных концентратах происходила мгновенно (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

После внесения BPL в контаминированную ВАЖ в первые минуты контакта жизнеспособность *M. gallisepticum* снижалась на $1,88 \pm 0,41 \lg$ КОЕ/мл, а *M. synoviae* — на $2,17 \pm 0,37 \lg$ КОЕ/мл (табл. 1). Инкубация контаминированных ВАЖ с BPL в холодильной камере при температуре 4 °С в течение 4 ч приводила к снижению жизнеспособности *M. gallisepticum* на $6,53 \pm 0,08 \lg$ КОЕ/мл, а *M. synoviae* — на $5,70 \pm 0,09 \lg$ КОЕ/мл (табл. 4).

УФ-облучение концентратов вируса гриппа с концентрацией белка не более 1 мг/мл за 1 мин экспозиции приводило к снижению количества жизнеспособных *M. gallisepticum* на $6,67 \pm 0,01 \lg$ КОЕ/мл, за 0,5 мин экспозиции с *M. synoviae* на $5,70 \pm 0,09 \lg$ КОЕ/мл (табл. 4).

Согласно данным проведенных ранее исследований [15, 16], снижение титра аденовируса и вируса лейкоза на 4 lg под действием BPL происходило через 10 и 12 ч соответственно, а под действием УФ-облучения — через 5 мин (табл. 4). Наши результаты согласуются с данными предыдущих исследований [3], в которых установлено, что 22 вида микоплазм, включая птичьих микоплазмы *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae* и *Acholeplasma laidlawii*, могут быть полностью инаktivированы в течение 3–24 ч при комнатной

Таблица 1. Динамика инаktivации *M. gallisepticum* и *M. synoviae* под действием β-пропиолактона (BPL) (количество микроорганизмов, lg КОЕ/мл)

Table 1. Inactivation kinetics of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* under the action of β-propiolactone (lg CFU/mL)

Образец Sample	Наличие микоплазмы Presence of mycoplasma	Концентрация BPL, % Concentration of BPL, %	lg КОЕ/мл в образцах, отобранных в указанные моменты времени, ч lg CFU/mL in samples collected at the indicated time points, h				
			0	4	6	10	12
M. gallisepticum							
ИО / TS	+	0,09	4,66±0,17	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d
К+ / C+	+	0	6,54±0,04	6,53±0,08	6,59±0,05	6,59±0,04	6,59±0,06
К- / C-	-	0,09	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d
M. synoviae							
ИО / TS	+	0,09	3,50±0,31	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d
К+ / C+	+	0	5,72±0,12	5,70±0,09	5,71±0,04	5,70±0,05	5,63±0,07
К- / C-	-	0,09	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d

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

Примечание. ИО — исследовательские образцы вируссодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ), контаминированные микоплазмой; К+ — положительные контрольные образцы ВАЖ, не инаktivированные BPL; К- — отрицательные контрольные образцы ВАЖ, не контаминированные микоплазмой; КОЕ — колониеобразующая единица; н/в — жизнеспособные микоплазмы не выявлены; «+» — присутствие контаминанта; «-» — отсутствие контаминанта. Доверительный интервал рассчитывали с использованием коэффициента Стьюдента при доверительной вероятности 95%.

Note. BPL, β-propiolactone; TS, test samples of virus-containing allantoic fluid (VAF) contaminated with mycoplasma; C+, positive control samples of VAF not inactivated with BPL; C-, negative control samples of VAF not contaminated with mycoplasma; CFU, colony-forming unit; n/d, viable mycoplasmas not detected; +, presence of contaminant; -, absence of contaminant. Confidence intervals were calculated using Student's *t*-test (95% confidence level).

Таблица 2. Динамика инаktivации *M. gallisepticum* и *M. synoviae* под действием ультрафиолетового (УФ) облучения при толщине слоя ≤1,1 мм (количество микроорганизмов, lg КОЕ/мл)

Table 2. Inactivation kinetics of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* under ultraviolet (UV) irradiation at a layer thickness of no more than 1.1 mm (lg CFU/mL)

Образец Sample	Наличие микоплазмы Presence of mycoplasma	Мощность, Вт Power, W	lg КОЕ/мл в образцах, отобранных в указанные моменты времени, мин lg CFU/mL in samples collected at the indicated time points, min				
			0	0,5	1	2	5
M. gallisepticum							
ИО / TS	+	60	6,67±0,09	3,36±0,37	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d
К+ / C+	+	0	6,67±0,01	н/и / n/a	н/и / n/a	н/и / n/a	н/и / n/a
К- / C-	-	60	н/в / n/d	н/и / n/a	н/и / n/a	н/и / n/a	н/и / n/a
M. synoviae							
ИО / TS	+	60	5,68±0,08	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d
К+ / C+	+	0	5,70±0,09	н/и / n/a	н/и / n/a	н/и / n/a	н/и / n/a
К- / C-	-	60	н/в / n/d	н/и / n/a	н/и / n/a	н/и / n/a	н/и / n/a

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

Примечание. ИО — исследовательские образцы вируссодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ), контаминированные микоплазмой; К+ — положительные контрольные образцы ВАЖ, не инаktivированные УФ; К- — отрицательные контрольные образцы ВАЖ, не контаминированные микоплазмой; КОЕ — колониеобразующая единица; н/в — жизнеспособные микоплазмы не выявлены; н/и — не исследовано; «+» — присутствие контаминанта; «-» — отсутствие контаминанта. Доверительный интервал рассчитывали с использованием коэффициента Стьюдента при доверительной вероятности 95%.

Note. TS, test samples of virus-containing allantoic fluid (VAF) contaminated with mycoplasma; C+, positive control samples of VAF not inactivated with UV; C-, negative control samples of VAF not contaminated with mycoplasma; CFU, colony-forming unit; n/d, viable mycoplasmas not detected; n/a, not analysed; +, presence of contaminant; -, absence of contaminant. Confidence intervals were calculated using Student's *t*-test (95% confidence level).

Таблица 3. Динамика инактивации *M. gallisepticum* и *M. synoviae* под действием детергентов н-октил-β-D-глюкопиранозида (OGP) и тетрадецилтриметиламмоний бромида (TTAB) (количество микроорганизмов, lg КОЕ/мл)

Table 3. Inactivation kinetics of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* under the action of the detergents n-octyl-β-D-glucopyranoside (OGP) and tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) (lg CFU/mL)

Образец Sample	Наличие микоплазмы Presence of mycoplasma	Концентрация OGP, % Concentration of OGP, %	Концентрация ТТАВ, % Concentration of ТТАВ, %	lg КОЕ/мл в образцах, отобранных в указанные моменты времени, мин lg CFU/mL in samples collected at the indicated time points, min		
				0	30	60
M. gallisepticum						
ИО / TS	+	0,98	0	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d
K+ / C+	+	0	0	6,68±0,05	6,67±0,01	6,64±0,01
K- / C-	-	0,98	0	н/в / n/d	н/и / n/a	н/и / n/a
ИО / TS	+	0	0,07	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d
K+ / C+	+	0	0	6,71±0,01	6,69±0,06	6,67±0,08
K- / C-	-	0	0,07	н/в / n/d	н/и / n/a	н/и / n/a
M. synoviae						
ИО / TS	+	0,98	0	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d
K+ / C+	+	0	0	5,70±0,04	5,69±0,07	5,66±0,10
K- / C-	-	0,98	0	н/в / n/d	н/и / n/a	н/и / n/a
ИО / TS	+	0	0,07	н/в / n/d	н/в / n/d	н/в / n/d
K+ / C+	+	0	0	5,16±0,09	5,15±0,10	5,14±0,14
K- / C-	-	0	0,07	н/в / n/d	н/и / n/a	н/и / n/a

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

Примечание. ИО — исследовательские образцы вирусосодержащей аллантоической жидкости (ВАЖ), загрязненные микоплазмой; К+ — положительные контрольные образцы ВАЖ, не инактивированные (контроль без детергентов); К- — отрицательные контрольные образцы ВАЖ, не загрязненные микоплазмой; КОЕ — колониеобразующая единица; н/в — жизнеспособные микоплазмы не выявлены; н/и — не исследовано; «+» — присутствие загрязнителя; «-» — отсутствие загрязнителя. Доверительный интервал рассчитывали с использованием коэффициента Стьюдента при доверительной вероятности 95%.

Note. TS, test samples of virus-containing allantoic fluid (VAF) contaminated with mycoplasma; C+, positive control samples of VAF not inactivated (no detergent control); C-, negative control samples of VAF not contaminated with mycoplasma; CFU, colony-forming unit; n/d, viable mycoplasmas not detected; n/a, not analysed; +, presence of contaminant; -, absence of contaminant. Confidence intervals were calculated using Student's *t*-test (95% confidence level).

Таблица 4. Результаты инактивации патогенов под действием ультрафиолетового (УФ) облучения и β-пропиолактона

Table 4. Results of pathogen inactivation by ultraviolet (UV) irradiation and β-propiolactone

Патоген Pathogen		β-пропиолактон β-propiolactone		УФ-облучение Ultraviolet irradiation	
		Снижение титра, lg Titer reduction, lg	Время инактивации, ч Inactivation time, h	Снижение титра, lg Titer reduction, lg	Время инактивации, мин Inactivation time, min
Микоплазма Mycoplasma	<i>M. gallisepticum</i>	6,53±0,08	4	6,67±0,01	1
	<i>M. synoviae</i>	5,70±0,09	4	5,70±0,09	0,5
Аденовирус Adenovirus	CELO	4,12±0,06	10	4,69±0,89	5
	Fontes	4,20±0,19	10	4,44±1,06	5
Вирус лейкоза птиц Avian leukosis virus	RAV-1	4,61±0,46	12	4,22±0,31	5
	RAV-2	4,33±0,33	12	4,33±0,48	5

Таблица составлена авторами по собственным данным с дополнениями согласно [1, 2] / The table was prepared by the authors using their own data supplemented according to [1, 2]

температуре в среде для микоплазм, содержащей 0,2% формальдегида и 0,1% BPL. Инактивация *M. gallisepticum* ATCC 19610 с использованием 0,05% BPL в полупродукте гриппозных вакцин

при комнатной температуре достигалась за 3 ч на 8 lg КОЕ/мл.

Сопоставление с данными литературы по влиянию УФ-облучения на микоплазмы

затруднено из-за различия параметров УФ-облучения или использования других типов образцов и микоплазм. Так, в работе R.B. Kundsин [17] показано, что летальное действие УФ-облучения (лампа General Electric с горячим катодом G 15 T8, излучающая 25 мкВт на см² на 1 м при 90% выходной мощности при 2537 А) на аэрозоли микоплазм (*M. hominis*, *M. pharyngis*, *M. pneumoniae*) в воздухе являлось мгновенным и чрезвычайно эффективным (99,9%).

В исследовании М. Mizuno с соавт. [18] в отношении высушенной культуры *M. orale* (6 lg КОЕ/200 мкл), помещенной в бокс, оснащенный бактерицидной лампой UV-C мощностью 15 Вт (Sankyo Denki Co., Канагава, Япония), показана эффективная инаktivация в течение 20 мин, но ее динамика продемонстрирована не была. В другом исследовании [19] описан инновационный подход к инаktivации *M. gallisepticum* с использованием гидрофобного фотоиндуцированного алкилирующего зонда 1,5-йодонафтилазида, при котором обработка культуры в середине экспоненциальной фазы (0,2 мг белка/мл) с последующим УФ-облучением (310–380 нм) приводила к полной утрате ее жизнеспособности. Однако использование только УФ-облучения безозоновой ртутной дуговой лампой мощностью 100 Вт с собирающей линзой и фильтром (310 нм) на расстоянии 18 см в течение 2 мин оказало незначительное влияние на жизнеспособность *M. gallisepticum* — снижение на 2–3 lg КОЕ/мл через 4 мин облучения.

В нашем исследовании показано, что оба детергента (OGP и ТТАВ) инаktivировали микоплазмы птиц в первые минуты после начала контакта. Для сравнения, по данным предыдущих исследований [15] снижение титра аденовируса под действием детергентов (OGP и ТТАВ) на 1 lg бляшкообразующих единиц на 1 мл происходило через 1 ч.

В работе S.A. David с соавт. [3] катионный детергент цетилтриметиламмоний бромид (0,075–0,15%) почти сразу инаktivировал все тестированные микоплазмы, включая *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, аналогично ТТАВ (0,07%) (табл. 3). Анионный детергент дезоксихолат натрия (0,5%) мгновенно инаktivировал протестированные микоплазмы, включая *M. gallisepticum*, *M. synoviae* [3], аналогично OGP (0,98%) (табл. 3).

Таким образом, BPL, УФ-облучение, ТТАВ и OGP эффективны в отношении микоплазм птиц *M. gallisepticum* и *M. synoviae*. С учетом данных исследований по инаktivации аденовирусов и вируса лейкоза птиц [15, 16] можно заключить, что для обеспечения должного уровня безопасности при производстве гриппозных вакцин необходимо проводить инаktivацию 0,09% BPL не менее 12 ч, а УФ-облучением — не менее 5 мин. Стадия расщепления вируса гриппа детергентами дополнительно снижает инфекционную нагрузку [15, 16]. Таким образом, согласно результатам данной работы и предыдущих исследований [15, 16] при производстве гриппозных вакцин микоплазмы птиц оказались наименее устойчивыми среди исследованных контаминантов, а самым устойчивым контаминантом являлся возбудитель лейкоза птиц.

ВЫВОДЫ

1. Способы инаktivации вируса гриппа при производстве гриппозных вакцин (β-пропиолактон и УФ-облучение) эффективны в отношении микоплазм птиц *M. gallisepticum* и *M. synoviae*. Снижение жизнеспособности микоплазм более чем на 4 lg КОЕ/мл достигается при следующих условиях: при обработке вирусосодержащей аллантоисной жидкости 0,09% β-пропиолактоном при температуре 4 °С — за 4 ч для *M. gallisepticum* и *M. synoviae*; при воздействии УФ-облучения (60 Вт) концентрат вируса гриппа с концентрацией белка ≤1 мг/мл — за 0,5 мин для *M. gallisepticum* и за 1 мин для *M. synoviae*.
2. Детергенты н-октил-β-D-глюкопиранозид (0,98%) и тетрадецилтриметиламмоний бромид (0,07%), используемые в производстве гриппозных вакцин, гарантированно снижают жизнеспособность микоплазм птиц не менее чем на 4 lg КОЕ/мл практически сразу после внесения.
3. Описанные в работе подходы к оценке динамики инаktivации микоплазм птиц при производстве гриппозных вакцин могут быть использованы для изучения устойчивости других контаминантов к различным способам инаktivации и химическим реагентам.

Литература/References

1. Mugunthan SP, Kannan G, Chandra HM, Paital B. Infection, transmission, pathogenesis and vaccine development against *Mycoplasma gallisepticum*. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(2):469. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020469>
2. Christensen NH, Yavari CA, McBain AJ, Bradbury JM. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. *Avian Pathol.* 1994;23(1):127–43. <https://doi.org/10.1080/03079459408418980>
3. David SA, Volokhov DV, Ye Z, Chizhikov V. Evaluation of *Mycoplasma* inactivation during production of biologics: egg-based viral vaccines as a model. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(9):2718–28. <https://doi.org/10.1128/AEM.02776-09>
4. Clark MI. Management of breeding in small poultry production units. In: Noakes DE, Parkinson TJ, England G, eds. *Veterinary reproduction and obstetrics*. 10th ed. Saunders Ltd; 2019. P. 526–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-7233-8.00030-6>
5. Лыско СБ. Способы обеззараживания инкубационных яиц

- от микоплазм. Студенческая научно-практическая конференция «Методы повышения эффективности инновационных исследований в регионах СКФО». Грозный; 2023. С. 107–12. Lysko SB. Methods for disinfecting hatching eggs from mycoplasmas. *Student scientific and practical conference "Methods for increasing the efficiency of innovative research in the regions of the North Caucasus Federal District"*. Grozny; 2023. P. 107–12 (In Russ.). <https://doi.org/10.36684/116-1-2023-107-112>
6. Haussmann C, Hauschild F, Jobst B, Novartis AG. Improvements in preparation of influenza virus vaccine antigens. Patent of the United States No. US6986808P; 2008.
 7. Burt DS, Jones DH, Lowell GH, et al. Proteosome influenza vaccine. Patent of the United States No. US18247600P; 2000.
 8. Трухин ВП, Евтушенко АЭ, Красильников ИВ и др. Способ получения антигена или антигенов для производства противогриппозной вакцины и вакцина на его основе. Патент Российской Федерации № RU2019118695A; 2019. Trukhin VP, Evtushenko AE, Krasilnikov IV, et al. A method for obtaining an antigen or antigens for the production of an influenza vaccine and a vaccine based on it. Patent of the Russian Federation No. RU2019118695A; 2019 (In Russ.). EDN: [EIGFSL](https://doi.org/10.36684/116-1-2023-107-112)
 9. Shi H, Ross TM. Inactivated recombinant influenza vaccine: The promising direction for the next generation of influenza vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2024;23(1):409–18. <https://doi.org/10.1080/14760584.2024.2333338>
 10. Трухин ВП, Евтушенко АЭ, Савина НН и др. Способ получения концентрата вируса гриппа для получения вакцины. Патент Российской Федерации № RU2839314 C2; 2025. Trukhin VP, Evtushenko AE, Savina NN, et al. Method for producing an influenza virus concentrate for producing a vaccine. Patent of the Russian Federation No. RU2839314 C2; 2025 (In Russ.). EDN: [SFAAZE](https://doi.org/10.36684/116-1-2023-107-112)
 11. Kon TC, Onu A, Berbecia L, et al. Influenza vaccine manufacturing: Effect of inactivation, splitting and site of manufacturing. Comparison of influenza vaccine production processes. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150700>
 12. Hessling M, Gierke AM, Sicks B, et al. Sensitivity of influenza virus to ultraviolet irradiation. *GMS Hyg Infect Control*. 2022;17:Doc20. <https://doi.org/10.3205/dgkh000423>
 13. Красильников ИВ, Иванов АВ, Белякова ОВ и др. Способ получения тетравалентной субъединичной противогриппозной вакцины. Патент Российской Федерации № RU2740751 C1; 2021. Krasilnikov IV, Ivanov AV, Belyakova OV, et al. Method for producing a tetraivalent subunit influenza vaccine. Patent of the Russian Federation No. RU2740751 C1; 2021 (In Russ.). EDN: [FMGRUJ](https://doi.org/10.36684/116-1-2023-107-112)
 14. Алсынбаев ММ, Загидуллин НВ, Кедик СА. Вакцина против гриппа и способ ее получения. Патент Российской Федерации № RU2446824 C2; 2012. Alsynbaev MM, Zagidullin NV, Kedik SA. Influenza vaccine and method for its production. Patent of the Russian Federation No. RU2446824 C2; 2012 (In Russ.). EDN: [GUUJYT](https://doi.org/10.36684/116-1-2023-107-112)
 15. Савина НН, Екимов АА, Трухин ВП и др. Оценка методов инактирования аденовируса птиц при производстве гриппозных вакцин. *Экстремальная биомедицина*. 2021;23(3):84–9. Savina NN, Ekimov AA, Trukhin VP, et al. Evaluation of avian adenovirus inactivation methods used in the production of influenza vaccines. *Extreme Medicine*. 2021;23(3):84–9 (In Russ.). <https://doi.org/10.47183/mes.2021.032>
 16. Савина НН, Екимов АА, Шуклина МА и др. Оценка методов инактирования вируса лейкоза птиц при производстве гриппозных вакцин. *Экстремальная биомедицина*. 2022;24(4):60–5. Savina NN, Ekimov AA, Trukhin VP, et al. Evaluation of methods of avian leucosis virus inactivation in production of influenza vaccines. *Extreme Medicine*. 2022;24(4):60–5 (In Russ.). <https://doi.org/10.47183/mes.2022.047>
 17. Kunds RB. Characterization of *Mycoplasma* aerosols as to viability, particle size, and lethality of ultraviolet irradiation. *J Bacteriol*. 1966;91(3):942–4. <https://doi.org/10.1128/jb.91.3.942-944.1966>
 18. Mizuno M, Kimbara S, Ichise H, et al. Cleaning methods for biosafety cabinet to eliminate residual mycoplasmas, viruses, and endotoxins after changeover. *Regen Ther*. 2025;28:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2024.11.020>
 19. Atalla H, Lysnyansky I, Raviv Y, Rottem S. *Mycoplasma gallisepticum* inactivated by targeting the hydrophobic domain of the membrane preserves surface lipoproteins and induces a strong immune response. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120462>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Н.Н. Савина** — дизайн исследования, анализ данных, интерпретация результатов, формулировка выводов, написание и редактирование текста рукописи; **М.Ш. Алиев** и **А.И. Реутский** — работа с источниками литературы, написание текста рукописи; **Т.В. Горохова** и **О.С. Бабкина** — производство полупродуктов гриппозных вакцин для исследования, координация работы; **С.В. Панкратов** — разработка плана исследований, оформление результатов по определению инактивирующей способности химических и физических факторов на *M. gallisepticum* и *M. synoviae*; **Н.Ю. Серова** — накопление культур *M. gallisepticum* и *M. synoviae*, определение КОЕ микоплазм.

Использование генеративного искусственного интеллекта. Авторы заявляют, что не использовали генеративный ИИ при подготовке рукописи.

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **N.N. Savina** contributed to the study design, data analysis, interpretation of results, formulation of conclusions, and writing and editing of the manuscript. **M.Sh. Aliev** and **A.I. Reutskiy** searched and reviewed the literature and drafted the manuscript. **T.V. Gorokhova** and **O.S. Babkina** produced influenza vaccine intermediates for the study and coordinated the work. **S.V. Pankratov** developed the research plan and compiled the results on the inactivating capacity of chemical and physical factors against *M. gallisepticum* and *M. synoviae*. **N.Yu. Serova** propagated *M. gallisepticum* and *M. synoviae* cultures and determined mycoplasma CFU.

Use of generative artificial intelligence. The authors declare that no generative AI was used during the preparation of this manuscript.

Об авторах / Authors

Савина Наталья Николаевна / Natalya N. Savina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3670-5614>

Алиев Магомед Шахбаддин оглы / Magomed Sh. Aliev

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2435-6114>

Реутский Александр Игоревич / Alexander I. Reutskiy

ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-8640-9766>

Горохова Тамара Викторовна / Tamara V. Gorokhova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-6697-169X>

Бабкина Ольга Сергеевна / Olga S. Babkina

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-4590-5961>

Панкратов Сергей Вячеславович, канд. вет. наук, доцент / Sergei V. Pankratov, Cand. Sci. (Vet.), Assoc. Prof.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6824-1503>

Серова Наталья Юрьевна, канд. вет. наук / Natalia Yu. Serova, Cand. Sci. (Vet.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2121-2048>

Поступила 23.09.2025

После доработки 06.05.2026

Принята к публикации 19.06.2026

Online first 27.08.2026

Received September 23, 2025

Revised May 6, 2026

Accepted June 19, 2026

Online first August 27, 2026



Контроль качества мРНК-вакцин: рекомендации производителям

Е.В. Мельникова

Quality control of mRNA vaccines: recommendations for manufacturers

Ekaterina V. Melnikova

Кандидат биологических наук
Начальник лаборатории биомедицинских клеточных продуктов
Заместитель председателя Экспертной панели по унификации требований
к качеству мРНК-вакцин

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный
центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва,
127051, Российская Федерация

✉ Мельникова Екатерина Валерьевна; melnikovaev@expmed.ru

мРНК-вакцины на основе липидных нано-частиц относятся к инновационным лекарственным препаратам, разрабатываемым для профилактики инфекционных и лечения онкологических заболеваний. Программа контроля качества таких препаратов соответствует требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации: ОФС.1.9.1.0001.18 «Генотерапевтические лекарственные препараты», ОФС.1.7.1.0007 «Лекарственные средства, получаемые с использованием технологии рекомбинантной ДНК», ОФС.1.4.1.0007 «Лекарственные формы для парентерального применения», а также Фармакопеи ЕАЭС: 2.5.3.4 «Лекарственные препараты для парентерального применения»,

«Лекарственные средства, получаемые с использованием технологии рекомбинантной ДНК» (проект). Указанные требования гармонизированы с рекомендациями Европейского директората по качеству лекарственных средств и здравоохранения (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, EDQM) и Европейской фармакопеи¹.

Программа контроля качества включает контроль исходных материалов (банк клеток, ДНК), промежуточных продуктов (мРНК, липидные наночастицы) и готового лекарственного препарата (табл. 1–3). Программа может быть использована разработчиками и производителями мРНК-вакцин, а также контрольными лабораториями.

Таблица 1. Показатели качества исходных материалов

Главный банк клеток (бактериальных)	Рабочий банк клеток (если применимо)	Линеаризованная плазмидная ДНК
- Микробиологическая чистота культуры - Литические и лизогенные бактериофаги - Жизнеспособность - Сохранение/наличие маркера(ов) клеточной линии - Идентичность штамма (фенотип) - Идентичность штамма (генотип) - Идентичность плазмиды - Целостность плазмиды - Количество копий плазмиды	- Микробиологическая чистота культуры - Литические и лизогенные бактериофаги - Жизнеспособность - Сохранение/наличие маркера(ов) клеточной линии - Концентрация ДНК - Идентичность плазмиды - Целостность плазмиды - Количество копий плазмиды	- Описание - Концентрация ДНК - Пирогенность (Тест активации моноцитов и/или Бактериальные эндотоксины) - Остаточные белки клеток хозяина Дополнительные характеристики: - Чистота - Идентичность плазмиды - Целостность поли(А)-хвоста - Эффективность линеаризации - Остаточная ДНК клеток хозяина - Остаточная РНК клеток хозяина - Биологическая нагрузка - Рестрикционный анализ - Остаточное содержание канамицина - Проводимость - Стерильность - Микоплазма - pH

¹ Human vaccines: Guideline for mRNA vaccines produced with LNPs. EU Official Control Authority Batch Release. 2026. 5.36. mRNA vaccines for human use. European Pharmacopoeia, 12th ed., Suppl. 12.1. 2026.

Таблица 2. Показатели качества на этапе производства (промежуточные этапы)

мРНК	Липидные наночастицы (ЛНЧ) (если применимо)	Промежуточный продукт (если применимо)	Конечный промежуточный продукт (если применимо)
- Описание - Идентичность кодирующей РНК - Содержание (концентрация РНК) - Целостность/чистота РНК - Наличие 5'-кэп - Целостность поли(А)-хвоста - pH - Пирогенность (Тест активации моноцитов и/или Бактериальные эндотоксины) - Биологическая нагрузка Дополнительные характеристики: - Примеси РНК - Остаточная ДНК-матрица - Остаточная двухцепочечная РНК - Остаточные белки клеток хозяина - Активность	- Описание - Идентификация липидных компонентов для каждого образца - Содержание липидных компонентов для каждого образца - Родственные примеси, связанные с липидами - Размер ЛНЧ - Полидисперсность ЛНЧ - pH - Осмоляльность - Остаточные органические растворители - Пирогенность (Тест активации моноцитов и/или Бактериальные эндотоксины) - Биологическая нагрузка	- Описание - pH - Содержание (концентрация) РНК - Доля инкапсулированной мРНК - Чистота РНК - Осмоляльность - Размер ЛНЧ - Полидисперсность ЛНЧ - Биологическая нагрузка Дополнительные характеристики: - Идентификация кодируемой РНК - Примеси РНК - Содержание липидных компонентов для каждого образца - Родственные примеси, связанные с липидами - Идентификация липидных компонентов каждого образца - Пирогенность (Тест активации моноцитов и/или Бактериальные эндотоксины) - Экспрессия <i>in vitro</i>	- Размер ЛНЧ - Полидисперсность ЛНЧ - Доля инкапсулированной мРНК - Идентичность липидов - Чистота - Пирогенность (Тест активации моноцитов и/или Бактериальные эндотоксины) - Биологическая нагрузка

Таблица 3. Показатели качества готового продукта

Готовый продукт	
- Описание - Видимые механические включения - pH - Осмоляльность - Размер ЛНЧ - Полидисперсность ЛНЧ - Содержание липидных компонентов для каждого липида - Идентичность липидных компонентов для каждого липида - Доля инкапсулированной мРНК - Содержание (концентрация) РНК (общее и содержание/соотношение каждой, если мРНК несколько) - Идентичность кодированной последовательности РНК - Целостность/чистота РНК - Пирогенность (Тест активации моноцитов и/или Бактериальные эндотоксины) - Стерильность (с указанием объема исследуемого образца) Дополнительно для лиофилизированных форм: - Содержание воды - Описание до и после восстановления - Время восстановления	Другие определяемые показатели в зависимости от типа мРНК вакцины и особенностей процесса производства: - Родственные примеси, связанные с липидами* - Извлекаемый объем - Экспрессия мРНК <i>in vitro</i> – Биологический тест на клеточной линии - Трансляция <i>in vitro</i> - Примеси РНК* - Остаточные органические растворители - Заряд - Общее содержание липидов - Соотношение липидов и мРНК - Однородность дозирования

Примечание. * могут определяться на промежуточных продуктах.

Настоящие рекомендации предназначены производителям лекарственных препаратов на основе мРНК и содержат систематизирован-

ный перечень показателей качества, контролируемых на всех этапах – от исходных материалов до готового продукта.

Об авторах / Authors

Мельникова Екатерина Валерьевна, канд. биол. наук / Ekaterina V. Melnikova, Cand. Sci (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9585-3545>

Поступила 15.09.2026

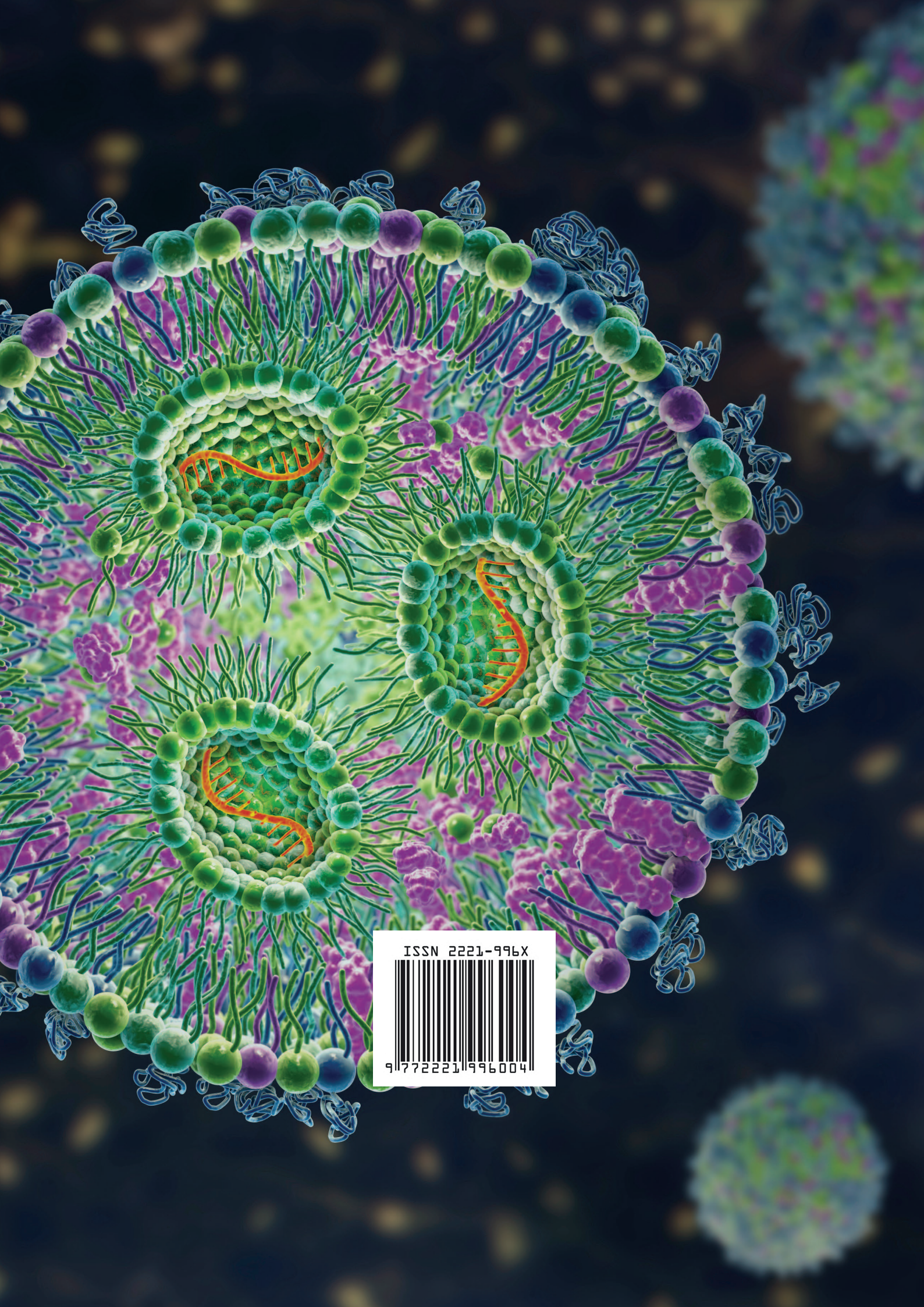
После доработки 22.09.2026

Принята к публикации 25.09.2026

Received September 15, 2026

Revised September 22, 2026

Accepted September 25, 2026



ISSN 2221-996X



9 772221 996004