на правах рукописи

КИСАКОВ ДЕНИС НИКОЛАЕВИЧ

Доставка экспериментальных ДНК- и мРНК-вакцин против COVID-19 с помощью электропорации и струйной инжекции

1.5.3. Молекулярная биология

1.5.10. Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Кольцово, 2025

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научные руководители:	Ильичёв Александр Алексеевич доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Сергеев Артемий Александрович доктор медицинских наук, заместитель генерального директора по научной и эпидемиологической работе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.
Официальные оппоненты:	**Зенкова Марина Аркадьевна**, доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; **Васин Андрей Владимирович**, доктор биологических наук, профессор РАН, директор Института биомедицинских систем и биотехнологий СПбПУ.
Ведущая организация:	ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)

Защита состоится «26» сентября 2025 г. в 11-30 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора http://www.vector.nsc.ru.

Автореферат разослан «____» _____2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент Ильичёва Т.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Пандемия COVID-19 стимулировала разработку ДНК- и мРНК-вакцин. Вакцины на основе матричной РНК были одними из первых, лицензированных для использования против этого заболевания (Baden et al., 2021; Polack et al., 2020). В 2021 г. для профилактики COVID-19 была также одобрена первая ДНК-вакцина ZyCoV-D, разработанная индийской компанией Zydus Lifesciences Ltd (Mallapaty, 2021; Momin et al., 2021).

Эти вакцины эффективно стимулируют как гуморальный, так и Т-клеточный иммунитет. Их производство быстрее и безопаснее по сравнению с традиционными типами вакцин, а возможность варьирования антигенной части позволяет оперативно адаптировать препараты к новым патогенам (Li & Petrovsky, 2016). Платформы на основе нуклеиновых кислот открывают перспективы создания универсальных вакцин, включая полиэпитопные и мозаичные конструкции (Bazhan et al., 2022; Hanke, 2014; Karpenko et al., 2018; Sardesai & Weiner, 2011).

Однако при введении без использования систем доставки их иммуногенность невысока (Braathen et al., 2020; Kim et al., 2021; Li & Petrovsky, 2016). Для её повышения применяются несколько подходов доставки: липидные наночастицы, катионные полимеры, электропорация, генная пушка и струйная инжекция (Chang et al., 2019; Conforti et al., 2022; Momin et al., 2021; Peletta et al., 2021). Особенно перспективны электропорация и струйная инжекция, поскольку они технологически просты, обеспечивают необходимый иммунный ответ и снижают реактогенность вакцин.

Цель и задачи исследования. Основная цель настоящей работы заключалась в исследовании потенциала физических методов доставки экспериментальных ДНК- и мРНК-вакцин с помощью электропорации и струйной инжекции в организм лабораторных животных.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Получить экспериментальные ДНК- и мРНК-вакцины, кодирующие рецепторсвязывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-COV-2, штамм Wuhan Hu-1.
2. Разработать и оптимизировать протоколы электропорации с использованием модельных конструкций phMGFP и мРНК-GFP на мышах линии BALB/c.
3. Разработать и оптимизировать протоколы струйной инжекции с использованием модельных конструкций phMGFP и мРНК-GFP на мышах линии BALB/c.
4. Исследовать иммунный ответ у мышей линии BALB/c на экспериментальную ДНК-вакцину pVAXrbd, кодирующую рецепторсвязывающий домен спайкового белка SARS-CoV-2, доставленную с помощью электропорации и струйной инжекции.
5. Провести сравнительную оценку иммуногенности экспериментальной мРНК-вакцины, кодирующей рецепторсвязывающий домен спайкового белка SARS-CoV-2, доставленную с помощью струйной инжекции и липидных наночастиц (ЛНЧ).

Научная новизна и практическая ценность работы. Разработан и оптимизирован протокол введения ДНК-вакцины мышам с помощью электропорации (ЭП), включающий три прямоугольных импульса постоянного тока (12 В, 45 мА), с интервалами 30 мс и 950 мс. Этот протокол применялся для повышения иммуногенности ДНК-вакцины pVAXrbd. Иммунизация мышей ДНК-вакциной pVAXrbd с использованием разработанного протокола электропорации позволила достигнуть 16-кратного увеличения титра RBD-специфических антител и более чем 20-кратный рост уровня нейтрализующих антител по сравнению с внутримышечным введением. Количество IFN-γ-продуцирующих клеток увеличилось в 7 раз по сравнению с В/М введением, что подтверждает усиление Т-клеточного ответа.

Разработан протокол безыгольной струйной инжекции (СИ): введение под прямым углом, объём 50 мкл, скорость струи — 220 м/с, давление — 6,5 бар, время инжекции — 0,33 мс. При использовании этого протокола для доставки pVAXrbd наблюдалось значительное снижение вирусной нагрузки в легких мышей после заражения Гамма-вариантом SARS-CoV-2 (штамм hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021).

Впервые была продемонстрирована возможность введения мРНК-вакцины с помощью струйного безыгольного инжектора. Показано, что иммунизация мышей мРНК, кодирующей RBD-домен S-белка SARS-CoV-2, с помощью струйной инжекции или с помощью липидной наночастиц, обеспечивает формирование сравнимого высокого уровня нейтрализующих антител и Т-клеточного ответа.

Разработанные протоколы ЭП и СИ являются эффективными и технологичными методами доставки ДНК- и мРНК-вакцин, перспективными для дальнейших исследований и практического применения.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Физические методы доставки нуклеиновых кислот, такие как струйная безыгольная инжекция и электропорация, обеспечивают иммуногенность ДНК-вакцин, индуцируя оба компонента иммунного ответа.
2. Экспериментальная ДНК-вакцина pVAXrbd, кодирующая рецепторсвязывающий домен спайкового белка вируса SARS-CoV-2 (Wuhan Hu-1), обеспечивает формирование высокого как гуморального, так и клеточного иммунного ответа у лабораторных животных, иммунизированных с помощью метода электропорации.
3. Экспериментальная ДНК-вакцина pVAXrbd, кодирующая рецепторсвязывающий домен спайкового белка вируса SARS-CoV-2 (Wuhan Hu-1), введенная мышам линии BALB/c с помощью струйной инжекции, обеспечивает формирование обоих звеньев иммунитета и снижает вирусную нагрузку Гамма-варианта SARS-CoV-2 в тканях лёгких иммунизированных животных.
4. Струйная безыгольная чрескожная инжекция обеспечивает иммунный ответ мРНК-RBD-вакцины, сопоставимый с мРНК-RBD-вакциной, инкапсулированной в ЛНЧ.

Степень достоверности и апробация результатов. По результатам диссертации опубликовано: 6 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты

диссертаций, 12 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях. Результаты исследования прошли многократную экспертизу и были представлены на нескольких научных конференциях: Международная конференция OpenBio (Кольцово, 2021); 64-я Всероссийская научная конференция МФТИ (Москва, 2021); научная конференция «Молодёжное научное творчество – эффективный путь подготовки медико-биологических кадров» (Бишкек, 2022); вторая Санкт-Петербургская молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные вопросы эпидемиологии, иммунологии, профилактики и лечения COVID-19» (Санкт-Петербург, 2022); X Международная конференция OpenBio (Кольцово, 2023); X Юбилейный конгресс Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (Санкт-Петербург, 2024); Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная 105-летию создания ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (Нижний Новгород, 2024).

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 163 страницах, включает 34 рисунка, 6 таблиц, 1 приложение. Список литературы включает 288 источников.

Личный вклад автора. Основная часть экспериментальной работы выполнена лично автором, в том числе: проведен анализ литературы, изучена степень разработанности проблемы с определением цели, задач исследования и его дизайна, проведено молекулярное клонирование, ПЦР, электрофорез; культивирование культур клеток *E.Coli* и HEK293T; изучение биораспределения меченой РНК, оценка флуоресценции phMGFP и мРНК-GFP; работа с животными (иммунизация животных, забор крови и подготовка сывороток); анализ и статистическая обработка данных. Лично или с участием автора подготовлены публикации по материалам исследования.

При участии автора проводилось конструирование, синтез и выделение ДНК-конструкций совместно Рудометовым А.П., Боргояковой М.Б.; синтез мРНК с Шарабриным С.В.; иммуноферментный анализ, вируснейтрализация, ELISpot совместно с Боргояковой М.Б., Старостиной Е.В. Анализ образцов с помощью электронной микроскопии и гистологические исследования выполнены сотрудниками отдела микроскопических исследований; работы с вирусом SARS-CoV-2 проведены специалистами отдела «Коллекция микроорганизмов».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Для изучения потенциала физических методов доставки ДНК- и мРНК-вакцин были получены, наработаны и охарактеризованы следующие генетические

конструкции (рисунок 1): ДНК-конструкции (phMGFP и pVAXrbd), мРНК (мРНК-GFP и мРНК-RBD).

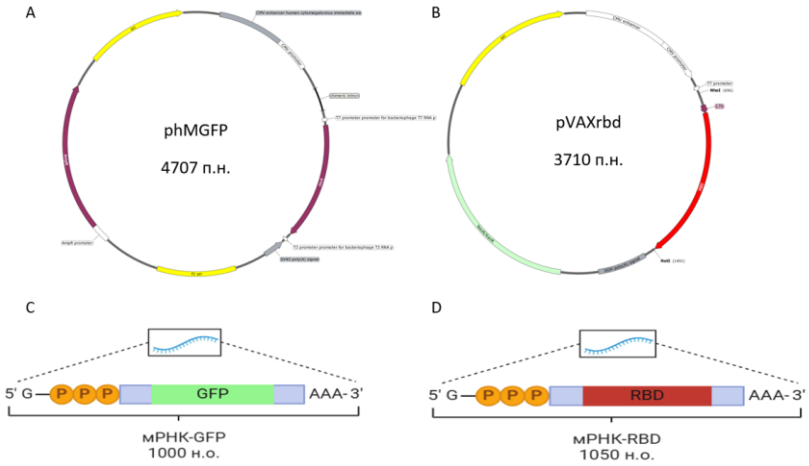

Рисунок 1.
A. Генетическая карта плазмиды phMGFP: mc4 — целевой ген. **B.** Генетическая карта плазмиды pVAXrbd. RBD — целевой ген; 176 — лидерная последовательность. **C.** Схематичная структура мРНК-GFP. **D.** Схематичная структура мРНК-RBD.

Для доставки генетических конструкций были использованы два метода: электропорация *in vivo* и струйная инжекция.

Разработка оптимизированного протокола электропорации *in vivo*

Ранее Leroy et al. (2022) исследовали доставку ДНК-вакцины против ВИЧ-1 с помощью электропоратора CUY21 EDIT II (BEX Co, Ltd., Япония), отметив высокую иммуногенность, но значительные побочные эффекты. В ходе диссертационной работы попытка применения их протокола привела к тяжелым повреждениям тканей у мышей, что потребовало разработки оптимизированного протокола. Основными критериями стали минимальная травматичность и стабильная экспрессия зеленого флуоресцентного белка (GFP) из плазмиды phMGFP.

Эксперимент включал 8 групп мышей (по 10 животных), которым в четырехглавую мышцу вводили phMGFP (30 мкг в 40 мкл PBS/доза) инсулиновыми шприцами 29G. После инъекции применяли электропорацию (ЭП) с устройством CUY21 EDIT II и электродом LF 650P5. Параметры (сила тока, напряжение, длительность и количество импульсов) варьировали: от 1 до 10 импульсов (10–50 мс, 6–100 В) с интервалами 100–1000 мс и ±-полярностью. Перед ЭП измеряли сопротивление кожи. Результаты сравнивали по уровню GFP-флуоресценции и степени повреждений после ЭП (представлены в таблице 1).

Таблица 1 – Различные протоколы ЭП

Номер протокола	1	2	3*	4	5
Режим импульса	Экспоненциальный	Прямоугольный			
Тип импульса	±				
Напряжение (В)	40	30	50	12	6
Ограничение силы тока (мА)	300	200	150	45	45
Время импульса (мс)	30	40	30	30	30
Интервал импульсов (мс)	1000	900	900	950	900
Количество импульсов	3	3	5	3	3
Повреждения	умеренная инфильтрация	диффузная нейтрофильная инфильтрация	нейтрофильно-гистиоцитарная инфильтрация	умеренная инфильтрация	нормальная гистологическая картина

*Протокол использования BEX CUY21EDIT2 командой Matsuda и др., рекомендуемый производителем для ДНК-препаратов (Matsuda & Oinuma, 2019).

Через 2 дня после ЭП у мышей оценивали гистопатологические изменения в мышечной ткани левой задней лапы (рисунки 2B–F). Характер повреждений зависел от протокола:

Протокол № 1: Умеренная воспалительная инфильтрация дермы и гиподермы, некроз эпидермиса (у 1 животного — акантоз).

Протокол № 2: Выраженный нейтрофильный воспалительный инфильтрат с некрозом кожи, переходящим на мышцы и отек ретикулярной дермы.

Протокол № 3: Очаговый трансдермальный некроз, диффузная нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация, расширение сосудов дермы.

Протокол № 4: Умеренная инфильтрация нейтрофилами в подкожной клетчатке и мышцах, редкий очаговый некроз (рисунок 2E).

Протокол № 5: Легкая очаговая инфильтрация, но отсутствие GFP-флуоресценции, указывающее на неэффективность доставки плазмиды phMGFP (рисунок 2F).

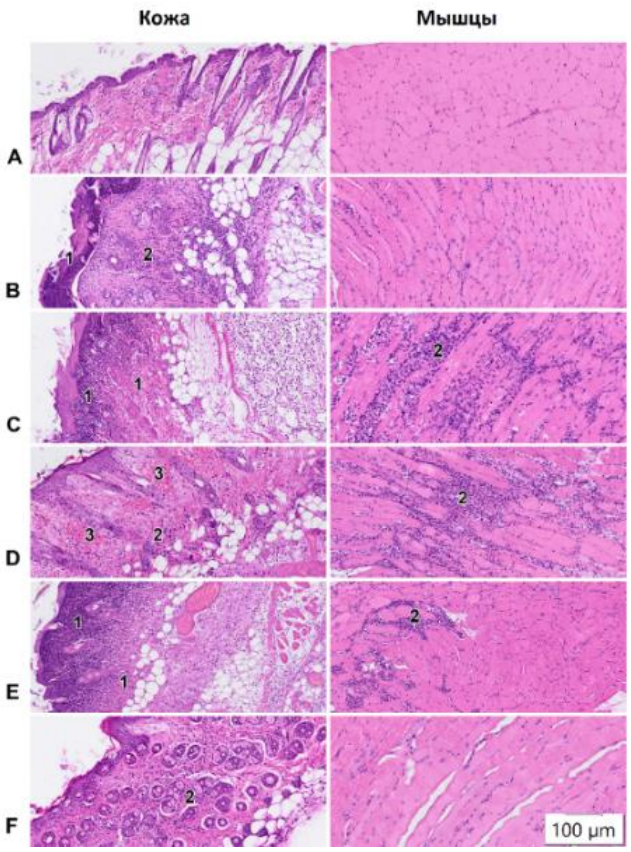

Рисунок 2.
Микрофотографии образцов тканей мыши на 2 сутки, показывающие гистологические изменения с различными протоколами ЭП (см. таблицу 1). Срезы, окрашенные гематоксилином и эозином: **(A)** контрольные мыши, **(B)** протокол № 1; **(C)** Протокол № 2; **(D)** Протокол № 3; **(E)** Протокол № 4; **(F)** Протокол № 5. Мышей, которым инъецировали плазмиду GFP, подвергали электропорации, и ткань разрезали на срезы толщиной 1 мм. Обозначения: 1 — некроз, 2 — воспалительная инфильтрация, 3 — микроциркуляция полнокровных сосудов, диапедез эритроцитов.

На 3-и сутки после ЭП проводили флуоресцентную микроскопию тонких срезов мышечной ткани BALB/c (Olympus, экспозиция 550 мс). Качественно-количественный анализ выявил максимальную флуоресценцию GFP при использовании протокола № 4, что статистически значимо превосходило другие группы (рисунки 3B, C). Оптимальным по критерию эффективность/безопасность оказался протокол №4, при использовании которого регистрируются умеренные гистологические изменения.

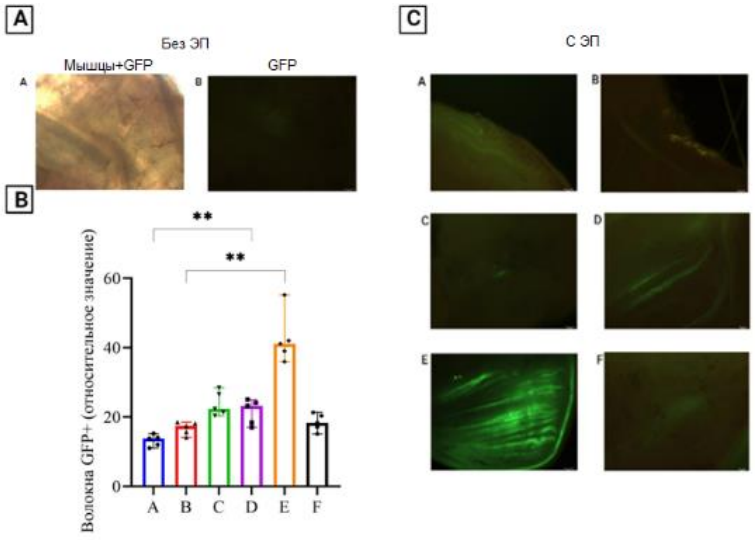

Рисунок 3.
Микрофотографии образцов тканей мыши, полученные через 3 дня после иммунизации плазмидой ДНК phMGFP. Отделяли фрагменты мышц с областью инъекции, нарезали их на срезы толщиной 1 мм для визуализации флуоресценции GFP: **A** — phMGFP вводили внутримышечно без ЭП: **(A)** — визуализация флуоресценции GFP с использованием либо лампы белого света (мышца + GFP), либо **(B)** — лампы УФ-света (УФС). **B** — графическое представление интенсивности флуоресценции с использованием

компьютерной обработки сигналов. Значимость оценивали с помощью непараметрического однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса с поправкой на множественные сравнения и проверки статистической гипотезы Данна (** $p < 0,01$). **C** — репрезентативные изображения показаны после ЭП с использованием различных протоколов электропорации: **(A)** контрольные мыши (без ЭП); **(B)** Протокол № 1; **(C)** Протокол № 2; **(D)** Протокол № 3; **(E)** Протокол № 4; **(F)** Протокол № 5.

Оптимизированный протокол электропорации (3 импульса 12 В, 30/950 мс, 45 мА) обеспечил эффективную доставку ДНК (phMGFP) с низкой клеточной травматизацией и высокой флуоресценцией GFP. Однако для мРНК-GFP метод оказался неэффективен, вероятно, из-за активации врожденного иммунитета и деградации мРНК (рисунок 4). В дальнейшем метод применен для доставки ДНК-вакцины pVAXrbd (RBD SARS-CoV-2) с оценкой иммуногенности.

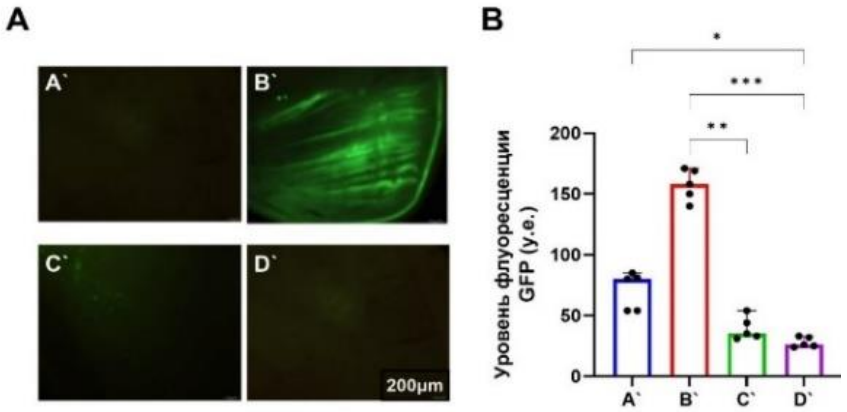

Рисунок 4.
(A) Микрофотографии образцов тканей мыши, полученные через 3 дня после иммунизации: A` — phMGFP B/M; B` — phMGFP ЭП; C` — мРНК-GFP B/M; D` — мРНК-GFP ЭП. **(B)** графическое представление интенсивности флуоресценции с использованием компьютерной обработки сигналов. Значимость оценивали с помощью непараметрического однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса с поправкой на множественные сравнения и проверки статистических гипотез Данна (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

Испытания протокола электропорации для введения ДНК-вакцины pVAXrbd, кодирующей рецепторсвязывающий домен SARS-CoV-2

Для оценки иммуногенности плазмиды pVAXrbd использовали 3 группы мышей BALB/c (по 6 особей). Первой группе вводили 100 мкг pVAXrbd внутримышечно, второй — такую же дозу с последующей электропорацией по протоколу № 4, третья группа служила контролем. Двукратную иммунизацию проводили с 21-дневным интервалом. Через 10 дней после второй иммунизации (31-й день) у животных забирали кровь и селезёнки для анализа. Сыворотки исследовали методом ИФА на наличие RBD-специфических антител и определяли их вируснейтрализующую активность (рисунок 5).

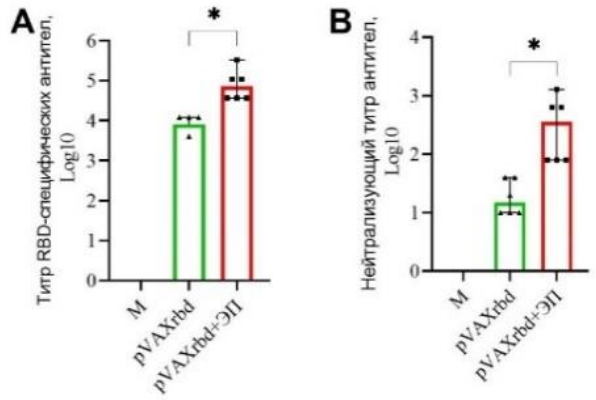

Рисунок 5.
Результаты гуморального ответа в мышах линии BALB/c на 10 сутки после второй иммунизации. М — контрольные (неиммунизированные) мыши; pVAXrbd — мыши, иммунизированные внутримышечно плазмидой, pVAXrbd+ЭП — мыши, иммунизированные плазмидой с использованием ЭП. **(A)** Титры RBD-специфических IgG к RBD SARS-CoV-2 определяли с помощью ИФА. **(B)** Вируснейтрализующую активность сывороток мышей, иммунизированных pVAXrbd+ЭП и pVAXrbd, определяли с использованием штамма SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020 (100 TCID50). На панелях (A, B) данные представлены в виде медианы с диапазоном обратных титров. Значимость оценивали с помощью непараметрического однофакторного дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса с поправкой на множественные сравнения и проверку статистической гипотезы Данна (* $p < 0,05$).

Согласно результатам ИФА, у мышей, иммунизированных pVAXrbd с помощью электропорации (ЭП), наблюдалось статистически значимое (109 350 против 6750, $p < 0,05$) 16-кратное увеличение среднего титра специфических антител по сравнению с внутримышечным (В/М) введением той же вакцины. Это указывает на более высокую иммуногенность ДНК-вакцины при применении с ЭП.

Исследование нейтрализующей способности сыворотки показало, что вакцина pVAXrbd индуцировала образование антител, способных нейтрализовать штамм SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020 *in vitro*. При этом титр нейтрализующих антител в группе с ЭП был более чем в 20 раз выше, чем при В/М введении (466 против 21, $p < 0,05$), и коррелировал с данными ИФА, подтверждая более высокую иммуногенность вакцины при использовании ЭП.

Анализ ELISpot выявил значительное увеличение количества IFN-γ-продуцирующих клеток у мышей, получавших вакцину с ЭП (рисунок 6, 2432 против 381 на 10^6 спленоцитов, $p < 0,01$).

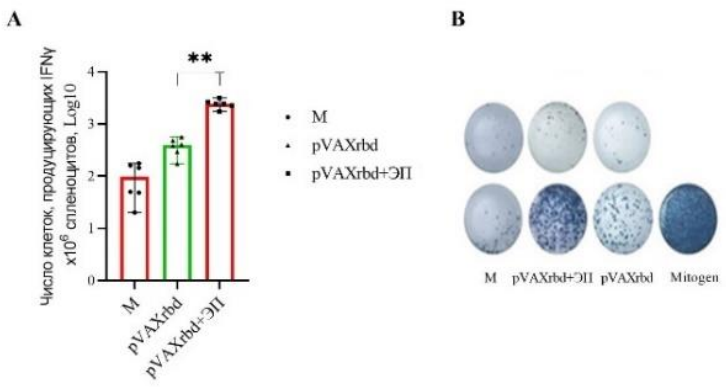

Рисунок 6.
Результаты анализа ELISpot специфического для SARS-CoV-2 Т-клеточного опосредованного ответа у иммунизированных мышей BALB/c на 10 сутки после второй иммунизации. Группы: контроль (М), pVAXrbd, pVAXrbd+ЭП. **(A)** Количество RBD-специфичных IFN-γ+ клеток на 10^6 спленоцитов **(B)** Репрезентативные изображения ELISpot (нестимулированные/стимулированные клетки). Статистически значимые различия (**$p < 0,01$) выявлены критерием Краскела–Уоллиса с поправкой Данна.

Это свидетельствует о более сильном Т-клеточном ответе при использовании электропорации, что связано с её способностью повышать эффективность трансфекции за счёт временной дестабилизации липидной мембраны. У животных, иммунизированных без ЭП, уровень ответа был близок к таковому у интактных особей. Полученные данные демонстрируют усиление как гуморального, так и клеточного иммунного ответа при применении pVAXrbd с ЭП.

Разработка протокола струйной инжекции для ДНК- и мРНК-конструкций

Для оценки безопасности и эффективности струйной инжекции при доставке ДНК-вакцин проведено гистологическое исследование с использованием модельной плазмиды phMGFP. Анализ тканей мышей, получавших вакцину или физиологический раствор методом струйной инжекции, а также контрольной группы, не выявил патогистологических изменений, таких как некроз, воспалительная инфильтрация, полнокровие сосудов микроциркуляции или диапедез эритроцитов (рисунок 7).

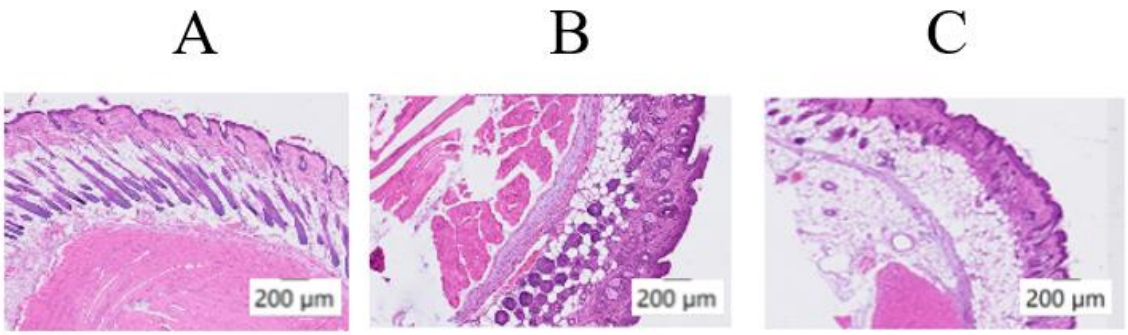

Рисунок 7. Микрофотографии образцов тканей мыши, взятых из места инъекции через 48 часов: **(A)** у контрольных мышей; **(B)** у мышей, которым вводили физиологический раствор; **(C)** у мышей, которым вводили pVAXrbd в дозе 100 мкг. Образцы тканей мышей окрашены гематоксилином и эозином.

Таблица 2 – Использованные протоколы струйной инжекции.

Номер протокола	1	2	3
Давление (бар)	3	6,5	10
Скорость потока (м/с)	180	220	300
Угол наклона	90	90	90
Время инжекции (с)	0,22	0,33	0,44
Вводимый объем (мкл)	50	50	50

С учетом низкой эффективности электропорации для доставки мРНК-конструкций были определены оптимальные параметры струйной инжекции на примере мРНК-GFP. Параметры выбирали на основе характеристик инжектора Comfort-IN. Для этого сформировали четыре группы мышей (по 10 животных в каждой): три экспериментальные и одна контрольная (таблица 2). мРНК-GFP (30 мкг в 50 мкл физиологического раствора) вводили в четырехглавую мышцу бедра левой задней лапы с помощью струйного инжектора Comfort-IN (MIKA MEDICAL CO., Китай).

Для оценки тканевых повреждений после инжекции проведено гистологическое исследование кожи и мышц через 48 часов после иммунизации. Степень изменений зависела от протокола: при протоколах № 1 и № 2 патологий не выявлено, а при протоколе № 3 наблюдались незначительные некротические очаги (рисунки 8A–D).

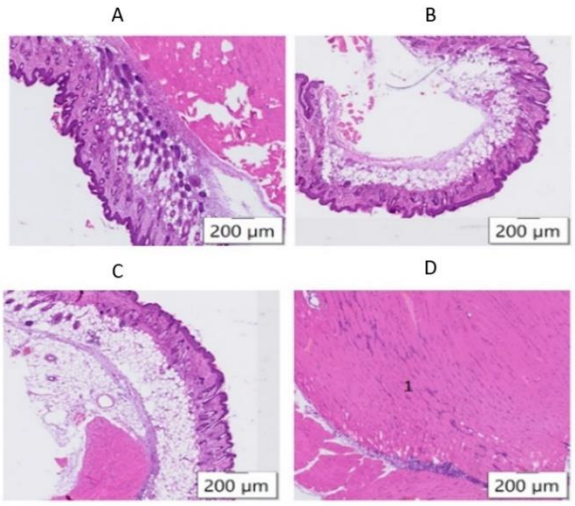

Рисунок 8.
Микрофотографии образцов тканей мышей через 48 часов, показывающие гистологические изменения при различных протоколах инжекции (см. таблицу 2). Образцы, взятые из места инъекции: **(A)** у контрольных мышей; **(B)** у мышей, к которым применялся протокол № 1; **(C)** у мышей, к которым применялся протокол № 2; **(D)** у мышей, к которым применялся протокол № 3. Срезы окрашивают гематоксилином и эозином. Обозначения: 1 — некроз.

Флуоресценцию GFP изучали на 3-и сутки после введения с помощью УФ-микроскопии тонких срезов мышечной ткани, поскольку именно в этот период начинается её интенсивное проявление (Kisakov et al., 2021). Микрофотографии представлены на рисунке 9A. Уровень флуоресценции определяли по количеству GFP+ волокон в мышечной ткани BALB/c с помощью компьютерной обработки (рисунок 9B).

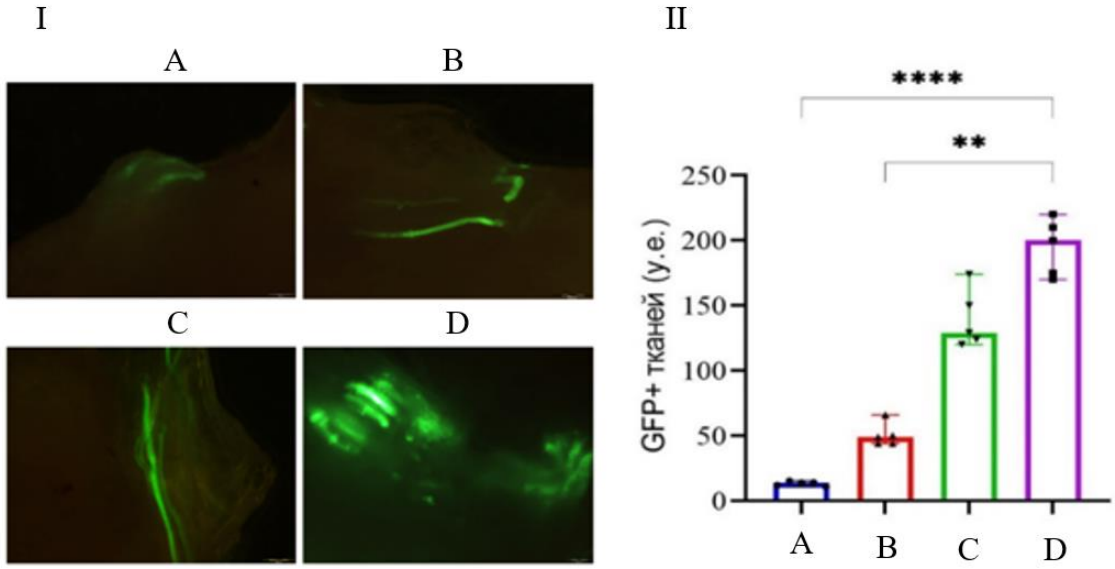

Рисунок 9.

(I) Флуоресцентные микрофотографии срезов мышечной ткани (толщиной 1 мм), сделанные через 3 дня после струйной инжекции мРНК-GFP. **(II)** Графическое представление интенсивности флуоресценции белка GFP, полученное с помощью компьютерной обработки. Сравнивали группы: **(A)** — контроль (внутримышечное введение шприцем), **(B)** — протокол № 1, **(C)** — протокол № 2, **(D)** — протокол № 3. Достоверность различий оценивали с использованием теста Краскела–Уоллиса с поправкой на множественные сравнения и теста Данна (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

Наибольшая флуоресценция GFP наблюдалась при использовании протокола № 3 (рисунок 9), демонстрируя статистически значимое различие с контролем и протоколом № 1. Однако из-за гистологических повреждений предпочтение отдали более безопасному протоколу № 2.

В результате экспериментов были установлены следующие оптимальные параметры струйной инжекции: давление 6,5 бар, скорость струи 220 м/с и время введения 50 мкл раствора за 0,33 мс. Данные условия обеспечивали эффективную флуоресценцию GFP у мышей BALB/c без значительного повреждения тканей или воспаления. Эти параметры затем применяли для введения pVAXrbd и мРНК-RBD (кодирующей RBD-домен S-белка SARS-CoV-2) с последующей оценкой иммуногенности.

Испытания протокола струйной инжекции на примере доставки плазмиды pVAXrbd, кодирующей рецепторсвязывающий домен спайкового белка SARS-CoV-2

Ранее было установлено, что внутримышечное введение 100 мкг pVAXrbd индуцирует гуморальный и клеточный иммунный ответ (Borgoyakova et al., 2022). В данном исследовании сравнивали иммуногенность pVAXrbd при традиционном введении (шприц с иглой) и струйной инжекции. Мышей иммунизировали двукратно с 3-недельным интервалом. Через 10 дней после бустерной дозы часть

животных инфицировали SARS-CoV-2, у остальных анализировали иммунный ответ.

Сыворотки струйно-иммунизированных мышей показали 80-кратно более высокие титры RBD-специфических IgG (328 050 против 2 700, p < 0,0022) и повышенную вируснейтрализующую активность по сравнению с группой традиционной вакцинации (рисунок 10A).

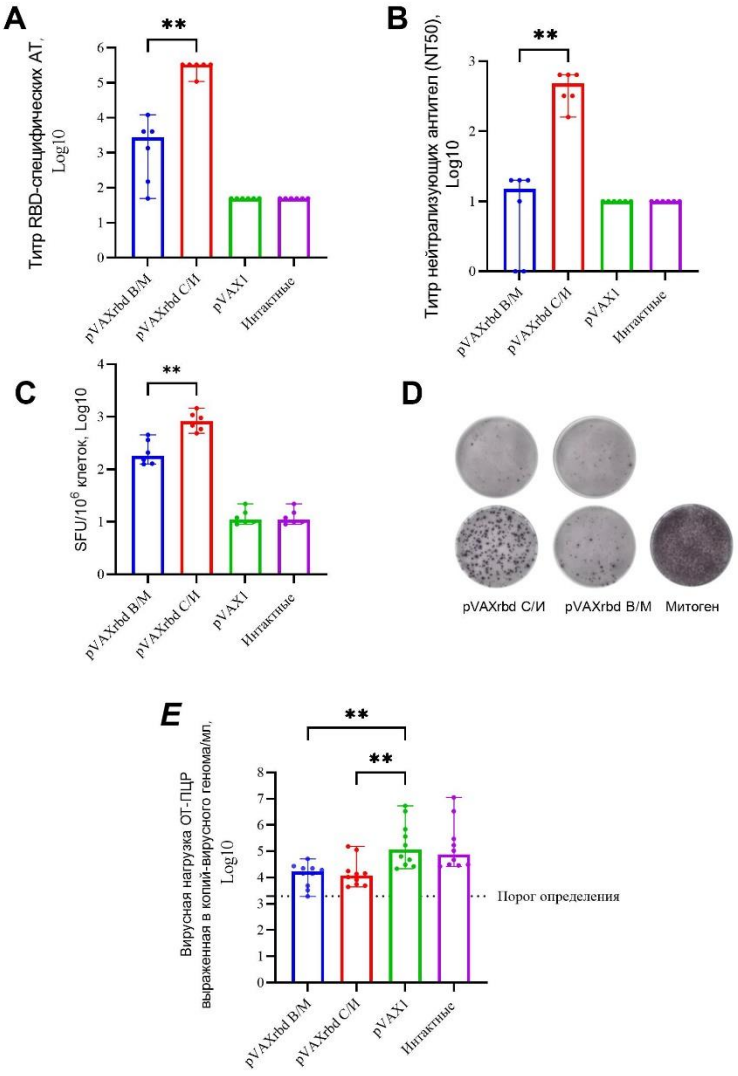

Рисунок 10.
Анализ иммунного ответа у мышей, иммунизированных pVAXrbd. (**A**) — титры RBD-специфических антител по ИФА; (**B**) — нейтрализующая активность сывороток на клетках Vero E6, инфицированных штаммом hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020, по снижению ЦПД; (**C**) — количество IFN-γ-продуцирующих спленоцитов по ELISpot; (**D**) — фотографии лунок ELISpot: верхний ряд — без стимуляции, нижний — со стимуляцией пептидами или митогеном; (**E**) — количественное определение РНК SARS-CoV-2 в 10 %-ном гомогенате легких мышей BALB/c на 4 сутки после заражения, методом ПЦР в реальном времени (концентрация копий генома в 10 % гомогенате). На графиках показаны медианы с диапазоном мин-макс. Достоверность различий оценивали с помощью теста Краскела–Уоллиса; *p < 0,05, **p < 0,01.

Нейтрализующая активность сывороток оценивалась на клетках Vero E6 с использованием штамма hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020 (Wuhan-like). Результаты коррелировали с данными ИФА: сыворотки от мышей, получавших вакцину струйной инжекции, значительно эффективнее подавляли цитопатический эффект вируса по сравнению с внутримышечным введением (титр 1:480 против 1:20, p = 0,0022; рисунок 10B).

Клеточный ответ оценивали методом ELISpot по продукции IFN-γ спленоцитами, стимулированными RBD-пептидами. У мышей, иммунизированных струйной инжекцией, количество IFN-γ-продуцирующих клеток было в ~3,5 раза выше, чем при внутримышечном введении (820 против 180 SFU, p = 0,0022; рисунки 10C, D).

Для оценки протективной эффективности pVAXrbd мышей заражали интраназально штаммом SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (вариант Гамма, P.1) в дозе 50 ИД50. Через 4 дня определяли вирусную нагрузку в легких методом ОТ-ПЦР. В группах, получавших pVAXrbd, вирусная нагрузка снижалась до 14 283 (внутримышечно, p = 0,0093) и 12 035 копий/мл (струйная инжекция, p = 0,0081) по сравнению с 116 899 в контроле (рисунок 10E), что демонстрирует защитный эффект вакцины. Исследования на мышах BALB/c показали, что ДНК-вакцина pVAXrbd (на основе RBD штамма Wuhan Hu-1) обеспечивает кросс-протекцию против Гамма-варианта SARS-CoV-2. Наибольшее снижение вирусной РНК в легких наблюдалось при струйной инжекции, превосходя результаты как контроля, так и традиционного внутримышечного введения (рис. 10E). Полученные данные свидетельствуют о кросс-реактивности вакцинного кандидата, вероятно обусловленной адъювантными свойствами струйной инжекции. Этот метод обеспечивает равномерное распределение препарата и эффективную стимуляцию иммунных клеток, что приводит к усилению обоих звеньев иммунного ответа. Таким образом, струйная доставка значительно повышает эффективность ДНК-вакцинации по сравнению с традиционным методом.

Испытания протокола струйной инжекции на примере доставки мРНК-RBD, кодирующей рецепторсвязывающий домен спайкового белка SARS-CoV-2

В связи с низкой эффективностью электропорации для доставки мРНК-вакцин (рисунок 9) был применен метод струйной инжекции, ранее показавший хорошие результаты при введении ДНК-вакцин. В отличие от широко изучаемого пироприводного инжектора PYRO-Jet, использованного японскими исследователями (Abbasi et al., 2023, 2024), в данной работе применяли пружинный инжектор Comfort-IN. В качестве положительного контроля использовали мРНК-RBD, инкапсулированную в липидные наночастицы (ЛНЧ), со средним размером 145 нм, полидисперсностью < 0,15, дзета-потенциалом 0,23 мВ и эффективностью инкапсуляции > 98 %.

Для оценки иммуногенности мРНК-вакцины лабораторных мышей иммунизировали по 30 мкг мРНК-RBD на животное: группе 1 — в виде струйной инжекции (С/И), группе 2 — внутримышечно (В/М) в составе ЛНЧ, группе 3 — В/М в виде «голой» мРНК. Уровень RBD-специфических антител определяли методом ИФА на 31-й день. Средние титры составили: 1:400 967 (С/И), 1:1 530 922 (ЛНЧ) и 1:16 200 (В/М). Различия между группами С/И и ЛНЧ не были статистически значимыми (рисунок 11A, p = 0,213), тогда как у группы В/М уровень антител был в 25 раз ниже.

Вируснейтрализующую активность сывороток оценивали *in vitro* с использованием живого штамма SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020 и псевдотипированного вируса. Против живого вируса титры составили 1:480 (ЛНЧ) и 1:373 (С/И) (рисунки 11B, C, p = 0,6156), что в 37,3 раза выше, чем у группы В/М (рисунки 11B, C, 1:10, p < 0,0494). При анализе

псевдотипированного вируса титры составили 1:6480 (ЛНЧ) и 1:2262 (С/И) (рисунки 11B, C, p = 0,7948).

Клеточный иммунный ответ оценивали методом ELISpot по продукции IFN-γ спленоцитами после стимуляции RBD-пептидами. Наибольшая активность была зарегистрирована в группе со струйной инжекцией — 1068 SFU, что в 3 раза превышало уровень при В/М введении мРНК-RBD-ЛНЧ (рисунок 11D, 337 SFU, p < 0,05) и в 8 раз — «голой» мРНК (рисунок 11D, 130 SFU, p < 0,05). Такое усиление гуморального и Т-клеточного ответа может быть обусловлено более равномерным распределением мРНК в тканях и высокой плотностью антигенпрезентирующих клеток в коже.

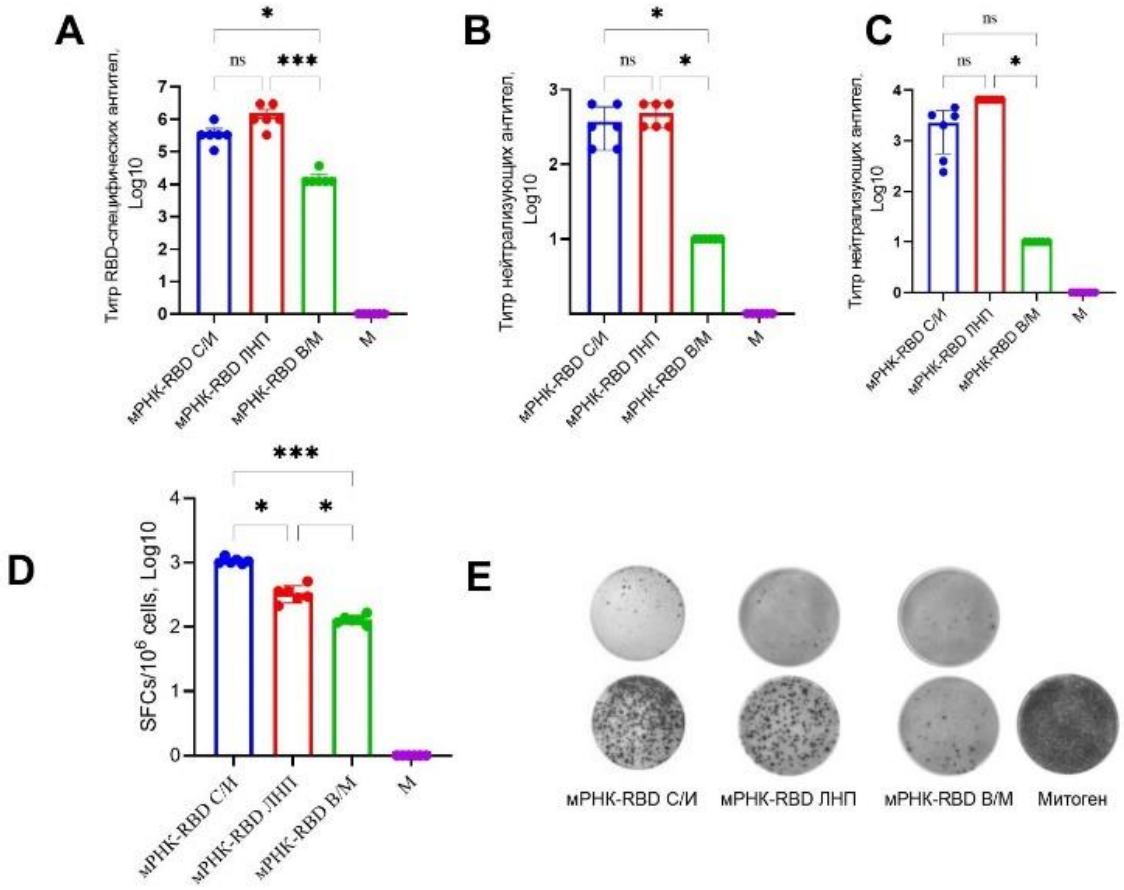

Рисунок 11.

Изучение иммуногенных свойств мРНК-RBD на 14 сутки после второй иммунизации. **(A)** Уровень RBD-специфических IgG (ИФА); **(B)** Данные вируснейтрализующего анализа сывороток с использованием штамма SARS-CoV-2 Wuhan-like CoV-19/Australia/VIC01/2020 (100 TCID50); **(C)** Данные вируснейтрализации с использованием псевдотипированных вирусов, несущих на своей поверхности S-гликопротеин SARS-CoV hCoV-19/Russia/Omsk202118_1707/2020; **(D)** ELISpot анализ IFN-γ-продуцирующих клеток (RBD-пептид-специфический ответ); **(E)** Репрезентативные изображения лунок ELISpot (нестимулированные и стимулированные спленоциты). Данные представлены как медиана с диапазоном. Статистическая значимость (*p < 0,05; ***p < 0,001; ****p < 0,0001) определена критерием Краскела–Уоллиса. Группы: струйная инжекция (С/И), мРНК-ЛНЧ (ЛНЧ), внутримышечное введение (В/М) и контроль (М).

На 31-й день оценивали защитную эффективность мРНК-RBD против штамма SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (Гамма-вариант), чувствительного для мышей BALB/c. После заражения в дозе 50 ИД50 животных выводили из эксперимента на 4-й день и определяли вирусную нагрузку в легких методом ОТ-ПЦР с праймерами к Е-гену. Результаты представлены на рисунке 12 в виде значений концентрации копий-генома методом ПЦР в реальном времени.

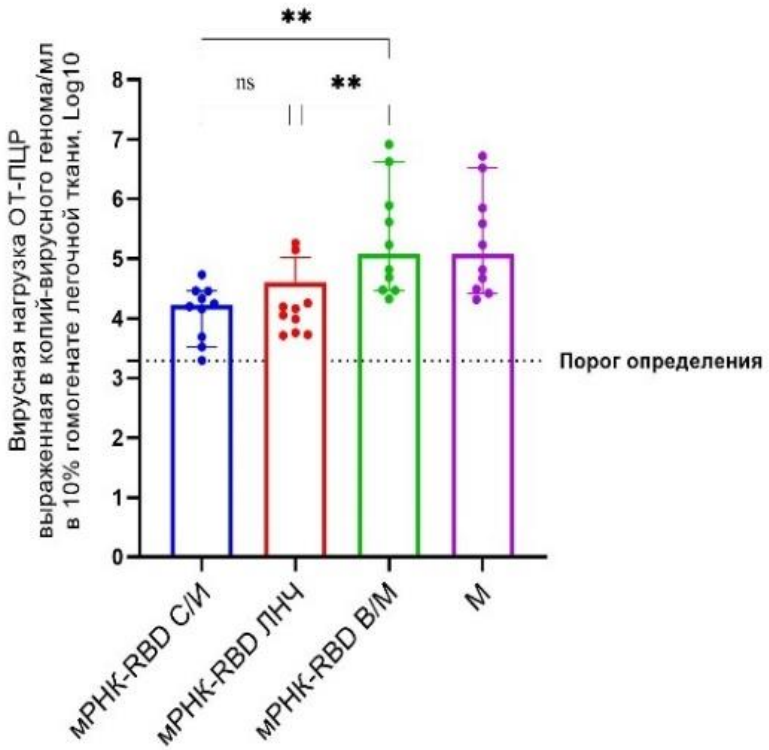

Рисунок 12.
Изучение защитной активности мРНК-RBD. Вирусная нагрузка в тканях легких мышей BALB/c на 4-е сутки после заражения SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021. Значения копий-вирусного генома в режиме ОТ-кПЦР в реальном времени представлены точками. Статистический анализ проводили с помощью критерия Краскела–Уоллиса (ns $p > 0,05$; ** $p < 0,01$). Обозначения: мРНК-RBD С/И — мыши, иммунизированные «голой» РНК путем струйного введения, мРНК-RBD ЛНЧ — мыши, иммунизированные мРНК, инкапсулированные в ЛНЧ, мРНК-RBD В/М — мыши, иммунизированные «голой» РНК внутримышечно, М — контрольные (неиммунизированные) мыши.

Наименьшая вирусная нагрузка отмечена в группе со струйной инжекцией мРНК-RBD — 16 823 копий/мл. Различия между группами мРНК-RBD-ЛНЧ (40 935 копий/мл) и мРНК-RBD С/И не были значимыми ($p = 0,3729$). У мышей, получавших В/М введение, вирусная нагрузка снизилась в 10 раз по сравнению с опытными группами ($p = 0,0045$ для С/И; $p = 0,0002$ для ЛНЧ). У контрольных животных этот показатель составил 118 430 копий/мл ($p < 0,0001$).

Однако исследование имеет ограничение: использование неадаптированных мышей BALB/c, у которых отсутствует рецептор ACE2, необходимый для проникновения SARS-CoV-2. Это может снижать чувствительность модели к вирусу и ограничивать оценку защитной эффективности. Тем не менее, BALB/c мыши подходят для скрининговых исследований и изучения патогенеза, как показано в работе Shipovalov et al. (2022). Учитывая высокие титры нейтрализующих антител (в 55 раз выше, чем при В/М введении), можно ожидать высокой защитной активности струйной инжекции мРНК-вакцины у трансгенных и других моделей животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На первом этапе исследования были определены оптимальные параметры доставки ДНК-вакцины с помощью аппарата CUY21 EDIT II и электрода LF 650P5 5 мм (BEX Co, Ltd., Япония). В качестве модельной использовали плазмиду phMGFP, кодирующую зелёный флуоресцентный белок. Применяли внутримышечную инъекцию и электропорацию (ЭП). Оптимизированный протокол ЭП обеспечил умеренные гистопатологические изменения и высокую эффективность доставки. Иммунизация мышей pVAXrbd с применением ЭП показала 16-кратное увеличение титра специфических антител по ИФА (109 350 против 6750, $p < 0,05$) и более чем 20-кратное превышение титра нейтрализующих антител по сравнению с внутримышечным введением (466 против 21, $p < 0,05$). Анализ ELISpot выявил значительное повышение уровня IFN-γ-продуцирующих клеток в группе с ЭП (2432 против 381 на 10^6 спленоцитов, $p < 0,01$), что свидетельствует о стимуляции как B-, так и T-клеточного иммунного ответа. Разработанный протокол ЭП включал три прямоугольных импульса постоянного тока при напряжении 12 В, интервалы 30 мс и 950 мс, ограничение тока — 45 мА. Этот протокол может быть использован для доставки ДНК-вакцин, однако его адаптация под разные модели животных и человека требует дальнейших исследований.

На втором этапе был разработан протокол доставки нуклеиновых кислот с использованием струйного инжектора: угол введения — перпендикулярно, объём — 50 мкл, скорость струи — 220 м/с, давление — 6,5 бар, время инжекции — 0,33 мс. Условия обеспечили минимальную травматизацию и высокую экспрессию с матрицы мРНК-GFP. Иммунизация pVAXrbd с помощью струйной инжекции значительно усилила гуморальный и T-клеточный ответ по сравнению с внутримышечным введением. Протективный эффект вакцины против Гамма-варианта SARS-CoV-2 у BALB/c мышей подтвердился снижением вирусной нагрузки в легких при дозах 50–200 мкг. Сравнение иммуногенности мРНК-RBD показало, что струйная инжекция значительно эффективнее внутримышечного введения как по уровню антител (400 967 против 16 200, $p < 0,01$), так и по продукции IFN-γ (1068 против 130, $p < 0,05$), включая вируснейтрализующие антитела (373 против 10, $p < 0,05$). Введение мРНК-RBD струйной инжекцией обеспечило защиту от Гамма-варианта SARS-CoV-2, сравнимую с вакциной на основе ЛНЧ. Это делает струйную инжекцию экономичной и безопасной альтернативой липидным наночастицам.

Таким образом, струйная инжекция и электропорация повышают иммуногенность ДНК- и мРНК-вакцин, активируя обе ветви иммунного ответа и снижая вирусную нагрузку у BALB/c мышей. Разработанные протоколы могут быть полезны как в научных исследованиях, так и в практической медицине.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что ДНК-конструкция phMGFP обеспечивает более высокий уровень экспрессии гена *gfp* в клетках мышц животного с минимальной травматичностью при введении в организм мышей с помощью разработанных протоколов электропорации и струйной инжекции по сравнению с внутримышечным введением:

a. Оптимальные параметры протокола электропорации – три прямоугольных импульса постоянного тока прямой и обратной полярности, напряжение 12 В, интервалы 30 мс и 950 мс, с ограничением по силе тока 45 мА.

b. Оптимальные параметры струйной инжекции – введение препарата под прямым углом, скорость струи 220 метров в секунду, давление 6,5 бар, время инжекции 0,33 мс.

2. Продемонстрировано, что экспериментальная ДНК-вакцина pVAXrbd индуцирует более высокий уровень иммунного ответа при введении мышам с помощью электропорации и струйной инжекции по сравнению с В/М введением:

a. Электропорация индуцирует 16-кратное увеличение среднего титра RBD специфических антител и > 20-кратное превышение вируснейтрализующих антител, и 7-кратное повышение уровня клеточного иммунного ответа.

b. Струйная инжекция обеспечивает 80-кратное повышение среднего титра RBD-специфических антител, 24-кратное увеличение титра вируснейтрализующих антител, 3,5-кратное увеличение Т-клеточного ответа и достоверно снижает вирусную нагрузку Гамма-варианта SARS-CoV-2 в тканях лёгких мышей BALB/c.

3. «Голая» мРНК-GFP, введенная мышам с помощью электропорации, не обеспечивает синтеза белка с мРНК-конструкции в мышечных клетках.

4. Впервые показано, что введение «голой» мРНК лабораторным животным с помощью струйной инжекции обеспечивает высокий уровень как экспрессии целевого гена, так и его иммуногенности:

a. На модели мРНК-GFP показано, что наибольший уровень экспрессии гена *gfp* в клетках мышц животного с минимальной травматичностью достигается при введении препарата под прямым углом, скорость струи 220 метров в секунду, давление 6,5 бар, время инжекции 0,33 мс.

b. Экспериментальная вакцина мРНК-RBD при введении мышам с помощью струйной инжекции вызывает более высокий гуморальный иммунный ответ по сравнению с В/М введением и вызывает сопоставимые иммунные реакции с мРНК, инкапсулированной в липидные наночастицы. Анализ Т-клеточного иммунного ответа показал, что струйная инжекция приводит к достоверному увеличению спотобразующих клеток на 10^6 клеток по сравнению с внутримышечным введением и трехкратному – по сравнению с мРНК-RBD-ЛНЧ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Kisakov D.N.,** Kisakova L.A., Borgoyakova M.B., Starostina E.V., Taranov O.S., Ivleva E.K., Pyankov O.V., Zaykovskaya A.V., Shcherbakov D.N., Rudometov A.P., Rudometova N.B., Volkova N.V., Gureev V.N., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. Optimization of *in vivo* Electroporation Conditions and Delivery of DNA Vaccine Encoding SARS-CoV-2 RBD Using the determined Protocol // Pharmaceutics. 2022. V. 14. № 11. Art. no 2259. DOI: 10.3390/pharmaceutics14112259.
2. **Kisakov D. N.,** Belyakov I.M., Kisakova L.A., Yakovlev V.A., Tigeeva E.V., Karpenko L.I. The use of electroporation to deliver DNA-based vaccines // Expert Review of Vaccines. 2024. V. 23. № 1. P. 102–123. DOI: 10.1080/14760584.2023.2292772.
3. **Кисаков Д.Н.,** Кисакова Л.А., Шарабрин С.В., Яковлев В.А., Тигеева Е.В., Боргоякова М.Б., Старостина Е.В., Зайковская А.В., Рудометов А.П., Рудометова Н.Б., Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Доставка экспериментальной мРНК-вакцины, кодирующей RBD SARS-COV-2 с помощью струйной инжекции // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2023. Т. 176. № 12. С. 751–756. DOI: 10.47056/0365-9615-2023-176-12-751-756.
4. **Kisakov D.N**., Karpenko L.I., Kisakova L.A., Sharabrin S.V., Borgoyakova M.B., Starostina E.V., Taranov O.S., Ivleva E.K., Pyankov O.V., Zaykovskaya A.V., Dmitrienko E.V., Yakovlev V.A., Tigeeva E.V., Bauer I.A., Krasnikova S.I., Rudometova N.B., Rudometov A.P., Sergeev A.A., Ilyichev A.A. 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. 2025. V. 13. № 1. Art. no 65. DOI: 10.3390/vaccines13010065.
5. **Kisakov D. N.,** Borgoyakova M. B., Kisakova L. A., Starostina E. V., Pyankov O. V., Zaykovskaya A. V., Taranov O. S., Ivleva E. K., Rudometova N. B., Yakovlev V. A., Tigeeva E. V., Azaev M. Sh., Belyakov I. M., Rudometov A. P., Ilyichev A. A., and Karpenko L. I. Immunization of mice with the pVAXrbd DNA vaccine by jet injection induces a stronger immune response and protection against SARS-CoV-2 compared to intramuscular injection by syringe // Molecular Biology. 2025. Vol. 59. No. 3. pp. 402–415. DOI: 10.1134/S0026893325700074.