

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ
В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА

на правах рукописи

Литвинова Виктория Руслановна

Разработка экспериментальных вакцин на основе нуклеиновых кислот
против высокопатогенного гриппа подтипа H5N8

1.5.3 – Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук
Рудомётов Андрей Павлович

Кольцово – 2026

Оглавление

Список используемых сокращений	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИН ПРОТИВ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМОГО ВИРУСОМ ГРИППА А (Н5) 12	
1.1 Вирус высокопатогенного гриппа А (Н5) клады 2.3.4.4b как актуальная пандемическая угроза и современные вакцинные платформы	12
1.2 Платформа ДНК-вакцин	18
1.3 Платформа мРНК-вакцин	26
1.4 Стабилизация тримерной структуры НА в ДНК- и мРНК-вакцинах	35
1.5 Заключение.....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1 Материалы.....	42
2.1.1 Штаммы бактерий, штаммы вируса, культуры клеток, плазмиды	42
2.1.2 Олигонуклеотиды.....	42
2.1.3 Синтетические пептиды.....	43
2.1.4 Коммерческие наборы, ферменты, реактивы	43
2.1.5 Питательные среды	45
2.1.6 Растворы и буферы	46
2.2 Методы	46
2.2.1 Дизайн гена	46
2.2.2 Моделирование структуры белков.....	46
2.2.3 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	47
2.2.4 Выделение плазмидной ДНК из бактериальной культуры.....	47
2.2.5 Аналитический электрофорез в агарозных гелях	47
2.2.6 Выделение ДНК из агарозного геля.....	47
2.2.7 Измерение концентрации нуклеиновых кислот	47

2.2.8 Получение ПЦР-продуктов последовательностей H5 stebl, H5 delT4 и H5 для клонирования в составе pVAX1 и в составе pVAX-Cas1	48
2.2.9 Ферментативный гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции	48
2.2.10 Лигирование фрагментов ДНК.....	49
2.2.11 Отбор клонов.....	49
2.2.12 Секвенирование ДНК.....	49
2.2.13 Трансфекция клеток HEK293	50
2.2.14 ОТ-ПЦР	50
2.2.15 Вестерн-блот	50
2.2.16 Подготовка матрицы для синтеза мРНК.....	51
2.2.17 Синтез мРНК <i>in vitro</i>	51
2.2.18 Синтез липидных наночастиц	52
2.2.19 Определение гидродинамического размера и ζ -потенциала комплексов mRNA-H5-LNP	53
2.2.20 Определение степени инкапсуляции мРНК в LNP.....	53
2.2.21 Электронная микроскопия препаратов mRNA-H5-LNP	54
2.2.22 Иммунизация мышей линии BALB/c.....	54
2.2.23 Иммуноферментный анализ (ИФА)	57
2.2.24 Вируснейтрализующая активность иммунных сывороток	57
2.2.25 Оценка Т-клеточного ответа методом ELISpot	58
2.2.26 Исследование протективности ДНК-вакцины pVAX-H5	58
2.2.27 Исследование протективности мРНК-вакцины mRNA-H5.....	59
2.2.28 Статистический анализ	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	60
3.1 Дизайн иммуногенов для ДНК- и мРНК-вакцин.....	60
3.2 Получение экспериментальных ДНК-вакцин, несущих модифицированный гемагглютинин H5 и его фрагменты	64

3.3 Анализ экспрессии целевых генов в составе полученных ДНК-вакцин.....	68
3.4 Анализ иммуногенных и протективных свойств полученных ДНК-вакцин	70
3.5 Получение мРНК-вакцины mRNA-H5.....	79
3.6 Получение мРНК mRNA-H5, инкапсулированной в LNP	83
3.7 Анализ иммуногенных и протективных свойств мРНК-вакцины mRNA-H585	
3.8 Заключение.....	88
ВЫВОДЫ.....	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	92

Список используемых сокращений

- AEC – 3-амино-9-этилкарбазол (3-amino-9-ethylcarbazole)
- ARCA – антиреверсивный аналог кэпа (anti-reverse cap analog)
- BSA – бычий сывороточный альбумин (bovine serum albumin)
- CMV – цитомегаловирус (cytomegalovirus)
- FBS – фетальная бычья сыворотка (fetal bovine serum)
- FDA – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration)
- HA – гемагглютинин (hemagglutinin)
- IFN γ – интерферон гамма (interferon gamma)
- IL – интерлейкин (interleukin)
- LAMP-1 – гликопротеин лизосомальной мембраны (lysosomal-associated membrane protein 1)
- LNP – липидные наночастицы (lipid nanoparticles)
- MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex)
- NA – нейраминидаза (neuraminidase)
- NLS – сигнал ядерной локализации (nuclear localization signal)
- ORF – открытая рамка считывания (open reading frame)
- PABP – поли(А)-связывающий белок (poly(A)-binding protein)
- PdI – индекс полидисперсности (polydispersity index)
- PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate-buffered saline)
- PBST – фосфатно-солевой буфер с Tween-20 (phosphate-buffered saline with Tween-20)
- RBS – сайт связывания рецептора (receptor binding site)
- SDS-ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
- SFCs – клетки, образующие пятна (spot-forming cells)
- TEMED – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
- Th – Т-хелпер (T-helper)
- TLR – Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors)
- TMB – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)
- TNF- α – фактор некроза опухоли-альфа (tumor necrosis factor-alpha)

UTR – нетранслируемая область (untranslated region)

А. о. – аминокислотные остатки

АПК – антигенпрезентирующие клетки

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ВППГ – высокопатогенный птичий грипп

ДК – дендритная клетка

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Е. а. – единица активности

ИФА – иммуноферментный анализ

ЛД₅₀ – 50 %-ная летальная доза

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НППГ – низкопатогенный птичий грипп

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПААГ – полиакриламидный гель

П. о. – пара оснований

ПСА – пероксодисульфат аммония

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

СИ – струйная инъекция

С. о. – стандартное отклонение

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» – Федеральное бюджетное учреждение науки

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭИД₅₀ – 50 %-ная эмбриональная инфекционная доза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Разработка вакцин для профилактики заболевания, вызываемого высокопатогенным вирусом гриппа А (H5) клады 2.3.4.4b, является актуальной задачей из-за опасений по поводу его пандемического потенциала. По состоянию на 7 июля 2026 года зафиксировано 1000 случаев заражения человека, из которых 479 привели к смертельному исходу (смертность составила 47,9 %). Сообщалось о случаях заражения данным вирусом более 70 видов диких и домашних млекопитающих, в частности близко контактирующих с человеком, например крупного рогатого скота, кошек и свиней. Также заражение высокопатогенным вирусом птичьего гриппа А (H5) привело к гибели или выбраковке более 633 миллионов голов домашней птицы во всем мире в период с 2005 по 2024 год, что нанесло серьезный экономический ущерб птицеводческой отрасли. Дальнейшая циркуляция высокопатогенного вируса гриппа А (H5) среди птиц и млекопитающих представляет угрозу появления нового варианта вируса, способного передаваться от человека к человеку, и приводит к появлению опасений по поводу возможной пандемии. В связи с этим ВОЗ призывает к активизации усилий по разработке соответствующих вакцин.

Основным поверхностным белком вируса гриппа является гемагглютинин. Он служит мишенью для нейтрализующих антител, которые блокируют проникновение вируса в клетку, и по этой причине является основным компонентом вакцин против гриппа. Важным условием обеспечения высокой эффективности вакцин на основе гемагглютинина является стабилизация белка-иммуногена в нативной префузионной конформации. Для этого используется ряд модификаций нативной последовательности: мутации в рН-чувствительных областях гемагглютинина, замена сайта протеолиза высокопатогенного вируса гриппа, добавление тримеризующего домена и другие. Сочетание таких модификаций позволяет правильно представить антиген иммунной системе.

Из-за высокой изменчивости вируса гриппа возникает потребность в разработке новых типов вакцинных платформ. Наиболее перспективными из них являются вакцины на основе нуклеиновых кислот – мРНК- и ДНК-вакцины. Эти вакцины обладают рядом важных преимуществ перед другими типами вакцин, включая стимуляцию гуморального и Т-клеточного ответа, скорость разработки, а также относительную простоту и

универсальность крупномасштабного производства. Вакцины на основе нуклеиновых кислот не вызывают нежелательного антивекторного иммунного ответа, характерного для вакцин на основе вирусных векторов. Таким образом, вакцины на основе нуклеиновых кислот отличаются удобным производством, высокой безопасностью и эффективной активацией иммунного ответа, что делает их подходящим инструментом для борьбы с заболеванием, вызываемым высокопатогенным вирусом гриппа А (H5).

Цель данной работы заключалась в разработке экспериментальных ДНК- и мРНК-вакцин против заболевания, вызываемого высокопатогенным вирусом гриппа А (H5), и анализе их иммуногенных и протективных свойств.

Задачи исследования

1. Провести дизайн иммуногенов на основе гемагглютиниона вируса гриппа А (H5) клады 2.3.4.4b и получить экспериментальные ДНК-вакцины, кодирующие спроектированные иммуногены.
2. Провести сравнительный анализ иммуногенности экспериментальных ДНК-вакцин, введенных методом струйной инъекции, на мышах линии BALB/c.
3. Провести расширенный анализ иммуногенных свойств ДНК-вакцины pVAX-H5: изучить дозозависимый эффект, исследовать формирование Т-клеточного иммунного ответа и изучить протективные свойства ДНК-вакцины в отношении штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1).
4. Сконструировать ДНК-матрицу pVAX-Cas1CC-H5, кодирующую последовательность модифицированного гемагглютиниона вируса гриппа А (H5); с использованием ДНК-матрицы провести синтез мРНК mRNA-H5, инкапсулировать синтезированную мРНК в липидные наночастицы.
5. Исследовать формирование гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на мРНК-вакцину mRNA-H5, вводимую мышам линии BALB/c с помощью струйной инъекции и в составе липидных наночастиц; изучить протективные свойства mRNA-H5 в отношении штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

Научная новизна и практическая ценность работы

Спроектирован иммуноген H5, представляющий собой модифицированный гемагглютинин штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) со

стабилизирующими мутациями. На основе иммуногена H5 получена экспериментальная ДНК-вакцина pVAX-H5, обеспечивающая внутриклеточный синтез белка-антигена – гемагглютиниона высокопатогенного вируса гриппа птиц подтипа А (H5N8). Показано, что введение ДНК-вакцины pVAX-H5, кодирующей спроектированный иммуноген H5, приводит к формированию гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей линии BALB/c и обеспечивает защиту животных от гибели при заражении штаммами вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1). Получен патент на изобретение РФ № 2832515 от 24.12.2024.

На основе иммуногена H5 получена ДНК-матрица pVAX-Cas1CC-H5 и экспериментальная мРНК-вакцина mRNA-H5, обеспечивающая внутриклеточный синтез белка-антигена – гемагглютиниона высокопатогенного вируса гриппа птиц подтипа А (H5N8). Показаны иммуногенные и протективные свойства mRNA-H5 в отношении штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1) на мышках линии BALB/c.

Данная работа имеет значительную практическую ценность, поскольку разрабатываемые вакцины могут быть использованы как для людей в случае возникновения эпидемиологической угрозы, так и в ветеринарии для профилактики заболевания птиц. Технология получения вакцин на основе нуклеиновых кислот позволит быстро реагировать на возникновение пандемии, вызванной вирусом гриппа А (H5), поскольку в случае необходимости дает возможность быстро проводить замену целевого гена без изменения технологии производства.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Последовательность гена H5, кодирующая модифицированный гемагглютинин вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) со стабилизирующими мутациями, обеспечивает правильную презентацию иммуногена иммунной системе.
2. Экспериментальная ДНК-вакцина pVAX-H5, вводимая методом струйной инъекции, обеспечивает формирование гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей линии BALB/c и защищает животных от гибели при заражении 50 ЛД₅₀ штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1).

3. Экспериментальная мРНК-вакцина mRNA-H5, кодирующая ген H5, вводимая методом струйной инъекции и в составе липидных наночастиц, обеспечивает формирование гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей линии BALB/c и защищает животных от гибели при заражении 20 ЛД₅₀ штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

Степень достоверности и апробация

Достоверность результатов подтверждается повторяемостью и воспроизводимостью, использованием статистического анализа данных. Результаты диссертации представлены в 17 публикациях: в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, в том числе входящих в Перечень ВАК и соответствующих специальности «Молекулярная биология», 11 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях, получен 1 патент РФ на изобретение.

Результаты диссертации представлены на международных и российских конференциях, в том числе на X Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков OpenBio (Кольцово, Россия, 2023 год), на X Юбилейном конгрессе Евро-Азиатского общества по инфекционным болезням (г. Санкт-Петербург, Россия, 2024 год, доклад отмечен первым местом в конкурсе молодых ученых), на Гомельском международном конгрессе «Инфекционные болезни, микробиология и иммунология» (г. Гомель, Беларусь, 2025 год).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа включает введение, литературный обзор, описание материалов и методов, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Работа изложена на 105 страницах, включает 32 рисунка, 4 таблицы. Список литературы состоит из 162 источников.

Личный вклад автора

Все молекулярно-биологические работы, включающие клонирование, получение и наработку экспериментальных ДНК- и мРНК-вакцин, анализ экспрессии целевых генов в составе ДНК-вакцин методами ОТ-ПЦР и вестерн-блот анализа, а также статистическая обработка полученных данных выполнены лично автором. Дизайн иммуногенов, работа с клеточными культурами, иммунизация лабораторных животных, анализ

иммуногенности вакцин методами ИФА и ELISpot выполнены при участии автора сотрудниками отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора. Работа с живым вирусом в реакции вируснейтрализации и в анализе протективных свойств вакцин выполнена сотрудниками отдела зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Секвенирование полученных ДНК-конструкций проведено сотрудниками центра коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИН ПРОТИВ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМОГО ВИРУСОМ ГРИППА А (H5)

В данном литературном обзоре представлено описание современных вакцинных платформ, предназначенных для борьбы с заболеванием, вызываемым вирусом гриппа А (H5). В начале обзора приведена краткая классификация и история появления вируса гриппа А (H5), затем подробно описываются вакцинные платформы на основе нуклеиновых кислот, подходы к дизайну вакцин и их преимущества и недостатки. Далее рассматриваются различные способы стабилизации целевого иммуногена для правильного представления иммунной системе.

1.1 Вирус высокопатогенного гриппа А (H5) класы 2.3.4.4b как актуальная пандемическая угроза и современные вакцинные платформы

Вирус птичьего гриппа относится к виду *Alphainfluenzavirus influenzae*, роду *Alphainfluenzavirus*, семейству *Orthomyxoviridae* (Xie R. *et al.*, 2023; Жирнов О. П. и др., 2024). Он является одноцепочечным отрицательно-полярным оболочечным РНК-вирусом; вирусный геном включает в себя 8 сегментов, кодирующих структурные и неструктурные/регуляторные белки (Luczo J. M. *et al.*, 2025). Рибонуклеопротеин включает РНК-зависимый РНК-полимеразный комплекс, образованный ассоциацией трех полимеразных белков: полимераз основных PB1 и PB2 и полимеразы кислой PA, и вирусную геномную РНК, инкапсулированную в нуклеопротеиновые молекулы NP. Вирионы вируса гриппа А имеют оболочку диаметром 50-120 нм и шиповидные выступы на ее внешней поверхности, состоящие из двух поверхностных гликопротеинов: гемагглютиниона (HA) и нейраминидазы (NA), а также на поверхности находится встроенный в липидную оболочку ионный канал M2 (рисунок 1.1) (Chauhan R. P. *et al.*, 2022).

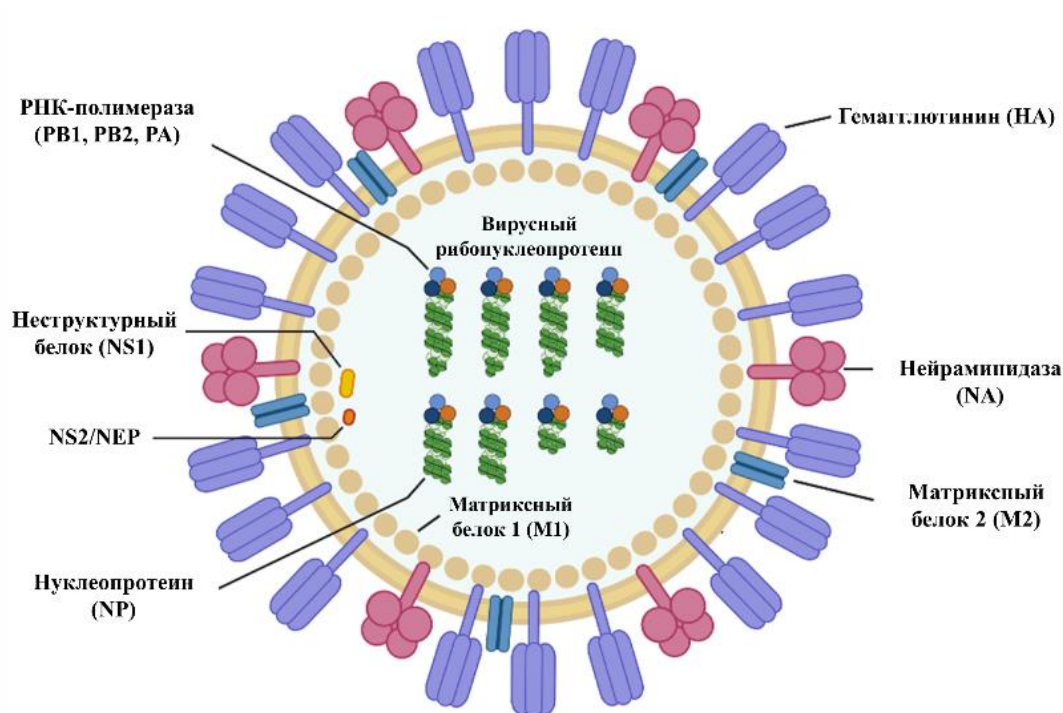


Рисунок 1.1 – Схематическое изображение вириона вируса гриппа (адаптировано из Jung H. E. *et al.*, 2020).

Вирусы гриппа типа А классифицируют на основе антигенных свойств их поверхностных гликопротеинов – HA и NA. Выделяют 19 подтипов гемагглютинина (H1–H19) и 11 подтипов нейраминидазы (N1–N11), при этом природным резервуаром подтипов H17N10 и H18N11 являются летучие мыши (Chen Y. *et al.*, 2022; Peng P. *et al.*, 2025). Считалось, что единственными рецепторами для проникновения вируса гриппа типа А в клетку являются рецепторы на основе сиаловой кислоты (Zhao C. *et al.*, 2022), однако для открытых впоследствии подтипов H17–H19 было показано использование в качестве рецептора белка главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса II (Giotis E. S. *et al.*, 2019; Karakus U. *et al.*, 2024).

Поверхностный гликопротеин HA играет важную роль в жизненном цикле вируса гриппа. HA участвует в двух основных процессах проникновения вируса в клетку: связывании с фрагментами сиаловой кислоты на поверхности клеток-мишеней и слиянии вирусной и эндосомальной мембран для высвобождения вирусного генома в клетку-мишень. HA синтезируется в виде единой полипептидной цепи – белка-предшественника HA0, который принимает определенную конформацию и собирается в гомотримеры. HA0 является неактивной формой, которая необходима для предотвращения преждевременного слияния, и для выполнения своих функций должен быть расщеплен с

помощью протеаз на субъединицы в определенном месте, называемом сайтом протеолиза.

В зависимости от тяжести вызываемого заболевания у кур вирус птичьего гриппа подразделяют на высоко- и низкопатогенный (ВППГ и НППГ соответственно). Из всех подтипов к вирусу ВППГ относятся только некоторые виды вируса подтипов А (Н5) и А (Н7). Ключевое различие между вирусом ВППГ и НППГ заключается в структуре сайта протеолиза гемагглютинина. У вирусов НППГ сайт протеолиза представляет собой моноосновный участок, состоящий из аргинина или, реже, лизина, в то время как вирус ВППГ имеет полиосновный сайт протеолиза, чаще всего состоящий из нескольких остатков аргинина и лизина (например, KRRKR) (Жирнов О. П. и др., 2024; Esaki M. *et al.*, 2025). Структурой сайта протеолиза определяется специфичность к определенным протеазам и место протеолиза. Так, по моноосновному сайту протеолиза НА вирус НППГ расщепляется вне клетки на клеточной плазматической мембране исключительно трипсиноподобными протеазами. Такие протеазы секретируются только эпителием легких и желудочно-кишечного тракта, что приводит к локальным инфекциям и, следовательно, более легкому течению заболевания. Полиосновный же сайт вируса ВППГ расщепляется внутриклеточно в аппарате Гольджи убиквитарными протеазами фуринового ряда, которые имеются в различных типах клеток; такие особенности протеолиза приводят к системному заболеванию с более высоким процентом летального исхода (Graziosi G. *et al.*, 2024).

Исторически вирус птичьего гриппа естественным образом циркулировал среди диких водоплавающих птиц в виде низкопатогенных форм, а случаи ВППГ среди диких птиц регистрировались лишь эпизодически. Однако появление в 1996 году в Китае вируса ВППГ А (Н5) штамма A/Goose/Guangdong/1/1996 (Gs/Gd) стало переломным моментом (Chen H. *et al.*, 2006; Kuiken T. *et al.*, 2026). Этот штамм распространился среди домашней птицы, а в 2002 году появились первые сообщения о его передаче диким птицам. Со временем линия Gs/Gd ВППГ А (Н5) разделилась на несколько клад, при этом клад 2 чаще всего обнаруживается у диких птиц. В 2020-2021 годах распространение штамма ВППГ А (Н5) клад 2.3.4.4b переросло в глобальную панзоотию, вызванную в основном вирусом подтипа А (Н5N8) (Rafique S. *et al.*, 2023; Calle-Hernández D. M. *et al.*, 2023). В последующих волнах пандемии доминировал подтип А (Н5N1). В целом с 2020 года вирус ВППГ А (Н5) распространился по всему миру, достигнув более 76 стран Европы,

Азии, Африки, Северной и Южной Америки и Антарктиды, вызвав массовую гибель диких птиц, серьезные вспышки среди домашней птицы и все более активное распространение на млекопитающих (рисунок 1.2). Особую тревогу вызывает рост числа случаев заражения млекопитающих вирусом гриппа А (H5), поскольку это вызывает опасения по поводу адаптации вируса к новому хозяину и представляет угрозу для общественного здравоохранения (Charostad J. *et al.*, 2023; Couty M. *et al.*, 2026).

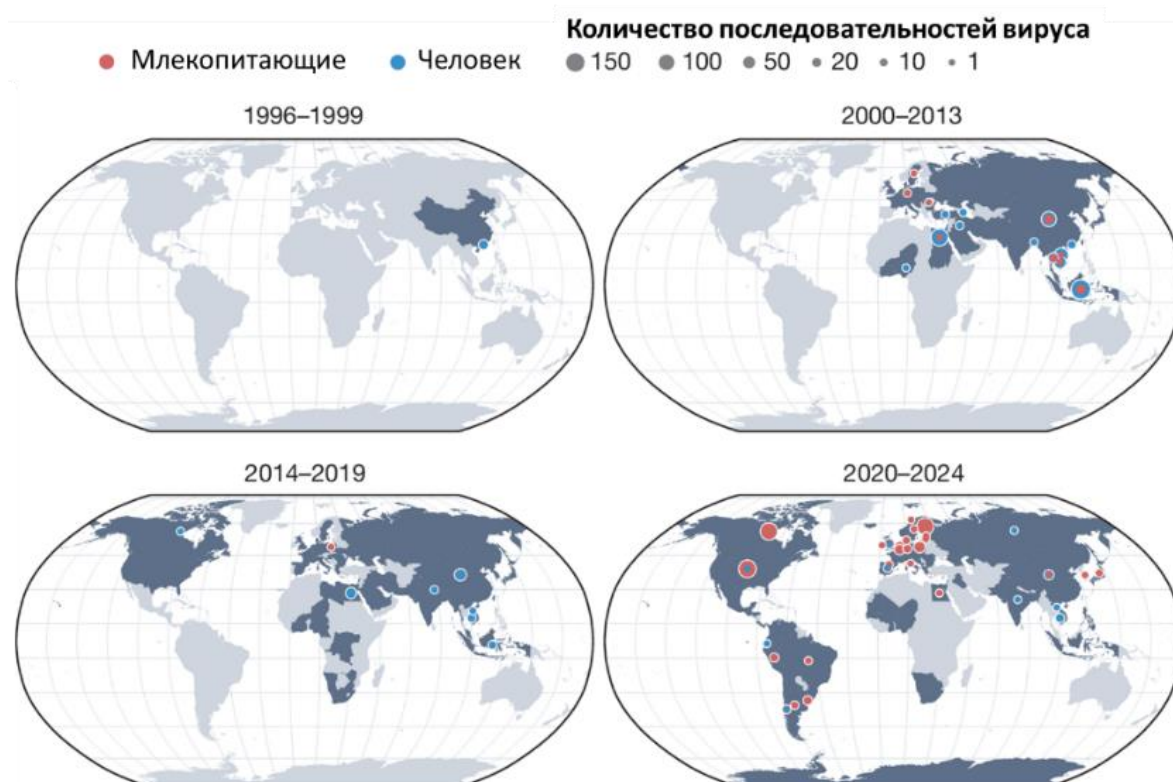


Рисунок 1.2 – Распространение вируса гриппа А (H5), обнаруженного у птиц и млекопитающих в период с 1996 по 2024 год. Темно-серым цветом обозначены страны, в базе данных GISAID которых есть последовательности вируса гриппа А (H5), в частности из линии A/goose/Guangdong/1/1996(H5N1) (Gs/Gd), возникшей в Китае в 1996 году. Синие (человек) и красные (млекопитающие, кроме человека) круги имеют размер, пропорциональный количеству последовательностей А (H5) в базе данных GISAID из данной страны за данный период (адаптировано из Peacock T. P. *et al.*, 2025).

Вспышка вируса гриппа А (H5N1) среди молочного скота в США в 2024 году представила новую серьезную эпидемиологическую угрозу, означающую переход заболевания в более опасную фазу. В ходе этой вспышки, затронувшей более 200 стад, была продемонстрирована эффективная передача вируса от коровы к корове через доильное оборудование и была выявлена высокая вирусная нагрузка в молоке. Это

доказывает, что крупный рогатый скот является восприимчивым к вирусу, что означает появление нового потенциально опасного пути заражения человека (например, среди работников ферм) и предоставляет вирусу новую среду для адаптации к дальнейшему распространению среди млекопитающих. В то же время случаи заражения более чем 70 видов диких и домашних млекопитающих – от лисиц до морских млекопитающих – свидетельствуют о расширении круга хозяев вируса (Kim D. H. *et al.*, 2025; Mohammad I. *et al.*, 2026). Несмотря на то, что вирус гриппа А (H5N1) способен заражать млекопитающих, он еще не полностью адаптирован к человеческому организму и не может эффективно передаваться внутри человеческой популяции. Однако было показано, что несколько аминокислотных замен в белке основной полимеразы PB2, в частности замена E627K, способствуют адаптации вируса к организму человека (Marchenko V. Y. *et al.*, 2024; Fusade-Boyer M. *et al.*, 2026).

Из-за высокой изменчивости вируса гриппа возникает потребность в разработке подходящих вакцинных платформ. В последнее время все больше внимания привлекают вакцины на основе нуклеиновых кислот, показавшие многообещающие результаты в клинических испытаниях для лечения и профилактики различных заболеваний, в том числе вирусных инфекций и рака. По сравнению с традиционными белковыми и вирусными вакцинами они обладают определенными преимуществами. Их разработка и производство – быстрый и легко масштабируемый процесс, не требующий длительного культивирования в куриных эмбрионах или клеточных линиях, что может быть особенно актуально в условиях надвигающейся пандемии. Отсутствие инфекционных агентов в процессе производства также исключает риски, связанные с неполной инаktivацией или очисткой вируса, и обеспечивает высокую безопасность для человека (Pardi N. *et al.*, 2018). Важно отметить, что вакцины на основе нуклеиновых кислот позволяют избежать адаптации вируса к репликации в яйцах, которая приводит к изменениям в ключевых антигенных участках и препятствует формированию защитного иммунного ответа (Deviatkin A. A. *et al.*, 2022). Кроме того, генетическую последовательность таких вакцин можно легко модифицировать для борьбы с конкретными патогенами и заболеваниями, что позволяет адаптировать их к новым инфекционным заболеваниям и быстро эволюционирующим патогенам, а также создавать персонализированные вакцины для лечения рака (Wang C. *et al.*, 2024).

К вакцинам на основе нуклеиновых кислот относятся ДНК- и мРНК-вакцины. Обе платформы используют собственные механизмы синтеза белка в организме хозяина для производства антигенов – иммуногенных белков, которые распознаются иммунной системой хозяина и вызывают специфический иммунный ответ. Этот процесс имитирует естественную инфекцию, не вызывая заболевания, и приводит к формированию сбалансированного иммунитета. Помимо вышеперечисленных преимуществ, целевой белок-иммуноген, синтезируемый в клетках организма, способен взаимодействовать с молекулами главного комплекса гистосовместимости I и II классов, вызывая как клеточный, так и гуморальный ответ иммунной системы. Это отличает их от белковых вакцин, которые менее эффективно стимулируют CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты, для активации которых требуется презентация антигена через МНС-I (Xu L. *et al.*, 2024; Zhang N. *et al.*, 2025).

Из-за схожего принципа работы преимущества и недостатки ДНК- и мРНК-вакцин во многом совпадают, однако существуют и некоторые принципиальные различия. Плазмидная ДНК значительно стабильнее линейной мРНК и может храниться при относительно более высоких температурах. мРНК-вакцины, напротив, нестабильны, чувствительны к разрушению нуклеазами и требуют строгого соблюдения холодовой цепи, что усложняет логистику и ограничивает их применение в странах, не имеющих подходящей инфраструктуры. Это делает платформу мРНК-вакцин неприменимой в настоящее время для борьбы с тропическими болезнями, например с лихорадкой денге. Кроме того, экзогенные мРНК подвержены разрушению под действием РНКаз клеток-хозяев, в то время как плазмиды ДНК могут оставаться в ядре клетки-хозяина более продолжительное время (Uddin M. N. *et al.*, 2021; Neeli P. *et al.*, 2025)

Еще одно отличие касается длины кодируемых белков. ДНК как более стабильная молекула способна нести более длинные генетические последовательности (до нескольких тысяч нуклеотидов). Таким образом, ДНК-вакцины идеально подходят для одновременной доставки антигенных последовательностей и других генетических последовательностей, кодирующих дополнительные модуляторы иммунного ответа. Длина мРНК-вакцин часто ограничена из-за проблем очистки, стабильности и доставки длинных молекул мРНК. Предпочтение отдается более коротким последовательностям, которые демонстрируют более высокую эффективность трансляции и меньший риск

деградации, что крайне важно для производства вакцин и обеспечения надлежащей иммуногенности (Cagigi A. *et al.*, 2023).

мРНК-вакцины также имеют ряд преимуществ по сравнению с плазмидной ДНК, которые являются следствием фундаментального отличия принципа действия мРНК и ДНК при продукции целевых белков. Суть действия мРНК заключается в том, что генетическая информация, закодированная в них, реализуется в цитозоле клетки; этот процесс при наличии эффективной системы доставки обеспечивает чрезвычайно высокую и быструю продукцию целевого белка. Также благодаря этому крайне мала вероятность интеграции мРНК в геном хозяина (Kwon H. *et al.*, 2018; Gómez-Aguado I. *et al.*, 2020). В то же время ДНК-вакцине необходимо попасть в ядро клетки для реализации генетической информации. Хотя многочисленные клинические испытания подтвердили безопасность ДНК-вакцин, а случаи интеграции встречаются значительно реже естественных мутаций, суть действия ДНК-вакцин порождает теоретические опасения насчет инсерционного мутагенеза, способного активировать онкогены или инактивировать гены-супрессоры опухолей, а также возможной хромосомной нестабильности. Однако важно подчеркнуть, что ни одно из этих опасений не подтвердилось в ходе доклинических и клинических испытаний ДНК-вакцин (Cagigi A. *et al.*, 2023).

Таким образом, вакцины на основе нуклеиновых кислот отличаются удобным производством, высокой безопасностью и эффективной активацией иммунного ответа, что делает их подходящим инструментом для борьбы с заболеванием, вызываемым высокопатогенным вирусом гриппа А (H5). Далее будут рассмотрены особенности платформы вакцин на основе ДНК.

1.2 Платформа ДНК-вакцин

ДНК-вакцина представляет собой последовательность ДНК, кодирующую целевой антиген, под контролем эукариотического промотора, обеспечивающего экспрессию гена в клетке-хозяине. На сегодняшний день большая часть ДНК-вакцин состоит из бактериальных плазмид – небольших кольцевых молекул, изначально полученных из бактерий – модифицированных для экспрессии генов в эукариотических клетках путем подбора соответствующих промоторных и терминаторных последовательностей (Martínez-Puente D. H. *et al.*, 2022). Помимо целевого гена, плазмиды также содержат промотор транскрипции, сигнальную последовательность полиаденилирования, точку

начала репликации (ориджин репликации) и сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции для встройки целевого гена (рисунок 1.3). Кроме того, плазмиды могут содержать маркер для селекции антибиотиками, позволяющий выращивать бактериальные клетки и манипулировать ими (Kozak M. *et al.*, 2024).



Рисунок 1.3 – Схема структурных частей плазмидной ДНК-вакцины (адаптировано из Kutzler M. A. *et al.*, 2008).

Важную роль в обеспечении эффективности и иммуногенности ДНК-вакцины играет промотор. Было показано, что вирусные промоторы, в частности промотор цитомегаловируса (CMV) человека, наиболее часто используемый в ДНК-вакцинах, обеспечивают более высокую экспрессию генов по сравнению с другими эукариотическими промоторами (Okuda K. *et al.*, 2014). Однако метилирование вирусных промоторов является одной из основных причин прекращения экспрессии гена. Для решения этой проблемы могут быть использованы промоторы, содержащие компоненты, которые могут предотвратить метилирование, например промоторы элонгационного фактора 1-альфа (EF1 α) или гибридный промотор CAG, представляющий собой химерный промотор CMV с интроном куриного β -актина (Samoylov A. *et al.*, 2019). Одним из преимуществ ДНК-вакцин является возможность выбирать энхансеры/промоторы, специфичные для конкретного типа клеток, например для антигенпрезентирующих клеток (АПК) (Berger S. *et al.*, 2024).

Энхансеры представляют собой последовательности ДНК, которые могут усиливать транскрипцию генов. Как правило, они функционируют независимо от

ориентации и на разном расстоянии от целевого промотора (Pennacchio L. A. *et al.*, 2013). Энхансеры можно размещать в некодирующих областях ДНК-вакцины для повышения экспрессии целевого гена. Кроме того, генетический материал ДНК-вакцины должен сначала попасть в ядро для последующей транскрипции генов, кодирующих антигены или генетические адъюванты. Затем транскрибированная мРНК экспортируется из ядра в цитоплазму для трансляции. Эффективный транспорт ДНК-вакцины в ядро клетки является важным условием для экспрессии целевого гена, особенно в митотически неактивных клетках, таких как АПК. Некоторые последовательности ДНК, такие как энхансер вируса обезьян SV40, имеют сигнал ядерной локализации (NLS), и связывание специфических факторов транскрипции с NLS в цитоплазме приводит к активному ядерному транспорту ДНК. Также добавление в ДНК-вакцины тканеспецифичных последовательностей, связывающих транскрипционные факторы, позволяет осуществлять транспорт ДНК в ядро клеток определенных тканей (Shafaati M. *et al.*, 2022).

Важным технологическим этапом в дизайне ДНК-вакцин является оптимизация кодонов, позволяющая адаптировать чужеродный (например, вирусный) ген под клетки организма-мишени (человека или животного). Введение чужеродных генов в организмы без надлежащей оптимизации кодонов может привести к ошибкам, снижению эффективности трансляции и уменьшению выхода белка. Также повышается риск образования неправильно свернутых или нефункциональных белков, что ухудшает качество вакцин (Chowdhury T. *et al.*, 2025). Оптимизация кодонов возможна за счет избыточности генетического кода, то есть существования нескольких вариантов кодонов для одной аминокислоты (Paremskaia A. I. *et al.*, 2024). Суть оптимизации состоит в замене кодонов из гена на кодоны в клетках организма-мишени, которым соответствуют более распространенные тРНК, без изменения аминокислотной последовательности кодируемого белка. Это позволяет добиться наиболее эффективной продукции целевого белка. Например, на мышинной модели было показано, что оптимизация кодонов гена гемагглютинина H1 в ДНК-вакцине значительно (в 4 раза) повысила экспрессию целевой мРНК и последующую продукцию целевого белка, что привело к усилению клеточного и гуморального иммунного ответа по сравнению с неоптимизированной последовательностью. У мышей, иммунизированных оптимизированной ДНК-вакциной, наблюдалось увеличение выработки интерферона-гамма (IFN γ) и специфических к гемагглютинину антител (Anurogo D. *et al.*, 2024). Также существуют более современные

подходы к оптимизации кодонов, например увеличение содержания гуанина и цитозина, которое приводит к повышению стабильности мРНК в клетках млекопитающих, улучшает ее процессинг и нуклеоцитоплазматический транспорт. По такому принципу была разработана ДНК-вакцина на основе гемагглютинаина вируса ВППГ А (H5N1), в которой третья позиция кодонов почти на 100 % была представлена G или C; была показана эффективная стимуляция иммунного ответа на двух животных моделях – на мышах и курах (Stachyra A. *et al.*, 2016). Оптимизация кодонов проводится с помощью различных онлайн-ресурсов и программ, в которых можно задавать определенные условия для оптимизации; к таким сервисам относятся JCat, DNA Works, Optimizer, GeMS, Gene Designer, Gene Designer Synthetic, GeneOptimizer, Genewiz и др. (Grote A. *et al.*, 2005; Fu H. *et al.*, 2020).

При проектировании ДНК-вакцины нужно помнить, что плаزمида должна иметь низкую склонность к расщеплению или перестройке во время ферментации, а также к расщеплению или денатурации при экстракции и последующей очистке. Важно исключить такие нетипичные последовательности, как гомопуриновые и гомопиримидиновые участки, инвертированные или прямые повторы, палиндромы, так как они могут быть нестабильны и могут снижать количество копий плазмиды при наработке. Нежелательны последовательности с высоким содержанием аденина и тимина и крестообразные структуры, так как они увеличивают частоту разрезания плазмиды (Williams J. A., 2013).

Помимо эффективности трансляции целевого антигена, на формирование иммунного ответа влияет и его нахождение в определенном компартменте клетки. Локализацию белка определяют сигнальные пептиды – короткие пептидные цепи из 16-30 аминокислотных остатков на N-конце. По некоторым данным, сигнальные пептиды также были обнаружены на C-конце или внутри последовательности белка, и их структура отличается от структуры обычных сигнальных пептидов (Zhang S. *et al.*, 2025). Классические N-концевые сигнальные пептиды имеют структуру, состоящую из трех частей: положительно заряженная N-концевая n-область; короткое гидрофобное ядро, называемое h-областью — чаще всего от 7 до 15 аминокислот, в основном неполярных; и полярная C-концевая c-область, которая содержит сайт узнавания и расщепления сигнальной пептидазой и должна содержать короткие гидрофобные остатки в положениях -1 и -3 относительно сайта расщепления (Liaci A. M. *et al.*, 2021). Часто

сигнальные пептиды применяют для обеспечения клеточной секреции антигенного белка после синтеза (Kim S. J. *et al.*, 2003). Также сигнальные пептиды используют для локализации белка в клетке, в особенности в случае Т-клеточных иммуногенов. Так, в работе (Reguzova A. *et al.*, 2015) в качестве сигнальных пептидов были использованы N-концевой убиквитин и С-концевой тирозиновый мотив белка LAMP-1. N-концевой убиквитин обеспечивает транспорт синтезированного белка в протеасому, после чего его фрагменты могут быть представлены через МНС-I, а С-концевой тирозиновый мотив белка LAMP-1 обеспечивает транспорт антигена в лизосому, что ведет к презентации фрагментов белка через МНС-II. Таким образом, с помощью сигнальных пептидов можно определять локализацию синтезированного белка-иммуногена, что влияет на формирование желаемого иммунного ответа.

Механизм, с помощью которого ДНК-вакцины вызывают иммунный ответ, заключается в активации адаптивного иммунного ответа (рисунок 1.4). Когда плаزمид попадает в клетку, ее ДНК распознается и экспрессируется с помощью собственных клеточных механизмов, в результате чего в клетке, которая ее поглотила, вырабатывается целевой антиген. Далее антиген может либо секретироваться из клетки, либо оставаться внутри клетки и расщепляться на пептиды разной длины. Если белок остался в клетке, это приводит к преимущественной активации клеточного иммунитета. Пептиды представляются на поверхности клетки для взаимодействия с иммунными клетками по одному из двух путей: через МНС-I или через МНС-II. МНС-I, присутствующий во всех клетках с ядром, чаще всего рассматривается как механизм презентации эндогенных антигенов (чаще всего пептидов), а МНС-II — как классический путь представления экзогенных антигенов, таких как антигены бактерий, грибов, простейших и свободных вирусов, которые клетка эндоцитировала (Kozak M. *et al.*, 2024). Сборка комплекса пептида с МНС-I происходит в просвете эндоплазматического ретикулума. Затем комплекс перемещается к поверхности клетки, где происходит его распознавание $CD8^+$ Т-лимфоцитами. В случае МНС-II, которые находятся в везикулах, формирование комплекса происходит при их слиянии с лизосомами, содержащими короткие фрагменты белка-мишени. Образовавшийся комплекс МНС-II-пептид также переносится на мембрану, где его распознают $CD4^+$ Т-лимфоциты, активирующие специфические $CD8^+$ Т-клетки и гуморальный ответ. Если белок попадает во внеклеточное пространство, возможны два пути: его взаимодействие с рецепторами В-клеток и активация

гуморального звена иммунного ответа либо прямое взаимодействие с МНС-II на поверхности других клеток и активация клеточного звена иммунитета (Cheng M. A. *et al.*, 2018; Ильичев А. А. *и др.*, 2020; Ledesma-Feliciano C. *et al.*, 2023).

После представления антигена с помощью МНС происходит активация наивных Т-хелперов (Th) и их дифференцировка. Выделяют несколько фенотипов Т-хелперов, в частности Т-хелперы 1-го типа (Th1) и Т-хелперы 2-го типа (Th2). Th1 продуцируют $IFN\gamma$, IL-2 и $TNF-\alpha$, которые активируют макрофаги и отвечают за клеточный иммунитет и фагоцитарно-зависимые защитные реакции. В отличие от них, Th2 вырабатывают IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13, которые отвечают за формирование антител, активацию эозинофилов и подавление некоторых функций макрофагов, обеспечивая тем самым защитные реакции, не зависящие от фагоцитов (Romagnani S., 1999; Kaiko G. E. *et al.*, 2008).

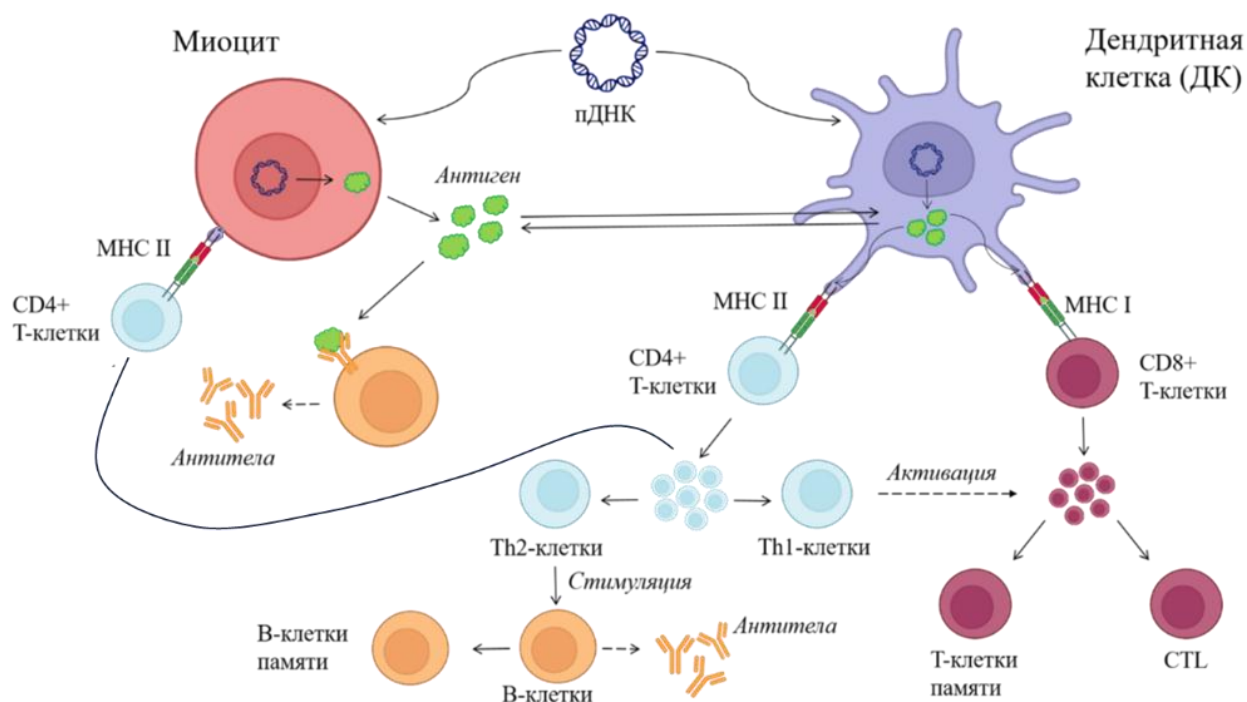


Рисунок 1.4 – Схема формирования гуморального и клеточного иммунного ответа при введении ДНК-вакцины (Fando A. A. *et al.*, 2025).

Сигнал полиаденилирования является важным элементом ДНК-вакцины, так как он обеспечивает стабильность и ядерный экспорт целевого мРНК-транскрипта (Franck C. O. *et al.*, 2021). Сигнал полиаденилирования представляет собой гексамер, чаще всего AAUAAA, расположенный на 3'-конце мРНК. Консенсусная последовательность гексамера – NNUANA; его варианты AAUAAA, A(U/G)UAAA или UAUAAA

встречаются в 79 % мРНК с функциональными гексамерами (Ustyantsev I. G. *et al.*, 2017; Baghban R. *et al.*, 2023). Включение энхансерных последовательностей в области сигнала полиаденилирования так же, как и в промоторной области, улучшает экспрессию целевого гена и, как следствие, эффективность ДНК-вакцины. Например, на практике в ДНК-вакцинах чаще всего используются сигналы полиаденилирования, полученные из генов β -глобина кролика или гормона роста крупного рогатого скота. Эти сигналы содержат дополнительные последовательности выше и ниже сайта полиаденилирования, которые повышают эффективность полиаденилирования, что приводит к улучшению экспрессии гена (Azzoni A. R. *et al.*, 2007; Williams J. A., 2014).

Ген устойчивости к антибиотикам является еще одним важным и часто используемым элементом ДНК-вакцины. Гены устойчивости к антибиотикам позволяют избирательно сохранять плазмидную ДНК при бактериальной ферментации и являются наиболее часто используемыми селективными маркерами. Регулирующие органы, например, FDA, рекомендуют избегать использования генов устойчивости к антибиотикам из-за потенциальной передачи устойчивости к антибиотикам эндогенной микробной флоре и потенциальной активации и транскрипции генов с промоторов млекопитающих после клеточной интеграции в геном, однако таких случаев зафиксировано не было (Luke J. *et al.*, 2009; Reschner A. *et al.*, 2013; Hobernik D. *et al.*, 2018). Также известно, что белок β -лактамаза, которая является продуктом гена устойчивости к ампициллину, может вызывать сильные аллергические реакции, поэтому использовать устойчивость к ампициллину в ДНК-вакцинах нежелательно (Williams J. A., 2014). В качестве альтернативы в современных векторах, например в векторе pVAX1, ген устойчивости к ампициллину заменен геном устойчивости к канамицину, что снижает вероятность возникновения аллергических реакций (Han Y. G. *et al.*, 2016).

В последние годы были разработаны платформы ДНК-вакцин, в которых не используются гены устойчивости к антибиотикам. Подобные системы делят на разные виды по типу действия, например на основе механизмов постсегрегационной гибели, РНК-интерференции, хромосомной интеграции и других. Принцип действия является общим для всех систем: если бактерия получает плазмидную ДНК – она размножается, если нет – роста не происходит (Mignon C. *et al.*, 2015; Chen Z. *et al.*, 2023). Также одной из технологий получения ДНК-вакцин без генов устойчивости к антибиотикам является Doggybone ДНК. Она представляет собой двухцепочечную линейную ДНК-конструкцию,

полученную ферментативным путем, которая кодирует исключительно кассету экспрессии антигена, включающую антиген, промотор, поли(А)-хвост и теломерные концы (Walters A. A. *et al.*, 2014). Эффективность такого подхода была показана в ряде исследований; например, была разработана Doggybone ДНК, кодирующая ген НА вируса гриппа А (H1N1), и показана активация гуморального и клеточного иммунных ответов у мышей линии BALB/c (Scott V. L. *et al.*, 2015).

Для повышения иммуногенности ДНК-вакцин можно использовать различные адъюванты. Так, могут использоваться классические адъюванты, такие как соли алюминия, повышающие эффективность ДНК-вакцин и позволяющие снижать их дозу (Zhang T. *et al.*, 2023). Одним из методов является включение дополнительных плазмид или дополнительных вставок, кодирующих молекулярные адъюванты. Многочисленные исследования показали, что совместная доставка плазмид, кодирующих цитокины, хемокины или костимулирующие молекулы, может усиливать иммунный ответ. Например, было показано, что совместное введение с интерлейкином IL-12 или IL-15 увеличивает количество и функциональность антиген-специфических Т-клеток у нечеловеческих приматов (Ferraro B. *et al.*, 2011). Также в плазмиду можно добавить последовательности, распознаваемые иммунной системой как чужеродные. Например, такими последовательностями могут быть CpG-мотивы, которые в геномах млекопитающих редки и обычно метилированы, тогда как у бактерий распространены неметилированные CpG-мотивы. Включение встроенных CpG-мотивов в последовательность ДНК-вакцин воспринимается иммунной системой как патогенассоциированный паттерн и приводит к активации Toll-подобных рецепторов (TLR), а именно к активации TLR9 (Li L. *et al.*, 2016; Suschak J. J. *et al.*, 2017). Было показано, что включение CpG-мотивов в последовательность ДНК-вакцины оказывает сильное воздействие на иммунную систему, включая стимуляцию пролиферации В-клеток, секрецию иммуноглобулина, интерлейкина (IL-6 и IL-12), а также усиливает представление антигена с помощью молекул МНС-II, однако антиген-специфичным действием они не обладают (McCluskie M. J. *et al.*, 2000).

Примером ДНК-вакцины, лицензированной для применения на людях, является вакцина ZyCoV-D против COVID-19, разработанная компанией Cadila Healthcare Limited (Yadav P. D. *et al.*, 2023). В состав вакцины входит ген, кодирующий полноразмерный вариант S-белка SARS-CoV-2, оптимизированный по кодонам и дополненный сигнальной

последовательностью IgE. Доклинические испытания подтвердили эффективность вакцины на мышах, морских свинках и кроликах (Dey A. *et al.*, 2021). После этого вакцина прошла три фазы клинических испытаний (Khobragade A. *et al.*, 2022). В состав ZyCoV-D входит вектор pVAX1 размером 3000 п. о., одобренный FDA для использования при разработке ДНК-вакцин. Он получен путем модификации вектора pcDNATM3.1 и включает следующие ключевые компоненты: ранний промотор цитомегаловируса, обеспечивающий высокий уровень продукции целевого белка в клетках млекопитающих; сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста, необходимый для корректного завершения транскрипции и полиаденилирования мРНК; маркер устойчивости к канамицину, позволяющий проводить селекцию в *E. coli*, а также набор уникальных сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции для клонирования целевых генов в составе данного вектора (Raghuwanshi D. *et al.*, 2012).

Итак, ДНК-вакцины являются перспективной платформой для борьбы с инфекционными заболеваниями. Далее будут рассмотрены особенности еще одной привлекающей внимание вакцинной платформы – на основе мРНК.

1.3 Платформа мРНК-вакцин

мРНК-вакцина представляет собой матричную РНК, синтезированную методом транскрипции *in vitro*, кодирующую целевой белок-иммуноген (Pardi N. *et al.*, 2018). Экзогенно вводимая мРНК распознается врожденной иммунной системой и запускает несколько механизмов врожденного иммунитета, что приводит к выработке воспалительных цитокинов и подавлению синтеза целевого белка-иммуногена. Несмотря на то, что иммуностимулирующие свойства РНК могут усиливать действие вакцины, ингибирование трансляции и деградация немодифицированных экзогенных матричных РНК снижают эффективность вакцины. Короткий период полураспада матричной РНК из-за ее неустойчивости к разрушению рибонуклеазами также затрудняет ее применение. Таким образом, необходимо не только устранить иммуностимулирующий эффект, но и увеличить время жизни матричной РНК, а также повысить эффективность ее трансляции (Liu A. *et al.*, 2022).

Для повышения эффективности мРНК-вакцины используют модификации ее структурных элементов. Кроме открытой рамки считывания (ORF) мРНК также включает в себя 5'-кэп, 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR) и поли(А)-хвост. С помощью химических модификаций и оптимизации последовательности этих элементов можно

повысить стабильность, иммуногенность и эффективность трансляции мРНК (Kim S. C. *et al.*, 2022; Wei Z. *et al.*, 2025). На рисунке 1.5 показаны основные структурные элементы мРНК и их модификации, которые более подробно будут рассмотрены далее.

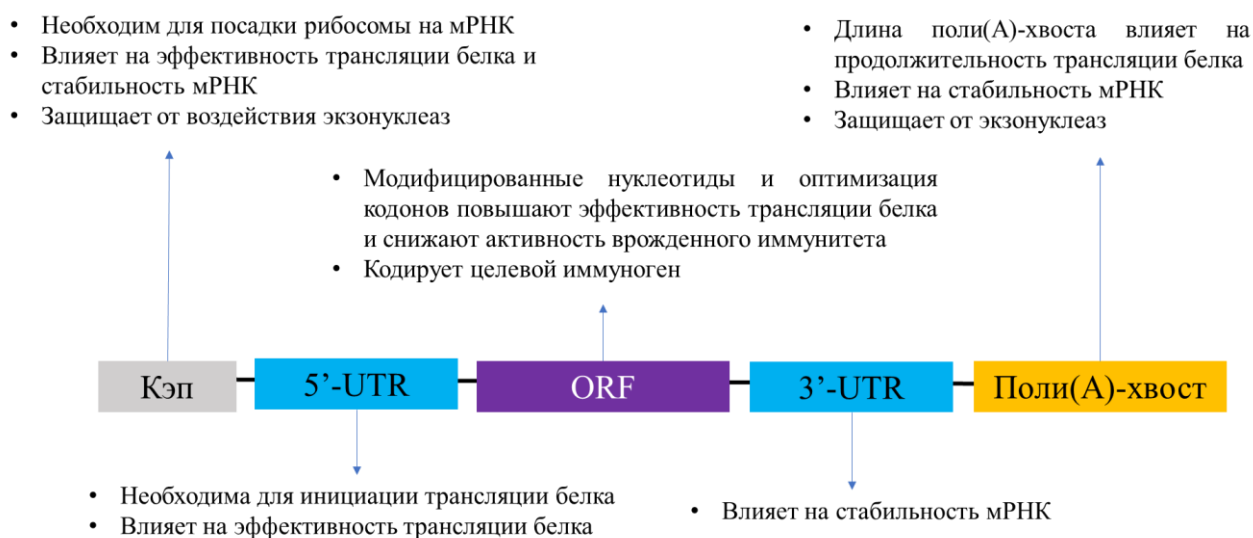


Рисунок 1.5 – Схематическое представление структурных элементов мРНК-вакцины.

На 5'-конце нативной мРНК эукариот находится кэп-структура – m^7GpppN , включающая в себя модифицированный нуклеозид N7-метилгуанозин (m^7G), который соединен с первым транскрибированным нуклеотидом мРНК через 5'-5'-трифосфатный мостик. Кэп-структура необходима для полноценного функционирования мРНК: она стабилизирует молекулу мРНК в процессах трансляции, сплайсинга, полиаденилирования и выхода из ядра клетки, а также защищает мРНК от экзонуклеазной деградации (Rosa S. S. *et al.*, 2021). Кэпирование осуществляется в ядре клетки после транскрипции первых 20-30 нуклеотидов РНК; присоединение кэпа происходит в 3 этапа под действием ферментов: сначала РНК-трифосфатаза отщепляет фосфатную группу от 5'-концевого нуклеотида, образуя 5'-дифосфат РНК. Затем гуанилтрансфераза переносит на фосфатную группу 5'-концевого нуклеотида остаток GMP. Далее гуанил-N7-метилтрансфераза метилирует гуаниновый остаток в составе GTP, превращая его в N7-метилгуанозин и генерируя таким образом классическую структуру кэпа cap0 (Ramanathan A. *et al.*, 2016; Leong K. Y. *et al.*, 2025).

Кэп-структура важна для процесса трансляции мРНК, так как она участвует в формировании особой структуры – так называемой замкнутой петли мРНК. В этой

структуре кэп специфически связывается с фактором инициации трансляции eIF4E, который, в свою очередь, связывается с eIF4G и eIF4A, образуя комплекс инициации трансляции eIF4F (Wang S. *et al.*, 2022). eIF4F соединяется с малой субъединицей 40S-рибосомы, а поли(А)-связывающий белок (PABP) связывается с eIF4G и напрямую соединяет кэп и хвост мРНК. Таким образом, формируется замкнутая петля (рисунок 1.6), которая эффективно препятствует отщеплению кэпа и хвоста мРНК, тем самым повышая стабильность мРНК, иницируя трансляцию и способствуя посадке рибосом (Wei Z. *et al.*, 2025).

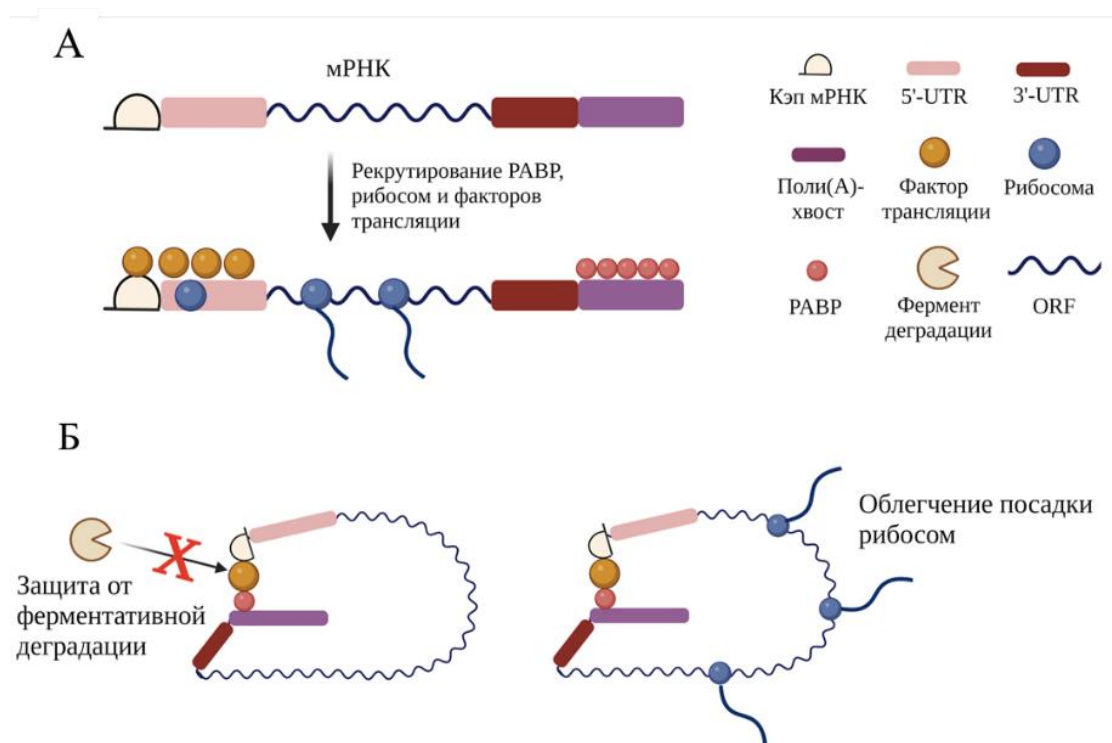


Рисунок 1.6 – Схема замкнутой петли мРНК. А – мРНК рекрутирует факторы инициации трансляции, которые взаимодействуют с кэпом и 5'-нетранслируемой областью (5'-UTR), что обеспечивает посадку рибосомы и начало синтеза белка; одновременно с этим на поли(А)-хвосте происходит рекрутирование поли(А)-связывающих белков (PABP). Б – В модели замкнутой петли прочное взаимодействие между факторами трансляции, расположенными на противоположных концах мРНК, приводит к формированию устойчивой структуры в виде петли. Такая структура выполняет несколько основных функций, например предотвращает экзонуклеазную деградацию мРНК и облегчает повторную посадку рибосом, что в итоге повышает эффективность трансляции.

Помимо классической структуры cap0 существуют еще два варианта 5'-кэпа – cap1 и cap2 (рисунок 1.7), для их образования необходимы соответствующие ферменты. В обоих случаях m7G-специфическая 2'-O-метилтрансфераза присоединяет метильную группу к 2'-О-атому рибозы второго (для cap1) или третьего (для cap2) нуклеотида транскрипта (Liang Y. *et al.*, 2021). Сообщается, что cap1 не позволяет цитозольным сенсорам RIG-I и MDA5, которые запускают сигнальный каскад интерферонов I типа, распознавать экзогенную мРНК. Таким образом, молекулы мРНК со структурой cap1 в меньшей степени провоцируют врожденный иммунный ответ и подвергаются меньшему разрушению. В результате трансляция целевого белка-иммуногена в клетках организма с таких мРНК происходит значительно эффективнее по сравнению с мРНК, имеющими классическую структуру cap0 (Ogino T. *et al.*, 2019; Muslimov A. *et al.*, 2023).

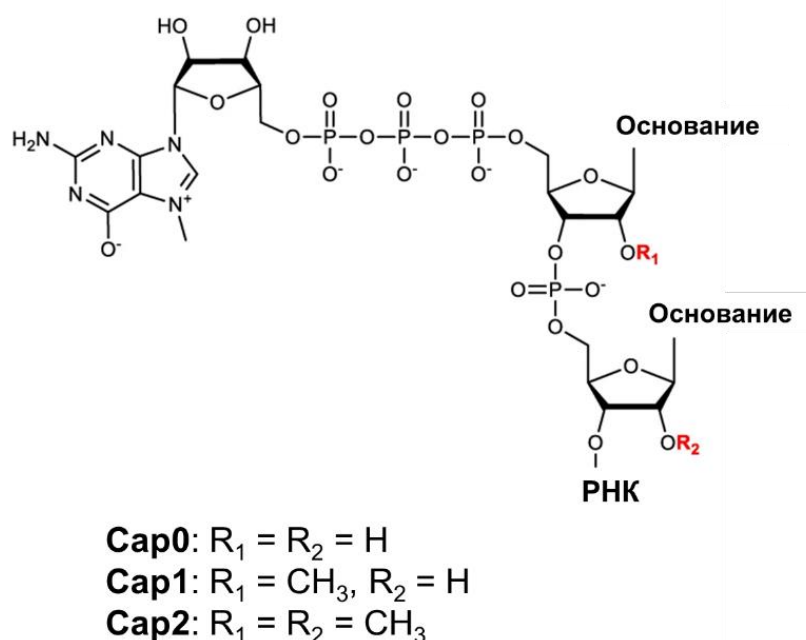


Рисунок 1.7 – Структуры cap0, cap1 и cap2 (Inagaki M. *et al.*, 2023).

Важно подчеркнуть, что иммунная система распознает некэпированную мРНК как чужеродную, поскольку наличие кэпа является ключевым отличием клеточных мРНК от вирусных. Молекулы мРНК без кэпа или с неправильным кэпом выявляются рецепторами распознавания образов, например RIG-I и IFIT, которые запускают продукцию интерферонов I типа и в результате – деградацию мРНК (Xu L. *et al.*, 2024; Kenoosh H. A. *et al.*, 2024). Поэтому для получения синтетических транскриптов мРНК, соответствующих структуре эукариотических мРНК, обязательно требуется проводить

кэпирование. При создании вакцин важно добиться максимальной эффективности кэпирования мРНК, чтобы избежать чрезмерной активации врожденного иммунитета.

Кэпирование можно проводить несколькими способами – после завершения транскрипции (посттранскрипционно, например с использованием рекомбинантного фермента из вируса осповакцины) или непосредственно в ходе синтеза мРНК (котранскрипционно, путем добавления в реакционную смесь аналогов кэпа, например ARCA и CleanCap[®]) (Warminski M. *et al.*, 2023; Toniolo A. *et al.*, 2024). С практической стороны котранскрипционный подход уменьшает число стадий получения мРНК и количество требуемых ферментов. Это напрямую влияет на снижение себестоимости производства (Zhang J. *et al.*, 2023). Однако у данного метода также есть недостатки. Во-первых, из-за конкуренции между аналогом кэпа и GTP, который служит стартовым нуклеотидом, не все молекулы оказываются кэпированными. Это приводит к появлению некэпированных РНК, способных вызвать нежелательный иммунный ответ. Для уменьшения этого эффекта применяют обработку препарата фосфатазой, удаляющей трифосфаты с 5'-концов некэпированных молекул. Во-вторых, существует риск встраивания аналогов кэпа в неправильной (обратной) ориентации, что препятствует процессу трансляции.

Для преодоления этих ограничений и улучшения эффективности трансляции мРНК в аналоги кэпа вводят химические модификации, например, присоединение метильных групп. Такие модификации предотвращают присоединение кэпа в неправильной ориентации и улучшают качество мРНК. В частности, был разработан антиреверсивный аналог кэпа (ARCA), имеющий структуру динуклеотида $m^{7,3'-O}GpppG$. В ARCA метильная группа присоединена к 3'-ОН-группе нуклеотида m^7G , что обеспечивает правильное присоединение кэпа во время синтеза мРНК (Wei Z. *et al.*, 2025). Впоследствии структура ARCA была улучшена и был представлен антиреверсивный аналог кэпа второго поколения CleanCap[®], который позволяет формировать структуру cap1 (Zhang M. *et al.*, 2025). Его применение позволяет получить до 95 % кэпированной мРНК, что значительно выше, чем у аналогов кэпа первого поколения (Henderson J. M. *et al.*, 2021). Именно этот аналог используется при производстве вакцин BNT162b1 и BNT162b2 компании BioNTech/Pfizer. Структуры аналогов кэпа ARCA и CleanCap[®] представлены на рисунке 1.8.

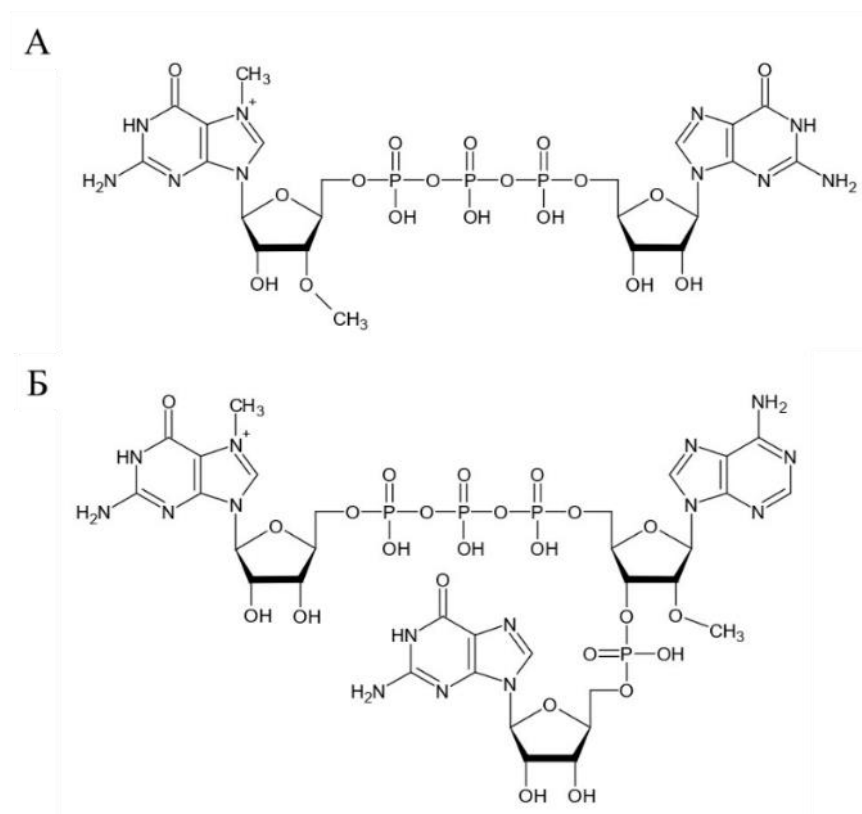


Рисунок 1.8 – Структуры аналогов кэпа. А – Структура ARCA. Б – Структура CleanCap®.

Поли(А)-хвост служит одним из важнейших элементов, обеспечивающих эффективную трансляцию и устойчивость мРНК. В клетках млекопитающих наиболее активно транслируемые мРНК несут поли(А)-хвосты длиной от 100 до 250 аденозиновых остатков (Deng Z. *et al.*, 2022). Роль поли(А)-хвоста в процессе трансляции заключается в его связывании с РАВР, которые связываются с фактором инициации трансляции 4G (eIF4G). В результате, как отмечалось выше, возникает кольцевая структура (замкнутая петля). Такая организация обеспечивает более эффективное присоединение рибосом и одновременно защищает мРНК от воздействия экзонуклеаз (Passmore L. A. *et al.*, 2022; Zhang Y. Y. *et al.*, 2026).

Для получения мРНК *in vitro* существует два основных способа добавления поли(А)-хвоста. Первый – с помощью фермента поли(А)-полимеразы, которая присоединяет к 3'-концу аденозиновые остатки (до 200 остатков); недостатком этого способа является получение гетерогенного продукта и необходимость дополнительной ферментативной стадии. Второй – в ходе матричного синтеза: в ДНК-матрицу заранее включают участок с заданным числом аденозиновых остатков, что определяет длину

поли(А) (Pardi N. *et al.*, 2018; Jackson N. A. C. *et al.*, 2020). Также ведутся исследования различных структур, которые можно включать в последовательность поли(А)-хвоста, повышающих эффективность продукции целевого белка-иммуногена. Например, к ним относятся поли(У)-последовательности, шпильчатые и петлевые структуры, которые замедляют деаденилирование, стабилизируют поли(А)-хвост и продлевают период полураспада мРНК (Oh A. *et al.*, 2025).

Последовательность, кодирующая белок в составе мРНК, фланкирована с двух сторон нетранслируемыми областями – 5'-UTR и 3'-UTR. Хотя эти участки не транслируются в белок, их нуклеотидный состав, протяженность и вторичная структура играют важную регуляторную роль. В частности, 5'-UTR принимает участие в привлечении рибосом и точном распознавании старт-кодона, а 3'-UTR является важнейшим регулятором стабильности мРНК, эффективности трансляции и субклеточной локализации (Mohamad Razif M. I. *et al.*, 2023; Sun N. *et al.*, 2025).

У большого количества мРНК эукариот в 3'-UTR присутствуют сигналы, запускающие деградацию транскрипта, что напрямую сказывается на их устойчивости. Показано, что последовательности, в которых содержатся участки AU, принимают участие в деградации поли(А)-хвоста. Если такие AU-богатые последовательности заменить на участки 3'-UTR, взятые из стабильных мРНК, время полужизни молекулы возрастает (Schlake T. *et al.*, 2012). Например, включение в 3'-UTR экзогенной мРНК специфических последовательностей 3'-UTR из мРНК α - или β -глобина человека повышает стабильность мРНК и, соответственно, увеличивает эффективность синтеза целевого иммуногена (Gu Y. *et al.*, 2022; Guo X. *et al.*, 2023).

Кроме того, важную роль в инициации трансляции играет последовательность Козак, находящаяся в 5'-UTR (Cheng F. *et al.*, 2023). Эта последовательность имеет вид RSCAUGG, где R обозначает любой пуриновый остаток, и считается оптимальной для инициации синтеза белка. В ней особую значимость несут несколько нуклеотидов – в позиции –3 относительно стартового кодона AUG предпочтительны нуклеотиды А или G, а в позиции +4 – G. Наличие данных нуклеотидов улучшает узнавание стартового кодона рибосомой (Gómez-Aguado I. *et al.*, 2020; Guimaraes G. J. *et al.*, 2024).

Состав кодонов в кодирующей белок области также способен влиять как на эффективность трансляции, так и на устойчивость мРНК. Кодонозависимая скорость элонгации трансляции является одним из основных факторов, определяющих

стабильность мРНК. С точки зрения механизма, снижение скорости трансляции мРНК с неоптимальными кодонами приводит к привлечению DEAD-бокс РНК-геликазы Dhh1p, которая запускает распад мРНК (Park J. W. *et al.*, 2021). ORF можно изменять на кодонном уровне, контролируя таким образом скорость элонгации трансляции, или за счет оптимизации вторичной структуры мРНК. Существует несколько подходов к оптимизации кодонов. Один из них – замена редких кодонов на более частые, кодирующие ту же аминокислоту. Другой подход – оптимизация дикодонов, то есть подбор таких пар кодонов, которые совместно обеспечивают наиболее эффективную трансляцию (Linares-Fernández S. *et al.*, 2020; Jin L. *et al.*, 2025). Также есть данные, что снижение числа динуклеотидов UU и UA в ORF защищает экзогенную мРНК от воздействия ферментов, удаляющих кэп с 5'-конца мРНК (Ye Z. *et al.*, 2023).

Кроме того, нередко прибегают к замене концевой нуклеотида в кодоне с U на C. Во многих мРНК-вакцинах уридиновые основания замещают псевдоуридином или N1-метилпсевдоуридином, что подробнее будет обсуждено далее. Такие модифицированные нуклеотиды теоретически способны комплементарно связываться с разными нуклеотидами, что в некоторых случаях ведет к несинонимичным заменам и изменениям первичной структуры белка. Например, триплет GAΨ, кодирующий аспарагиновую кислоту, может связываться с антикодоном тРНК^{Glu}, что приводит к включению неправильного аминокислотного остатка в состав мРНК. В случае кодонов с цитидином на конце такой проблемы не возникает (Xia X., 2021).

Как было упомянуто выше, при введении экзогенной мРНК в организм необходимо помнить, что она может быть распознана как чужеродная, что провоцирует нежелательный врожденный иммунный ответ. Следствием этого становится разрушение мРНК и побочные реакции со стороны организма. Как ДНК, так и мРНК способны активировать врожденный иммунный ответ млекопитающих через рецепторы распознавания образов, в том числе TLR и цитоплазматические РНК-сенсоры. Сообщается, что уридиновые остатки способны распознаваться TLR7, GU- и AU-богатые участки мРНК – TLR7 и TLR8, двухцепочечная РНК – TLR3 (Mochida Y. *et al.*, 2024; Shoja Doost J. *et al.*, 2024).

Согласно современным данным, включение модифицированных нуклеозидов в процессе транскрипции *in vitro* значительно снижает TLR-опосредованную активацию иммунного ответа. Известно, что при использовании модифицированных нуклеозидов не

происходит образования двухцепочечной РНК, которая может узнаваться TLR. Также многие модифицированные нуклеозиды присутствуют в РНК млекопитающих, поэтому их применение помогает уменьшить нежелательный иммунный ответ на экзогенную мРНК. Для синтеза мРНК *in vitro* часто используют такие соединения, как псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин, 2-тиоуридин, 5-метилцитидин, 6-метиладенозин, инозин и 2'-O-метилованные нуклеозиды на 5'-концевом кэпе (рисунок 1.9) (Karikó K. *et al.*, 2005; Nance K. D. *et al.*, 2021). В лицензированных вакцинах mRNA-1273 (Moderna, США) и BNT162b2 (BioNTech/Pfizer, Германия, США) используется N1-метилпсевдоуридин (Corbett K. S. *et al.*, 2020; Vogel A. B. *et al.*, 2021).

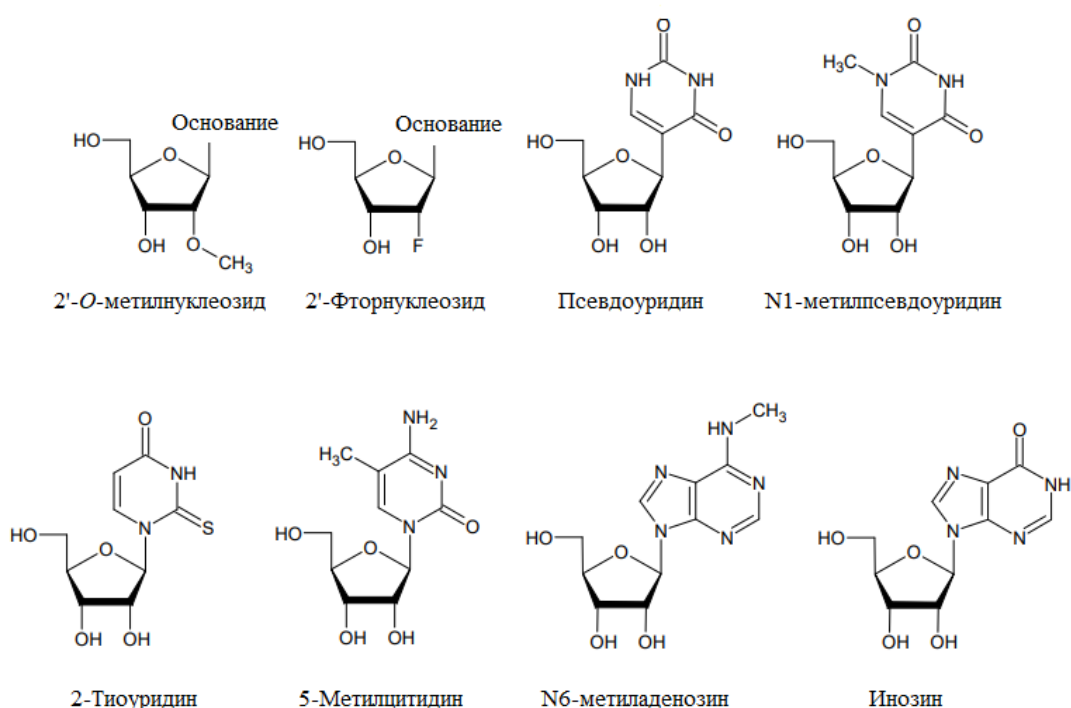


Рисунок 1.9 – Структуры модифицированных нуклеозидов.

Внутриклеточная доставка также очень важна для эффективного действия мРНК-вакцины. Липидные наночастицы (LNP) эффективно защищают экзогенную мРНК от деградации внеклеточными нуклеазами и в настоящее время являются наиболее широко используемой системой доставки мРНК в клетки (Li Y. *et al.*, 2023; Furey C. *et al.*, 2024; Wang Z. *et al.*, 2025). Для исследователей во всем мире стандартом производства LNP является состав, разработанный компаниями Moderna и Pfizer для вакцин против COVID-19 (Polack F. P. *et al.*, 2020; Corbett K. S. *et al.*, 2020). LNP в этих вакцинах состоят из четырех липидных компонентов, которые обеспечивают эффективную инкапсуляцию и высвобождение мРНК, длительный период циркуляции в организме и стабильность

комплекса (Cheng F. *et al.*, 2023). Дополнительным преимуществом LNP является их адъювантный эффект, усиливающий иммунный ответ на вакцину (Cui X. *et al.*, 2024). Однако проблемой LNP является отсутствие их тканевой специфичности; нецелевая доставка в печень или сердце вызывает нежелательные побочные реакции (Fang E. *et al.*, 2022; Kisakova L. A. *et al.*, 2026).

Альтернативные методы доставки в последнее время привлекают все больше внимания. Безыгольный метод струйной инъекции (СИ) является многообещающей альтернативой LNP для доставки мРНК. Метод основан на внутрикожной инъекции под высоким давлением, при этом физическое воздействие на клеточную мембрану обеспечивает повышение проницаемости для нуклеиновых кислот (Abbasi S. *et al.*, 2023). Кроме того, широкое распределение препарата в дерме облегчает поглощение мРНК АПК (Miyazaki H. *et al.*, 2021; Wang C. *et al.*, 2025), что дополнительно повышает ее иммуногенность.

1.4 Стабилизация тримерной структуры НА в ДНК- и мРНК-вакцинах

НА является преобладающим антигеном вируса гриппа и индуцирует нейтрализующие антитела, способные эффективно предотвращать связывание НА с сиаловой кислотой, блокируя проникновение вируса в цитозоль клетки и защищая организм от инфекции. По этой причине он является ключевым компонентом противогриппозных вакцин (Bullard B. L. *et al.*, 2021; Ren H. *et al.*, 2024).

НА представлены на поверхности вируса в виде выступающих из мембраны шипов диаметром 30-50 Å и длиной 135 Å. Каждый шип содержит три идентичных мономера, образованных двумя субъединицами, НА1 и НА2. Мономер НА состоит из трехцепочечной спиральной структуры α -спиралей в области стебля и глобулярной области антипараллельных β -листов в головном домене НА1 (рисунок 1.10А) (Maig C. M. *et al.*, 2014; Gamblin S. J. *et al.*, 2021). Каждый мономер НА содержит дистальный от мембраны сайт связывания рецептора (RBS) в глобулярном головном домене, который связывается с рецепторами на основе сиаловой кислоты на поверхности клетки-хозяина (кроме подтипов А (Н17) и А (Н18)). RBS состоит из 130-петли, 150-петли, 190-спирали и 220-петли, которые названы в соответствии с их положением в первичной аминокислотной последовательности. Несколько ключевых остатков, взаимодействующих с сиаловой кислотой, консервативны в НА вирусов гриппа А и В. К ним относятся W153, H183, L194 и Y195 (рисунок 1.10Б) (Wu N. C. *et al.*, 2020).

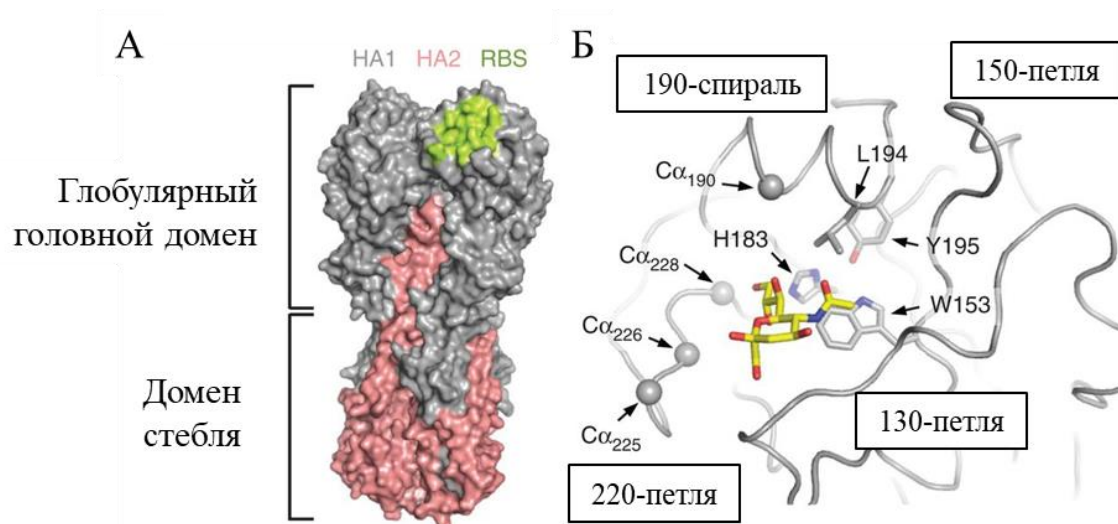


Рисунок 1.10 – Структуры HA и RBS. А – Структура тримерного HA. Расположение RBS показано зеленым цветом, HA1 показан серым цветом, HA2 — розовым. Глобулярный головной домен расположен над стеблевым доменом. Б – Основные структурные элементы RBS HA: 130-петля, 150-петля, 190-спираль и 220-петля. Высококонсервативные остатки W153, H183, L194 и Y195 показаны в виде стержневой модели (адаптировано из Wu N. C. *et al.*, 2020).

Как было описано выше, в естественных условиях HA синтезируется в виде белка HA0, который расщепляется с помощью протеаз. После расщепления HA состоит из двух субъединиц, соединенных дисульфидными связями: субъединица HA1 содержит глобулярный головной домен с карманом для связывания с рецептором, а субъединица HA2 – стеблевой, цитоплазматический и трансмембранный домены, участвующие в проникновении вируса в клетку и в закреплении белка HA на липидной оболочке вируса. На N-конце субъединицы HA2 расположен гидрофобный пептид слияния длиной 20-25 а. о., важный для соединения мембран вируса и клетки-хозяина. Другие важные структурные элементы домена HA2 включают петлю В, соединяющую длинную α -спираль (спираль А) домена стебля с более короткой спиралью снаружи (спираль С) и короткий участок самой спирали А (остатки 106-112 HA2) (Mair C. M. *et al.*, 2014).

При попадании в кислую среду эндосомы HA претерпевает необратимое изменение конформации. Процесс конформационного изменения и слияния мембран включает структурные перестройки в доменах HA1 и HA2 (Cross K. J. *et al.*, 2009; Wang W. *et al.*, 2015; de Bruin A.C.M. *et al.*, 2022). При нейтральном pH пептид слияния на N-конце HA2

изолирован в гидрофобном кармане. Воздействие кислого pH в поздней эндосоме приводит к диссоциации внутритримерных и межсубъединичных контактов, что запускает переход петли В N-конца HA2 из петли в спираль. Этот переход перемещает пептид слияния примерно на 100 Å от поверхности вириона, где он внедряется в целевую мембрану, образуя вытянутую промежуточную конформацию HA2. Коллапс вытянутой промежуточной конформации сближает противоположащие вирусную и клеточную мембраны и способствует их слиянию. В результате этого перехода HA2 образует высокостабильную тримерную спирально-свернутую конформацию (рисунок 1.11) (Das D. K. *et al.*, 2018).

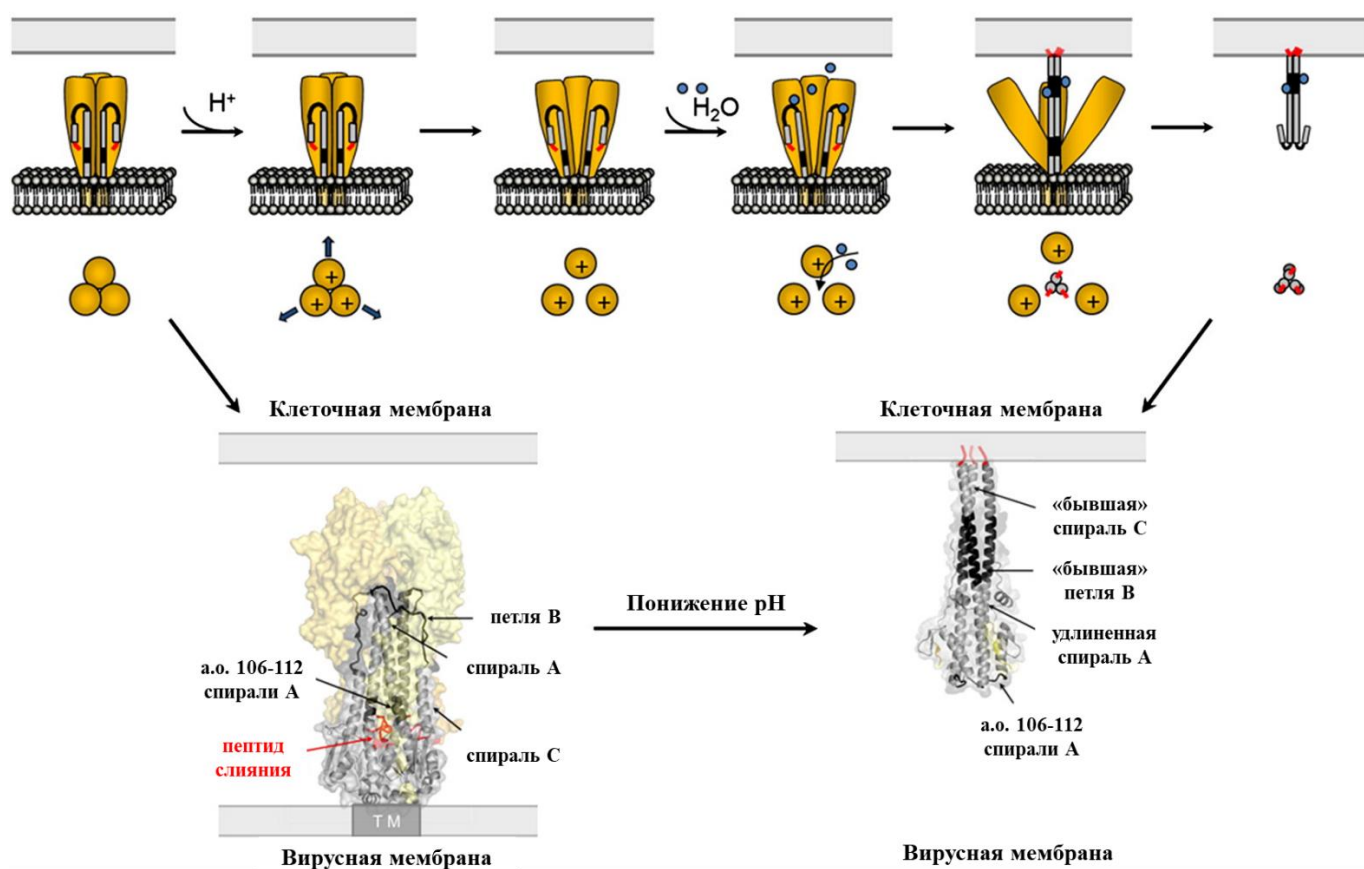


Рисунок 1.11 – Конформационное изменение HA вируса гриппа при кислом pH (5,0–6,0). В верхней части изображения показаны этапы конформационного изменения (HA1 обозначен желтым цветом, HA2 – серым и черным, пептид слияния – красным). При понижении pH в эндосоме протонирование HA приводит к диссоциации тримеров. После этого проникновение молекул воды способствует структурному переходу В-петли в спираль и высвобождению пептида слияния, который внедряется в клеточную мембрану, образуя вытянутую промежуточную конформацию HA. Далее перестройка а. о. 106-112 спирали А в петлю обеспечивает сближение двух мембран и вызывает их слияние, при

этом НА остается в шпильчатой конформации. В нижней части изображения показаны соответствующие вторичные структуры тримерного НА при нейтральном и низком pH, при этом структурные элементы, претерпевающие конформационные изменения, выделены черным цветом. ТМ – трансмембранный субдомен НА (адаптировано из Mair C. M. *et al.*, 2014).

Важной задачей для правильной презентации антигена в составе вакцин иммунной системе является стабилизация нативной префузионной формы гемагглютинина в виде тримера (McCarthy K. R., 2026). Одной из первых попыток стабилизации гемагглютинина в префузионной конформации стало введение дополнительных дисульфидных связей в последовательность белка; в результате гемагглютинин не претерпевал изменения конформации и разделения на субъединицы (Godley L. *et al.*, 1992). Для сохранения тримерной формы белка в основном используется добавление в последовательность тримеризующих доменов, таких как фибритин бактериофага Т4 или лейциновая «молния» GCN4, которые помогают сохранять гемагглютинин в префузионной конформации и открывают для представления иммунной системе ключевые эпитопы стебля гемагглютинина (Weldon W. C. *et al.*, 2010; McMillan C. L. D. *et al.*, 2021). Домен фибритина бактериофага Т4 состоит из трех копий С-конца фибритина, включающих 30 а. о. и образующих β-пропеллероподобную структуру с сильными взаимодействиями между субъединицами, что обеспечивает тримеризацию, а также правильное расположение соответствующих эктодоменов белка слияния. Лейциновая «молния» GCN4 состоит из трех α-спиралей длиной 33 а. о., которые образуют параллельную трехцепочечную спираль и способствуют тримерному расположению присоединенных эктодоменов (Ebel H. *et al.*, 2022).

Относительно новым и универсальным подходом к стабилизации префузионной формы стало внесение замен в так называемые pH-чувствительные области, которые претерпевают наиболее заметные изменения при переходе из префузионного в постфузионное состояние. Так, в работе (Milder F. J. *et al.*, 2022) идентифицировали две области pH-чувствительных переключателей pHs1 и pHs2 (рисунок 1.12), которые после протонирования запускают переход НА в постфузионную форму. В первой pH-чувствительной области была внесена замена H26W, во второй – K51I и E103I (нумерация в субъединице НА2). Эти одновременные мутации значительно повысили стабильность и

продукцию тримерного рекомбинантного НА. Данный подход оказался эффективным для всех подтипов группы 1 и 2 вируса гриппа А.

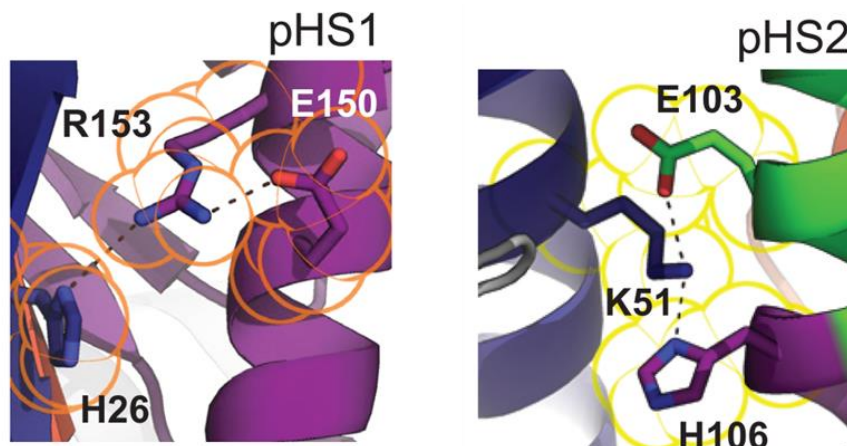


Рисунок 1.12 – Схема структуры рН-переключателей рHS1 и рHS2 в нативном НА вируса гриппа. Аминокислотные остатки H26, E150 и R153 связаны водородными связями в рHS1, аминокислотные остатки K51, E103 и H106 – в рHS2 (адаптировано из Milder F. J. *et al.*, 2022).

В недавних исследованиях была использована комбинация из 5 мутаций в рН-чувствительных областях НА штамма вируса гриппа А/Texas/37/2024 (H5N1): H355F, K380M, R397M, L418I и E432L (согласно нумерации НА подтипа А (H3)). С помощью криоэлектронной микроскопии было показано, что эти стабилизирующие мутации создают несколько новых гидрофобных взаимодействий, сохраняя при этом структуру НА, что приводит к значительному повышению температуры плавления НА и способствует формированию стабильной структуры тримера. Данные, полученные после иммунизации мышей, показывают, что стабилизация НА приводит не только к более высоким титрам ингибирования гемагглютинации и нейтрализации, но и смещают иммунный ответ в сторону RBS, вызывая выработку большего количества нейтрализующих антител (Dosey A. *et al.*, 2025).

Перспективным подходом к корректному представлению консервативных эпитопов НА иммунной системе является создание мозаичных гемагглютининов. Они конструируются путем замены основных иммунодоминантных антигенных участков в головном домене на участки, полученные из экзотических подтипов вируса птичьего гриппа, с которыми человек ранее не сталкивался. При этом сохраняется нативная трехмерная структура белка, но иммунная система не взаимодействует со знакомыми

доминантными эпитопами (Broecker F. *et al.*, 2019; Liu X. *et al.*, 2023). Так, в работе (Mishra M. *et al.*, 2026) был применен такой подход. Для получения растворимой формы белка были удалены трансмембранный и цитоплазматический домены НА, а для стабилизации его структуры были введены дополнительные дисульфидные связи путем внесения замен L30C в НА1 и G47C в НА2, префузионная конформация НА была стабилизирована заменами H26W, K51I и E103I, а также была внесена мутация Y98F в области RBS НА для нарушения его связывания с сиаловой кислотой. В результате было показано, что полученные стабилизированные мозаичные НА обладали высокой стабильностью тримерной структуры и индуцировали у животных защитный иммунный ответ против широкого спектра вирусов.

Для предотвращения протеолитического расщепления гемагглютинаина также очень важна замена полиосновного сайта протеолиза на моноосновный. Как было описано выше, по полиосновному сайту НА может расщепляться на субъединицы с гораздо более высокой эффективностью и в разных типах клеток, поэтому его замена на моноосновный сайт уменьшает вероятность перехода НА0 в постфузионное состояние и приобретения неправильной конформации (Wei C. J. *et al.*, 2008).

Таким образом, комбинация замен в рН-чувствительных областях НА с заменами сайта протеолиза вируса ВППГ, а также добавление тримеризующего домена позволяет сконструировать идеальную последовательность целевого гена ДНК- и мРНК-вакцин для корректной презентации антигена иммунной системе.

1.5 Заключение

В литературном обзоре рассмотрены особенности высокопатогенного вируса гриппа А (H5) клады 2.3.4.4b, который в настоящее время обладает значительным пандемическим потенциалом. Расширение круга хозяев, включающих более 70 видов диких и домашних млекопитающих, а также рост числа случаев заражения людей приводит к появлению острой необходимости в разработке средств для борьбы с данным вирусом.

В обзоре рассмотрены две перспективные вакцинные платформы – ДНК- и мРНК-вакцины. Они обладают рядом важных преимуществ перед традиционными вакцинами, к которым относятся стимуляция гуморального и клеточного иммунного ответа, скорость разработки, простота и универсальность крупномасштабного производства, отсутствие нежелательного антивекторного иммунного ответа. ДНК-вакцины обладают более

высокой стабильностью и способностью кодировать более длинные генетические последовательности, в то время как мРНК-вакцины обеспечивают более высокую, быструю и контролируемую продукцию целевого белка благодаря реализации генетической информации в цитозоле клетки.

Одним из важных аспектов разработки вакцин для борьбы с заболеванием, вызываемым высокопатогенным вирусом гриппа А (H5), является стабилизация НА в нативной префузионной конформации. Сочетание замен в рН-чувствительных областях НА с заменами сайта протеолиза высокопатогенного вируса птичьего гриппа и добавлением тримеризующего домена позволяет добиться правильной презентации антигена иммунной системе.

Таким образом, платформы ДНК- и мРНК-вакцин представляют собой подходящий инструмент для быстрого реагирования на угрозу потенциальной пандемии, вызываемой вирусом гриппа А (H5).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Штаммы бактерий, штаммы вируса, культуры клеток, плазмиды

Для наработки плазмидной ДНК был использован штамм *E. coli* Stbl3 (F⁻*mcrB mrr hsdS20*(гв⁻, тв⁻) *recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(StrR) *xyl-5 λ-leu mtl-1*) (получен из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия).

Для получения генетических конструкций были использованы плазмиды pVAX-rbd, pVAX-Cas1+GFP, полученные сотрудниками отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, и коммерческая плазида pUC-H5, несущая ген H5, синтезированный фирмой ООО «ДНК-синтез» (Россия).

Для анализа экспрессии генов использовалась культура клеток HEK293 (Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия).

В реакции вируснейтрализации были использованы штаммы вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) (EPI_ISL_1114749), A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) (EPI_ISL_1039234), A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1) (EPI_ISL_18525098), A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) (EPI_ISL_16618972), A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1) (EPI_ISL_19157089), A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1) (EPI_ISL_16618967), полученные в отделе зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, и культура клеток MDCK-SIAT1 (Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия).

2.1.2 Олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды были синтезированы компанией БИОССЕТ (Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'-3')
F-stabl	AAAAAGATCTGGGGCCTGTTCGGCGCCATCGC
R-stabl	AAAAAAAGCGGCCGCTCATTACAGGAAGGT
F-delT4	TTTCTGGCTAGCGCCGCCACCATGGAGAACA
R-delT4	TTTTTGCGGCCGCTCATTACTTCACGCCGCTGATCTCCTCCCTCT

C1M-H5N8-F	TTTTTTTGAGCTCAAATTAATACGACTCACTATAAGAGAATA AACTAGTATTCTTCTGGTCCCCACAGACTCAGAGAGAAGGC GCCACCATGGAGAACATC
R-H5-Cas	AAAAAGGATCCCATTACAGGAAGGTGCTCAGCAGCAC
Uni-pVAX-F	TTTCTGGCTAGCGCCGCCACCATGGAGAACA
Uni-pVAX-R	AAAAAAAGCGGCCGCTCATTACAGGAAGGT

2.1.3 Синтетические пептиды

В ELISpot-анализе для стимуляции спленоцитов использовались синтетические пептиды, обладающие высокой вероятностью аффинности связывания с МНС H-2D мышей линии BALB/c. Пептиды были спроектированы с помощью программы IEDB Analysis Resource и синтезированы компанией AtaGenix Laboratories (Китай). Последовательности пептидов приведены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Аминокислотные последовательности пептидов, использованных в работе

№ п/п	Аминокислотные последовательности пептидов
1	MPFHNIHPL
2	AGWLLGNPM
3	CYPGSLNDY
4	RVPEWSYIV
5	LRNSPLREKRRKRGL
6	YVKSNKLVL
7	TYNAELLVL
8	LYDKVRLQL
9	SFFRNVVWL
10	SPYQGAPSF
11	LYKNPTTYISVGTSTLNQ
12	VDTIMEKNVTVTTHAQDILEK
13	SSWPNHETSLGVSAASPYQ

2.1.4 Коммерческие наборы, ферменты, реактивы

Агароза (Bio-Rad, США);

Бромистый этидий (Serva, Германия);

Канамицин сульфат (CDH, Индия);

Набор для выделения и очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей HiPure Gel DNA Mini Kit (Magen, Китай);

Набор для выделения и очистки плазмидной ДНК из клеток *E. coli* HiPure Plasmid Mini Kit (Magen, Китай);

ДНК-маркер молекулярного веса M12 (SibEnzyme, Россия);

РНК-маркер молекулярного веса ssRNA Ladder (New England Biolabs, США);

Маркер молекулярной массы белков Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, 10-250 kDa (Bio-Rad Laboratories, США);

Набор для проведения ПЦР БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, Россия);

Набор для проведения ОТ-ПЦР БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстра (2×) (Биолабмикс, Россия);

Эндонуклеазы рестрикции *Asu*NI, *Cci*NI, *Bgl*II, *Psp*124BI, *Vam*NI, *Eco*RI с прилагаемыми буферами (SibEnzyme, Россия);

Высокоактивная ДНК-лигаза фага T4 с прилагаемым буфером (SibEnzyme, Россия);

Набор для синтеза мРНК T7 High Yield RNA Synthesis Kit (Yeasen, Китай);

Ингибитор РНКаз (БелБиоЛаб, Россия);

Вода деионизированная, свободная от нуклеаз (Евроген, Россия);

Аналог кэпа m7GmAmG (Биолабмикс, Россия);

N1-метилпсевдоуридин (Jena Bioscience, Германия);

ДНКаза I без РНКаз (ThermoFisherScientific, США);

Ацетат аммония (CellScript, США);

Липидные компоненты: SM-102 (гептадекан-9-ил 8-((2-гидроксиэтил) (6-оксо-6-(ундецилокси) гексил) амино) октаноат); DSPC (1,2-Дистеароил-sn- глицеро-3 фосфохолин; холестерин; DMG-PEG2000 (1-монометоксиполиэтиленгликоль-2,3- димиристилглицерин с полиэтиленгликолем со средней молекулярной массой 2000) (AVT Pharmaceutical Tech Co., Китай);

Набор для определения степени инкапсуляции мРНК в LNP Quant-iT RiboGreen RNA (Life Technologies, США);

Реагент для трансфекции эукариотических клеток Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США);

FBS (HyClone, США);

Набор для выделения плазмидной ДНК, очищенной от эндотоксинов, EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen, Германия);

Набор для выделения тотальной РНК с реагентом ЛИРА (Биолабмикс, Россия);

ПСА (Helicon, Россия);

TEMED (Bio-Rad, США);

Нитроцеллюлозная мембрана 0,45 мкм (Millipore, США);

Буфер PBS в таблетках (Медиген, Россия);

Tween-20 (AppliChem, Германия);

BSA (БиолоТ, Россия);

Гидроокись алюминия Alhydrogel (InvivoGen, США);

Неполный адъювант Фрейнда (Thermo Fisher Scientific, США);

Хромогенный субстрат для щелочной фосфатазы 1-Step NBT/BCIP Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific, США);

Хромогенный субстрат для пероксидазы хрена 1-Step TMB ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific, США);

Поликлональные антитела козы против иммуноглобулина G мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США);

Конъюгат антимышиного иммуноглобулина G с щелочной фосфатазой (Sigma, США);

Набор для ELISpot анализа Mouse IFN- γ ELISpot Plus (Mabtech, Швеция);

Буфер для лизиса эритроцитов ACK Lysing Buffer (BD, США);

Конканавалин А (ConA) (Medicago, Швеция);

TPCK-трипсин (Sigma-Aldrich, США).

2.1.5 Питательные среды

Среда LB (1 % триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 1 % NaCl, pH 7,5-7,6);

Агаризованная среда LB (1 % триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 1 % NaCl, 1,5 % агар, pH 7,5-7,6);

Среда DMEM с добавлением 10 % FBS и гентамицина (50 мкг/мл) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия);

Среда RPMI-1640 с L-глутамином (300 мкг/мл) и гентамицином (50 мкг/мл) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия).

2.1.6 Растворы и буферы

ТАЕ-буфер для электрофореза ДНК в агарозном геле (40 мМ Трис-(гидроксиметил) аминотан, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0);

Буфер для электрофореза белков в SDS-ПААГ (25 мМ Трис-(гидроксиметил) аминотан, 192 мМ глицин, 0,1 % SDS, pH 8,3);

Буфер для нанесения белка на ПААГ (12 % SDS, 0,06 % бромфенолового синего, 47 % глицерина, 60 мМ Трис-HCl pH 6,8);

Разделяющий гель для SDS-ПААГ (15 % акриламид, 375 мМ Трис-HCl, 0,1 % персульфат аммония (ПСА), 0,1 % TEMED, pH 8,8);

Концентрирующий гель для SDS-ПААГ (5 % акриламид, 130 мМ Трис-HCl, 0,1 % ПСА, 0,2 % N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), pH 6,8);

Буфер для переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану (38 мМ Трис-HCl, 48 мМ глицин, 0,05 % SDS, 20 % этанол, pH 8,3);

Буфер фосфатно-солевой (PBS) (0,01 М, pH 7,2-7,6);

Буфер PBST (0,1 % Tween-20 в буфере PBS);

Блокирующий буфер для вестерн-блоттинга (1 % бычий сывороточный альбумин (BSA) в буфере PBST);

Блокирующий буфер для ИФА (1 % казеин в буфере PBST).

2.2 Методы

2.2.1 Дизайн гена

Дизайн нуклеотидной последовательности, кодирующей модифицированный гемагглютинин вируса гриппа подтипа А (H5N8), был основан на нативной последовательности гемагглютинина вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Для экспрессии в клетках млекопитающих была проведена кодонная оптимизация гена с использованием Codon Adaptation Tool. Ген был синтезирован фирмой ООО «ДНК-синтез» (Россия) и клонирован в составе плазмидного вектора pUC.

2.2.2 Моделирование структуры белков

Моделирование структуры белков проводилось с помощью онлайн-сервисов AlphaFold Server (<https://alphafoldserver.com>) и RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>).

2.2.3 Трансформация компетентных клеток *E. coli*

К компетентным клеткам *E. coli* добавляли 50 нг соответствующей плазмидной ДНК и инкубировали на льду в течение 40 минут. После этого клетки подвергали «температурному шоку» при 42 °С в течение 40 с. Охлаждали клетки на льду в течение 2 минут, затем добавляли по 275 мкл среды LB и инкубировали при 37 °С в течение 60 минут. По окончании инкубации трансформированные клетки высевали на чашку Петри с твёрдой питательной средой LB, содержащей антибиотик (канамицин, 100 мкг/мл).

2.2.4 Выделение плазмидной ДНК из бактериальной культуры

Для препаративной наработки ДНК-вакцин выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* проводили с использованием набора HiPure Plasmid Mini Kit в соответствии с инструкциями производителя.

Для иммунизации лабораторных животных выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli* проводили с использованием набора EndoFree Plasmid Giga Kit.

2.2.5 Аналитический электрофорез в агарозных гелях

Электрофорез проводили в 1 %-м или 2 %-м агарозном геле. Гель содержал 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Перед нанесением на гель к образцу ДНК или мРНК добавляли буфер для нанесения (1/6 объема образца). Разделение фрагментов ДНК или мРНК проводилось с учетом расстояния между электродами при максимальном напряжении 90 В. Фрагменты нуклеиновых кислот в геле регистрировали в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны от 240 до 360 нм. Для анализа размера продуктов использовались ДНК-маркер молекулярного веса M12 и РНК-маркер молекулярного веса ssRNA Ladder.

2.2.6 Выделение ДНК из агарозного геля

Выделение ДНК из агарозного геля проводили с использованием набора реагентов HiPure Gel DNA Mini Kit в соответствии с рекомендациями производителя.

2.2.7 Измерение концентрации нуклеиновых кислот

Концентрацию ДНК и мРНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США). Для этого измеряли оптическую плотность раствора нуклеиновой кислоты при длине волны 260 нм, то есть на максимуме поглощения растворов нуклеиновых кислот.

2.2.8 Получение ПЦР-продуктов последовательностей H5 stebl, H5 delT4 и H5 для клонирования в составе pVAX1 и в составе pVAX-Cas1

Для клонирования последовательностей H5 stebl и H5 delT4 в составе вектора pVAX1, а также последовательности H5 в составе pVAX-Cas1 была проведена ПЦР со специфическими праймерами (таблица 2.1). В качестве матрицы была использована плаزمида pUC-H5, несущая ген модифицированного гемагглютинаина вируса гриппа А (H5N8). Амплификацию проводили с использованием БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) по протоколу производителя. В пробирки для ПЦР добавляли следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл: БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) – 25 мкл, прямой праймер с концентрацией 10 мкМ (F-stebl для H5 stebl, F-delT4 для H5 delT4 или C1M-H5N8-F для H5) – 1,25 мкл, обратный праймер с концентрацией 10 мкМ (R-stebl для H5 stebl, R-delT4 для H5 delT4 или R-H5 Cas для H5) – 1,25 мкл, матрицу ДНК pUC-H5 с концентрацией 50 нг/мкл – 2 мкл, стерильная вода до общего объема 50 мкл. Готовую реакционную смесь помещали в предварительно прогретый до 95 °С амплификатор (Veriti, Thermo Fisher Scientific, США). Для проведения ПЦР гена H5 использовали следующий режим: предварительная денатурация – 95 °С в течение 5 минут, затем 30 циклов: 95 °С – 15 секунд, 66 °С – 30 секунд, 72 °С – 1 минута 40 секунд, финальная элонгация при 72 °С в течение 5 минут. Для проведения ПЦР гена H5 delT4 использовали следующий режим: предварительная денатурация – 95 °С в течение 5 минут, затем 30 циклов: 95 °С – 15 секунд, 64 °С – 30 секунд, 72 °С – 1 минута 40 секунд, финальная элонгация при 72 °С в течение 5 минут. Для проведения ПЦР гена H5 stebl использовали следующий режим: предварительная денатурация – 95 °С в течение 5 минут, затем 30 циклов: 95 °С – 15 секунд, 64 °С – 30 секунд, 72 °С – 60 секунд, финальная элонгация при 72 °С в течение 5 минут. В структуру праймеров (таблица 2.1) были заложены сайты рестрикции BglII (прямой праймер F-stebl), AsuNHI (прямой праймер F-delT4), Psp124BI (прямой праймер C1M-H5N8-F), CciNI (обратные праймеры R-stebl и R-delT4) и BamHI (обратный праймер R-H5 Cas). После проведения ПЦР продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1 %-м агарозном геле с последующим выделением продукта из геля.

2.2.9 Ферментативный гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции

Для клонирования последовательности H5 в составе вектора pVAX1 плазмиды pVAX-rgb и плазмиды pUC-H5 обрабатывались эндонуклеазами рестрикции AsuNHI и

CciNI. Для клонирования последовательности H5 delT4 в составе вектора pVAX1 плазида pVAX-rbd и ПЦР-продукт H5 delT4 обрабатывались эндонуклеазами рестрикции AsuNI и CciNI. Для клонирования последовательности H5 stebI в составе вектора pVAX1 плазида pVAX-H5 и ПЦР-продукт H5 stebI обрабатывались эндонуклеазами рестрикции BglII и CciNI. Для клонирования последовательности H5 в составе pVAX-Cas1 плазида pVAX-Cas1+GFP и ПЦР-продукт H5 обрабатывались эндонуклеазами рестрикции Psp124BI и BamHI.

Реакционная смесь была приготовлена из расчета активности фермента (2-5 е. а. на 1 мкг ДНК) и количества плазмидной ДНК (~3 мкг на реакцию). Условия реакции: температура, состав буфера и длительность проведения ферментативного гидролиза ДНК были выбраны в соответствии с инструкциями производителя. После проведения гидролиза продукты анализировали с помощью электрофореза в 1 %-м агарозном геле с последующим выделением их из геля.

2.2.10 Лигирование фрагментов ДНК

Гидролизаты последовательности H5 и вектора pVAX1, последовательности H5 stebI и вектора pVAX1, последовательности H5 delT4 и вектора pVAX1, а также гидролизаты последовательности H5 и pVAX-Cas1 смешивали в лигазном буфере, исходя из молярного соотношения 2:1 соответственно, добавляли ДНК-лигазу фага T4 (5 е. а./мкг ДНК). Смесь инкубировали при 25 °C в течение 30 минут. После этого лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli*.

2.2.11 Отбор клонов

Отбор клонов, содержащих плазмиды со встроенными последовательностями H5, H5 stebI или H5 delT4, проводили с помощью анализа электрофоретической активности ДНК, выделенной из бактериальной культуры клонов, в 1 %-м агарозном геле. Клоны были выбраны исходя из разницы в электрофоретической подвижности исходного вектора и вектора со вставкой целевого гена.

2.2.12 Секвенирование ДНК

Структуру полученных рекомбинантных плазмид pVAX-H5, pVAX-H5 stebI, pVAX-H5-delT4, pVAX-Cas1CC-H5 подтверждали секвенированием методом Сэнгера. Для выравнивания нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей данных участков использовалась программа SnapGene 3.2.1 (GSL Biotech LLC, США).

2.2.13 Трансфекция клеток НЕК293

Клетки НЕК293 культивировали в 6-луночных культуральных планшетах с питательной средой DMEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 50 мкг/мл гентамицина. Монослой 70-80 % конфлюэнтных клеток трансфицировали плазмидами pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4 с использованием Lipofectamine 3000 по методике, рекомендованной производителем.

2.2.14 ОТ-ПЦР

Через 48 ч после трансфекции клетки и культуральную среду переносили в пробирки и центрифугировали 5 минут при 1600 об/минуту. Клеточный осадок ресуспендировали в PBS и выделяли общий пул РНК с использованием реагента ЛИРА согласно рекомендациям производителя. Выделенные образцы РНК обрабатывали ДНКазой I в течение 10 минут при 65 °С.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием праймеров Uni-pVAX-F и Uni-pVAX-R (таблица 2.1) для получения ДНК гена, кодирующего гемагглютинин вируса гриппа А (H5N8), с помощью набора БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстра (2×) согласно инструкции производителя. В пробирки для ПЦР добавляли следующие компоненты из расчета объема одной реакционной смеси 50 мкл: 2× смесь для ОТ-ПЦР-Экстра – 25 мкл, БиоМастер Экстра-микс – 2 мкл, прямой праймер Uni-pVAX-F с концентрацией 10 мкМ – 2,5 мкл, обратный праймер Uni-pVAX-R с концентрацией 10 мкМ – 2,5 мкл, РНК-матрица – 5 мкл, стерильная вода до общего объема 50 мкл. Готовую реакционную смесь помещали в предварительно прогретый амплификатор (Veriti, Thermo Fisher Scientific, США). Для проведения ОТ-ПЦР использовали следующий режим: обратная транскрипция – 55 °С в течение 30 минут, предварительная денатурация – 93 °С в течение 5 минут, затем 35 циклов: 93 °С – 10 секунд, 56 °С – 10 секунд, 68 °С – 45 секунд, финальная элонгация при 68 °С в течение 5 минут. После проведения ОТ-ПЦР продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1 %-м агарозном геле.

2.2.15 Вестерн-блот

Для вестерн-блот анализа использовали сыворотку хорька, заражённого вирусом гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), и антихорьковые осаждённые иммуноглобулины из сыворотки мыши, полученные сотрудниками отдела зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Электрофоретическое разделение белков из культуральной среды после трансфекции клеток HEK293 плазмидами pVAX-H5, pVAX-H5 stebl, pVAX-H5-delT4 проводили в SDS-ПААГ по Лэммли в редуцирующих условиях при постоянном напряжении 150 В в камере Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, США). После этого разделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану методом полусухого переноса на системе Power Blotter XL (Thermo Fisher Scientific, США). Вестерн-блот анализ проводили с использованием системы SNAP i.d. 2.0 (Millipore, США) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве первичных антител использовали сыворотку хорька, заражённого вирусом гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) (разведение 1:200). В качестве вторичных антител – антихорьковые осаждённые иммуноглобулины из сыворотки мыши (разведение 1:3000), и далее антимышиный иммуноглобулин G, конъюгированный со щелочной фосфатазой (разведение 1:5000). Визуализацию иммунного комплекса осуществляли субстратом 1-Step™ NBT/BCIP.

2.2.16 Подготовка матрицы для синтеза мРНК

В качестве матрицы для синтеза мРНК использовали генетическую конструкцию pVAX-Cas1CC-H5, несущую целевой ген под контролем T7-промотора, полученную в результате клонирования. T7-промотор в составе матрицы был модифицирован для правильного присоединения AG-Сар-аналога. Перед процедурой получения мРНК плазида была линейаризована с использованием эндонуклеазы рестрикции EcoRI. Условия реакции: температура, состав буфера и длительность проведения ферментативного гидролиза ДНК – в соответствии с инструкциями производителя. Для очистки линейной формы был проведен электрофорез в 1 %-м агарозном геле с последующим выделением продукта из геля с использованием набора HiPure Gel DNA Mini Kit.

2.2.17 Синтез мРНК *in vitro*

Синтез мРНК с котранскрипционным экпированием и полиаденилированием проводили с использованием набора T7 High Yield RNA Synthesis Kit. В качестве матрицы была использована линейаризованная плазида pVAX-Cas1CC-H5, несущая ген модифицированного гемагглютиниона вируса гриппа А (H5N8) с тримеризующим доменом.

Реакционная смесь содержала 1 мкг линейаризованной матрицы pVAX-Cas1CC-H5, T7-полимеразу с буфером, AG-Сар-аналог (Аналог кэпа m7GmAmG) (100 mM), ингибитор РНКаз, безнуклеазную воду и смесь рибонуклеозидтрифосфатов (100 mM каждого), в которой уридин был заменен на N1-метилпсевдоуридин. В пробирки на 1,5 мл добавляли следующие компоненты из расчета объема реакционной смеси 20 мкл: T7-буфер – 2 мкл, смесь рибонуклеозидтрифосфатов – 8 мкл, AG-Сар-аналог – 1,2 мкл, ДНК-матрицу с концентрацией 400 нг/мкл – 2,5 мкл, ингибитор РНКаз – 1 мкл, T7-полимеразу – 2 мкл, безнуклеазную воду до общего объема 20 мкл. Реакционная смесь была инкубирована при 37 °C в течение 3 часов. После этого в смесь добавляли 1 мкл ДНКазы I (1 е. а./мкл) и инкубировали при 37 °C в течение 30 минут для разрушения ДНК-матрицы. Далее к реакционной смеси добавляли 20 мкл 5М ацетата аммония, инкубировали смесь при –20 °C в течение 15 минут и центрифугировали при 13000 об/минуту при 4 °C. Супернатант сливали, полученный осадок промывали 100 мкл 70 %-го этанола и подсушивали при комнатной температуре. После этого осадок растворяли в безнуклеазной воде. Анализ гомогенности и целостности полученного продукта, а также его молекулярного размера проводили с использованием электрофореза в 2 %-м агарозном геле.

2.2.18 Синтез липидных наночастиц

mRNA-H5-LNP получали быстрым микрофлюидным смешиванием водной фазы, содержащей РНК, и этанольной (органической) фазы, содержащей смесь липидов. Водная фаза представляла собой mRNA-H5 в 100 mM цитратном буфере, pH 4. Этанольная фаза состояла из смеси «ионизируемый липид:фосфолипид:вспомогательный липид:ПЭГ-липид» в молярном процентном соотношении 50:10:38,5:1,5 соответственно; все липиды были растворены в 96 %-м этиловом спирте. Липиды представляли собой ионизируемый липид SM-102, нейтральный фосфолипид DSPC, вспомогательный липид холестерин и ПЭГ-липид DMG-PEG2000. Соотношение азота в SM-102 к фосфату мРНК составляло 6:1. Фазы смешивали с использованием прибора Automated NP System (Dolomite Microfluidics, Великобритания). Смешивание происходило в микрофлюидном чипе типа MicroMixer, представляющем собой систему расположенных в шахматном порядке узлов типа «елочка». Протокол процедуры: общий объем смеси – 1,6 мл; соотношение водной фазы к органической – 3:1; скорость потока – 4800 мкл/минуту. Последовательно к чипу

для смешивания был подключен чип для разбавления смеси mRNA-H5-LNP PBS, pH 7, со скоростью потока 1600 мкл/минуту.

После получения mRNA-H5-LNP разбавляли в 15 раз PBS, pH 7, а затем концентрировали с использованием центробежного концентратора JetSpin 30k MWCO (Jet Biofil, Китай), с последующей заменой буфера. Далее доводили общий объем полученных mRNA-H5-LNP для получения итоговой концентрации, соответствующей дозе 10 мкг инкапсулированной мРНК mRNA-H5 в 100 мкл PBS.

Аналогичным образом были получены препараты LNP без мРНК, в качестве водной фазы выступал цитратный буфер.

2.2.19 Определение гидродинамического размера и ζ -потенциала комплексов mRNA-H5-LNP

Гидродинамический размер частиц mRNA-H5-LNP и ненагруженных LNP определяли методами динамического и электрофоретического светорассеяния и измеряли с использованием усредненного по интенсивности размера частиц, индекса полидисперсности и ζ -потенциала с использованием Zetasizer NanoZSPlus (Malvern Instruments, Великобритания). Кюветы ZEN0040 использовались для измерения размера, а DTS1070 – для измерения ζ -потенциала слоя наночастиц. Все измерения проводили в трех сериях при 25 °C.

2.2.20 Определение степени инкапсуляции мРНК в LNP

Процент инкапсулирования и концентрацию мРНК определяли с помощью набора реагентов Quant-iT RiboGreen RNA в соответствии с протоколом производителя, за исключением того, что мРНК mRNA-H5 была стандартной РНК для создания калибровочной кривой. Вкратце, mRNA-H5-LNP разрушались с помощью 2 %-ого раствора Triton X-100 в ТЕ-буфере в 96-луночном планшете. К образцу добавляли 1х краситель Quant-iT RiboGreen RNA в ТЕ-буфере и считывали данные флуоресценции образца ($\lambda_{\text{возб}} = 485$ нм, $\lambda_{\text{изм}} = 520$ нм) с планшета с помощью планшетного считывателя Varioskan™ LUX (ThermoFisherScientific, США). Общее количество нуклеиновых кислот в образце определяли путем применения относительных флуоресцентных единиц к стандартной кривой нуклеиновых кислот с детергентом. Одновременно в тех же условиях, но без детергента, измеряли неповрежденные LNP для обнаружения неинкапсулированной нуклеиновой кислоты. Количество РНК, инкапсулированной в LNP, определяли, вычитая количество неинкапсулированной РНК из общего количества

РНК в образце. Наконец, количество инкапсулированной РНК делили на общее количество РНК в образце, чтобы получить коэффициент инкапсуляции.

2.2.21 Электронная микроскопия препаратов mRNA-H5-LNP

Для оценки размера и формы комплексов mRNA-H5-LNP и ненагруженных LNP суспензию наносили на медные сетки для электронной микроскопии, покрытые стабилизированной углеродом плёнкой. Препараты окрашивали 2 %-м водным раствором уранилацетата. Исследование проводили с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония). Сбор изображений, их анализ и обработка выполнялись с помощью цифровой камеры Veleta (EMSIS GmbH, Германия) и программного обеспечения iTEM (EMSIS GmbH, Германия).

2.2.22 Иммунизация мышей линии BALB/c

Работа с животными проводилась в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных». Протоколы были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) при Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Протокол БЭК № 1 от 21.03.2023 и Протокол БЭК № 3 от 29.02.2024).

Для иммунизации использовали самок мышей линии BALB/c весом 16-18 г.

Препараты мРНК в LNP, рекомбинантного эукариотического белка HA/H5 (полученного сотрудниками отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия) и инактивированного вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) (в общем объеме 100 мкл для каждого образца) вводили в двуглавую мышцу бедра левой задней лапы с помощью инсулиновых шприцев с иглой 29G. Препараты ДНК и мРНК, растворенные в 50 мкл физиологического раствора и PBS соответственно, вводили в область левой задней лапы методом СИ с помощью инжектора Comfort-IN (Comfort-IN, Австралия) с использованием индивидуальных насадок-сопло. Параметры инжектора: скорость потока 220 м/с, давление 6,5 бар, время инъекции 0,33 с. Для обездвиживания животных применяли ингаляционный наркоз животных (RWD, США) с 2,5 %-м изофлураном. При иммунизации животных сначала помещали в индукционную камеру наркозной системы, в которую подается анестезирующий газ для введения в наркоз, а затем животных перемещали под наркозные маски для осуществления дальнейших манипуляций. Волосы на бедрах удаляли с помощью геля для депиляции и обрабатывали кожу спиртовым раствором.

Иммунизация ДНК-вакцинами:

Для сравнительного анализа иммуногенности ДНК-вакцин pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4 животные были разделены на пять групп по 6 особей в каждой группе: 1-й группе вводили 100 мкг pVAX-H5 delT4 с помощью СИ; 2-й группе вводили 100 мкг pVAX-H5 stebl с помощью СИ; 3-й группе вводили 100 мкг pVAX-H5 с помощью СИ; 4-й группе вводили 100 мкг pVAX1 с помощью СИ; 5-я группа состояла из интактных животных. Иммунизацию проводили два раза с интервалом 21 день. Через 14 дней после второй иммунизации осуществляли забор крови из ретроорбитального синуса глаза для оценки гуморального иммунного ответа. Животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации.

Для анализа дозозависимого эффекта ДНК-вакцины pVAX-H5 животные были разделены на семь групп по 8 особей в каждой группе: 1-й группе вводили 1 мкг pVAX-H5 с помощью СИ; 2-й группе вводили 10 мкг pVAX-H5 с помощью СИ; 3-й группе вводили 50 мкг pVAX-H5 с помощью СИ; 4-й группе вводили 100 мкг pVAX-H5 с помощью СИ; 5-й группе вводили 200 мкг pVAX-H5 с помощью СИ; 6-й группе вводили 25 мкг рекомбинантного белка HA/H5 в PBS с гидроокисью алюминия; 7-я группа состояла из интактных животных. Иммунизацию проводили два раза с интервалом 21 день. Через 14 дней после второй иммунизации осуществляли забор крови из ретроорбитального синуса глаза для оценки гуморального иммунного ответа. Животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации.

Для анализа иммуногенных свойств ДНК-вакцины pVAX-H5 животные были разделены на три группы по 6 особей в каждой группе: 1-й группе вводили 100 мкг pVAX-H5 с помощью СИ; 2-й группе вводили 100 мкг pVAX1 с помощью СИ; 3-я группа состояла из интактных животных. Иммунизацию проводили два раза с интервалом 21 день. Через 14 дней после второй иммунизации осуществляли забор крови из ретроорбитального синуса глаза для оценки гуморального иммунного ответа. Животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации с последующим забором селезёнок для анализа Т-клеточного ответа.

Для анализа протективных свойств ДНК-вакцины pVAX-H5 животные были разделены на три группы, 10 особей в 1-й группе и по 8 особей во 2-й и 3-й группах: 1-й группе вводили 100 мкг pVAX-H5 с помощью СИ; 2-й группе вводили инактивированный вирус гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) в комплексе с неполным

адьювантом Фрейнда (в концентрации 1×10^6 вирусных частиц на 1 мл); 3-я группа состояла из интактных животных. Иммунизацию проводили два раза с интервалом 21 день. Через 14 дней после второй иммунизации осуществляли забор крови из ретроорбитального синуса глаза для оценки гуморального иммунного ответа и далее проводили заражение штаммом вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8).

Для анализа протективных свойств ДНК-вакцины pVAX-H5 на других штаммах вируса гриппа животные были разделены на три группы, по 20 особей в 1-й группе и 3-й группе и 10 особей во 2-й группе: 1-й группе вводили 100 мкг pVAX-H5 с помощью СИ; 2-й группе вводили 100 мкг pVAX1 с помощью СИ; 3-я группа состояла из интактных животных. Иммунизацию проводили два раза с интервалом 21 день. Через 14 дней после второй иммунизации осуществляли забор крови из ретроорбитального синуса глаза для оценки гуморального иммунного ответа и далее проводили заражение штаммами вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1).

Иммунизация мРНК-вакциной mRNA-H5:

Для анализа формирования гуморального и Т-клеточного ответа животные были разделены на четыре группы по 6 особей в каждой группе: 1-й группе вводили 10 мкг мРНК mRNA-H5, инкапсулированной в LNP, в PBS; 2-й группе вводили 30 мкг мРНК mRNA-H5 в PBS с помощью СИ; 3-й группе вводили 25 мкг рекомбинантного белка HA/H5 в PBS с гидроокисью алюминия; 4-я группа состояла из интактных животных. Иммунизацию проводили два раза с интервалом 21 день. Через 14 дней после второй иммунизации осуществляли забор крови из ретроорбитального синуса глаза для оценки гуморального иммунного ответа. Животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации с забором селезёнок для анализа Т-клеточного ответа.

Для анализа протективных свойств животные были разделены на 4 группы по 20 особей в каждой группе: 1-й группе вводили 10 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5, инкапсулированной в LNP, в PBS; 2-й группе вводили 30 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 в PBS с помощью СИ; 3-й группе вводили 25 мкг рекомбинантного белка HA/H5 в PBS с гидроокисью алюминия; 4-я группа состояла из интактных животных. Иммунизацию проводили два раза с интервалом 21 день. Через 14 дней после второй иммунизации был осуществлен забор крови из ретроорбитального синуса глаза для оценки гуморального иммунного ответа и далее проводили заражение штаммами вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

2.2.23 Иммуноферментный анализ (ИФА)

В качестве антигена для ИФА использовали рекомбинантный эукариотический белок HA/H5, полученный сотрудниками отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Россия). Антиген сорбировали на 96-луночные планшеты в концентрации 1 мкг/мл в 2 М мочеvine в течение ночи при 4 °С. Планшеты трижды промывали и инкубировали в течение 1,5 ч при комнатной температуре с 1 % казеина в PBST для блокирования неспецифического связывания белка. Затем планшеты инкубировали с трехкратными серийными разведениями сыворотки иммунизированных животных в течение 1 ч при комнатной температуре, после промывки PBST добавляли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. В качестве вторичных антител использовали антитела козы против IgG мыши, меченные пероксидазой хрена. После окончательной промывки планшеты проявляли с использованием субстрата TMB. Реакцию останавливали 1N HCl, и проводили измерение оптической плотности на приборе Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм. Конечный титр определялся по последнему разведенному образцу, давшему положительные результаты на ИФА.

2.2.24 Вируснейтрализующая активность иммунных сывороток

В работе использовали штаммы вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8), A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1), A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1), A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1) (Государственная коллекция патогенов вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия). Сначала сыворотки иммунизированных мышей линии BALB/c обрабатывали ферментом, разрушающим рецепторы, и инактивировали нагреванием перед анализом. Стандартная доза вируса составляла 100 TCID₅₀/100 мкл вирусного разбавителя. В 200 мкл вирусного разбавителя готовили двукратные разведения сыворотки крови, затем в каждую пробирку добавляли 200 мкл стандартизированного вируса и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. В качестве контроля использовали сыворотку неиммунных мышей. После этого 200 мкл суспензии переносили в лунки 96-луночного планшета с клеточной культурой MDCK-SIAT1; планшеты инкубировали в течение 3 дней в среде Opti-MEM I с 1 мкг/мл TPCK-трипсина при 37 °С, 5 % CO₂. После инкубации клетки окрашивали раствором кристаллического фиолетового и анализировали с помощью многорежимного устройства

для визуализации клеток Agilent BioTek Cytation 5 (Thermo Fisher Scientific, США). Титр сыворотки в тесте вируснейтрализации равен разведению сыворотки, при котором остаётся 50 % живых клеток. В контрольной группе было не более 5 % живых клеток.

2.2.25 Оценка Т-клеточного ответа методом ELISpot

У мышей линии BALB/c Т-клеточный иммунный ответ определяли с помощью метода ELISpot с использованием набора Mouse IFN- γ ELISpot Plus. Селезенки животных были получены через две недели после второй иммунизации. Спленоциты получали последовательным гомогенизированием через фильтры 70 и 40 мкм (BD Falcon, США). После лизиса эритроцитов лизирующим буфером спленоциты дважды отмывали в среде RPMI и помещали в 1 мл среды RPMI с L-глутамином и гентамицином. На 96-луночном планшете из набора были иммобилизованы антитела против IFN- γ мыши. После блокировки планшета RPMI спленоциты пассировали в количестве 5×10^5 клеток/лунка и стимулировали смесью вирус-специфических пептидов в концентрации 20 мкг/мл для каждого пептида (таблица 2.2). Клетки инкубировали 20 ч при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂, затем плашки отмывали, добавляли биотинилированные антитела против мышиного IFN- γ , которые проявляли с помощью конъюгата «стрептавидин-пероксидаза хрена» и субстрата АЕС. Число IFN- γ -продуцирующих клеток подсчитывали с помощью ELISpot-ридера (Carl Zeiss, Германия).

2.2.26 Исследование протективности ДНК-вакцины pVAX-H5

Все исследования по оценке защитных свойств ДНК-вакцины pVAX-H5 проводились в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных заболеваний».

В первом эксперименте через 14 дней после второй иммунизации мышей заражали интраназально 20 ЛД₅₀ (50 %-ная летальная доза) штамма вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) (20 ЛД₅₀ – 4,69 lg ЭИД₅₀ (эмбриональная инфекционная доза)). Во втором эксперименте через 14 дней после второй иммунизации мышей заражали интраназально 50 ЛД₅₀ (50 %-ная летальная доза) штамма вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) (50 ЛД₅₀ – 5,05 lg ЭИД₅₀) либо 50 ЛД₅₀ штамма вируса гриппа A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) (50 ЛД₅₀ – 7,05 lg ЭИД₅₀). Манипуляции по заражению мышей проводились под анестезией смесью тилетамина и золазепама, а также хлорида ксилазина. За животными наблюдали после заражения ежедневно в течение 14 дней, отслеживая клинические признаки, указывающие на развитие

заболевания: взъерошенность шерсти, гипотермию, истощение, неврологические нарушения и смерть, а также проводили измерение веса животных. В случаях, когда у мышей развивались тяжёлые состояния, несовместимые с жизнью, например анорексия (потеря более 20 % первоначальной массы тела), вялость, животное выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации. Всех остальных животных гуманно выводили из эксперимента путём цервикальной дислокации в конце эксперимента.

2.2.27 Исследование протективности мРНК-вакцины mRNA-H5

Все исследования по оценке защитных свойств мРНК-вакцины mRNA-H5 проводились в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных заболеваний».

Через 14 дней после второй иммунизации мышей заражали интраназально 20 ЛД₅₀ штамма вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) (20 ЛД₅₀ – 5,74 lg ЭИД₅₀) либо 20 ЛД₅₀ штамма вируса гриппа A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1) (20 ЛД₅₀ – 3,64 lg ЭИД₅₀). Манипуляции по заражению мышей проводились под анестезией смесью тилетамина и золазепама, а также хлорида ксилазина. За животными наблюдали после заражения ежедневно в течение 14 дней, отслеживая клинические признаки, указывающие на развитие заболевания: взъерошенность шерсти, гипотермию, истощение, неврологические нарушения и смерть, а также проводили измерение веса животных. В случаях, когда у мышей развивались тяжёлые состояния, несовместимые с жизнью, например анорексия (потеря более 20 % первоначальной массы тела), вялость, животное выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации. Всех остальных животных гуманно выводили в конце эксперимента путём цервикальной дислокации.

2.2.28 Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., США). Количественные данные представлены в виде медианы с диапазоном значений или среднего со стандартным отклонением и проанализированы с помощью непараметрических тестов. Межгрупповые различия оценивали с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса с post-hoc тестом Данна. Моделирование функции выживания проводилось с использованием множительной оценки Каплана-Мейера с последующим использованием лог-рангового теста Мантеля-Кокса.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данная глава посвящена разработке ДНК- и мРНК-вакцин для борьбы с заболеванием, вызываемым вирусом гриппа А (H5). Описан дизайн иммуногенов, получение ДНК- и мРНК-вакцин, анализ их иммуногенных и протективных свойств.

3.1 Дизайн иммуногенов для ДНК- и мРНК-вакцин

Гемагглютинин вируса гриппа является основным действующим веществом современных лицензированных противогриппозных вакцин. В данной работе для исследований был выбран ген, кодирующий НА вируса гриппа птиц штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), циркулировавший в России в Ставропольском крае в 2020 году среди сельскохозяйственной птицы и гомологичный по гемагглютининому штамму A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8), рекомендованному ВОЗ в качестве вакцинного (Pyankova O. G. *et al.*, 2021; Rudometov A. P. *et al.*, 2025). При проектировании аминокислотной последовательности иммуногена на основе НА в природную последовательность НА были внесены аминокислотные замены. При выборе аминокислотных мутаций мы опирались в том числе на литературные данные, полученные для других штаммов вируса гриппа А (Milder F. J. *et al.*, 2022). Для стабилизации тримера НА в области рН-переключателей субъединицы НА2 были внесены следующие замены аминокислотных остатков: положительно заряженные аминокислоты H26, K51 и E103 были заменены на нейтрально заряженные W26, I51 и I103. Также H25 в субъединице НА2 был заменен на R25; R25 является высококонсервативным остатком и входит в состав важного эпитопного участка, узнаваемого широко нейтрализующими антителами (Gopal A. V. *et al.*, 2025).

Дополнительно для стабилизации тримера на С-конец был добавлен тримеризующий домен фибритина бактериофага T4, способствующий формированию гомотримеров гемагглютинирина, с линкером GSG. Нативный сайт протеолиза гемагглютинирина вируса ВППГ KRRKR был заменен на сайт протеолиза KQTR из последовательности гемагглютинирина вируса гриппа подтипа А (H3) для обеспечения меньшей эффективности расщепления НА на субъединицы. Для получения секретируемого растворимого продукта из последовательности были удалены трансмембранный и цитоплазматический домены; сигнальный пептид MENIVLLLAIIVSLVK, обеспечивающий секрецию целевого белка, был взят из нативной последовательности гемагглютинирина вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-

01/2020 (H5N8). В результате была спроектирована последовательность гена, кодирующего модифицированный гемагглютинин вируса гриппа А (H5N8), обозначенная как Н5. Схема спроектированного иммуногена и модель спроектированного белка представлены на рисунке 3.1.

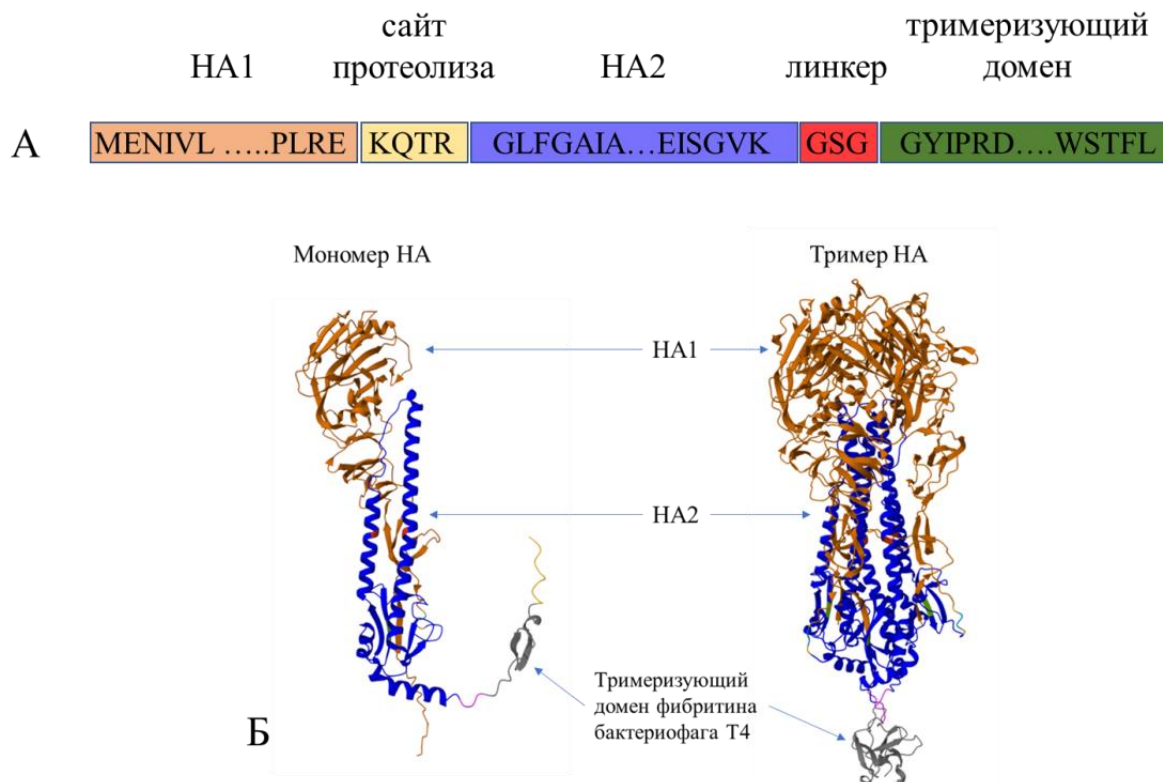


Рисунок 3.1 – Структура модифицированного гемагглютинина вируса гриппа А (H5N8). А – Схема аминокислотной последовательности иммуногена. HA1 – головной домен гемагглютинина; HA2 – стебель гемагглютинина; тримеризующий домен – тримеризующий домен фибритина бактериофага Т4. Б – Моделирование структуры спроектированного гемагглютинина вируса гриппа А (H5N8). Оранжевым цветом обозначен головной домен гемагглютинина (субъединица HA1), синим цветом обозначен стебель гемагглютинина (субъединица HA2), зеленым обозначен тримеризующий домен фибритина бактериофага Т4.

Интересным направлением является разработка вакцины, способной обеспечивать защиту против широкого спектра штаммов вируса гриппа. Стебель гемагглютинина содержит консервативные эпитопы, узнавание которых может приводить к формированию защитного иммунного ответа против различных подтипов вируса гриппа (Bazhan S. *et al.*, 2020; Fukuyama H. *et al.*, 2020). Поэтому на основе гена Н5 также была

получена последовательность, кодирующая стебель гемагглютинаина с тримеризующим доменом (обозначенная как H5 stebl). Также для оценки влияния на иммуногенность добавления к последовательности тримеризующего домена фибритина бактериофага T4 была получена последовательность, кодирующая тот же фрагмент гемагглютинаина вируса гриппа А (H5N8), что и в последовательности H5, но без тримеризующего домена (обозначенная как H5 delT4) (аминокислотные последовательности представлены в таблице 3.1). Модели спроектированных иммуногенов представлены на рисунке 3.2. Спроектированный ген H5 был получен путем химического синтеза и клонирован в составе плазмиды pUC-H5, на его основе с помощью ПЦР были получены гены H5 stebl и H5 delT4.

Таблица 3.1 – Аминокислотные последовательности исходного гемагглютинаина и модифицированного гемагглютинаина и его фрагментов

Название гена	Аминокислотная последовательность
Исходный полноразмерный гемагглютинин A/turkey/Stavropol/3 20-01/2020 (H5N8)	MENIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNV TVTHAQDILEKTHNGKLCDLNGVKPLILKDCSVAGWLLG NPMCDEFIRVPEWSYIVERANPANDLCYPGSLNDYEELK HLLSRINHFEKILIIPKSSWPNHETSLGVSAACPYQGAPSF RNVVWLIKKNDAYPTIKISYNNTNREDLLILWGIHHSNNA EEQTNLYKNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSQVNGQRG RMDFFWTILKPDDAIHFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTI MKSGVEYGH CNTKCQTPVGAINSSMPFHNIHPLTIGECPK YVKS NKLVLATGLRNSPLREKRRKRGLFGAIAGFIEGGW QGMVDGWYGYHHSNEQGS GYAADKESTQKAIDGVTNK VNSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLD VWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRD NAKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEA RLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTAASSLALAIMMAGLSL WMCSNGSLQCRICI
Модифицированный гемагглютинин (H5),	MENIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNV TVTHAQDILEKTHNGKLCDLNGVKPLILKDCSVAGWLLG

спроектированный на основе исходного полноразмерного гемагглютинина вируса гриппа	NPMCDEFIRVPEWSYIVERANPANDLCYPGSLNDYEELK HLLSRINHFEEKILIIPKSSWPNHETSLGVSAACPYQGAPSFF RNVVWLIKKNDAYPTIKISYNNTNREDLLILWGIHHSNNA EEQTNLYKNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSQVNGQRG RMDFFWTILKPDDAIHFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTI MKSGVEYGH CNTKCQTPVGAINSSMPFHNIHPLTIGECPK YVKSNKLVLATGLRNSPLREKQTRGLFGAIAGFIEGGWQ GMVDGWYGYRWSNEQGSYAADKESTQKAIDGVTNIV NSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDV WTYNAELLVLMINERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDN AKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEAR LKREEISGVKGS GG YIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL
Стебель гемагглютинина с мутациями (H5 stabl)	MENIVLLLAIVSLVKSDQIWGLFGAIAGFIEGGWQGMVD GWYGYRWSNEQGSYAADKESTQKAIDGVTNIVNSIIDK MNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNA ELLVLMINERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGN GCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKREEIS GVKGS GG YIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL
Фрагмент полноразмерного гемагглютинина с мутациями без тримеризующего домена (H5 delT4)	MENIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNV TVTHAQDILEKTHNGKLCDLNGVKPLILKDCSVAGWLLG NPMCDEFIRVPEWSYIVERANPANDLCYPGSLNDYEELK HLLSRINHFEEKILIIPKSSWPNHETSLGVSAACPYQGAPSFF RNVVWLIKKNDAYPTIKISYNNTNREDLLILWGIHHSNNA EEQTNLYKNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSQVNGQRG RMDFFWTILKPDDAIHFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTI MKSGVEYGH CNTKCQTPVGAINSSMPFHNIHPLTIGECPK YVKSNKLVLATGLRNSPLREKQTRGLFGAIAGFIEGGWQ GMVDGWYGYRWSNEQGSYAADKESTQKAIDGVTNIV NSIIDKMNTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDV WTYNAELLVLMINERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDN

	AKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEAR LKREEISGVK
--	--

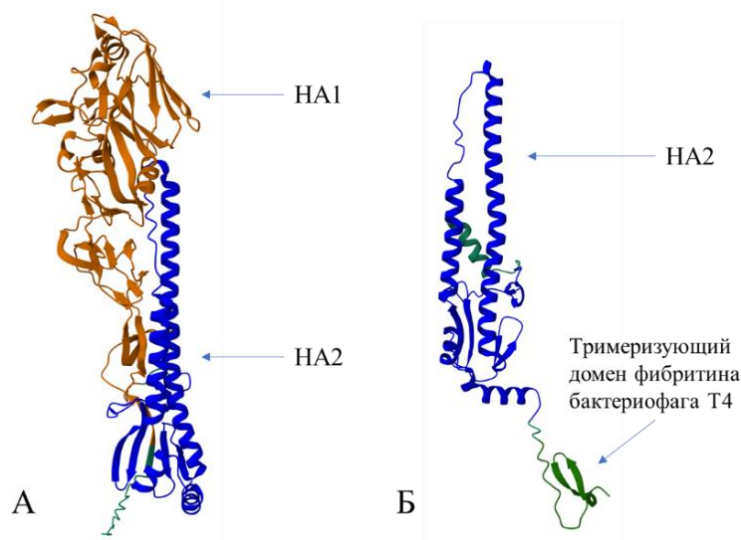


Рисунок 3.2 – Структура иммуногенов H5 delT4 и H5 stebl. А – Моделирование структуры иммуногена H5 delT4. Оранжевым цветом обозначен головной домен гемагглютиниона (субъединица HA1), синим цветом обозначен стебель гемагглютиниона (субъединица HA2). Б – Моделирование структуры иммуногена H5 stebl в мономерной форме. Синим цветом обозначен стебель гемагглютиниона (субъединица HA2), зеленым обозначен тримеризующий домен фибритина бактериофага Т4.

3.2 Получение экспериментальных ДНК-вакцин, несущих модифицированный гемагглютинин H5 и его фрагменты

Для клонирования последовательности H5 в составе вектора pVAX1 плазмида pVAX-rbd (содержащая вектор pVAX1) и плазмида pUC-H5 (несущая последовательность H5) были обработаны эндонуклеазами рестрикции AsuNI и CciNI, при этом при обработке плазмиды pVAX-rbd были получены два продукта размером ~3000 п. о. (целевой вектор pVAX1) и ~800 п. о. (фрагмент rbd), а при обработке плазмиды pUC-H5 – два продукта размером ~3000 п. о. (вектор pUC) и ~1650 п. о. (целевая вставка H5). Продукты были проанализированы с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим выделением целевых продуктов из геля (рисунок 3.3А). Затем проводили лигирование полученных фрагментов и трансформацию полученной лигазной смесью клеток *E. coli*. Далее проводили отбор клонов путем анализа электрофоретической

подвижности плазмидной ДНК, выделенной из бактериальной культуры 10 клонов (рисунок 3.3Б). Исходя из разницы в электрофоретической подвижности, были выбраны клоны, структуры которых были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. По итогам секвенирования наличие и целостность вставки были подтверждены в клоне 2. Так, была получена генетическая конструкция, несущая последовательность Н5 в составе вектора рVAX1, названная рVAX-Н5.

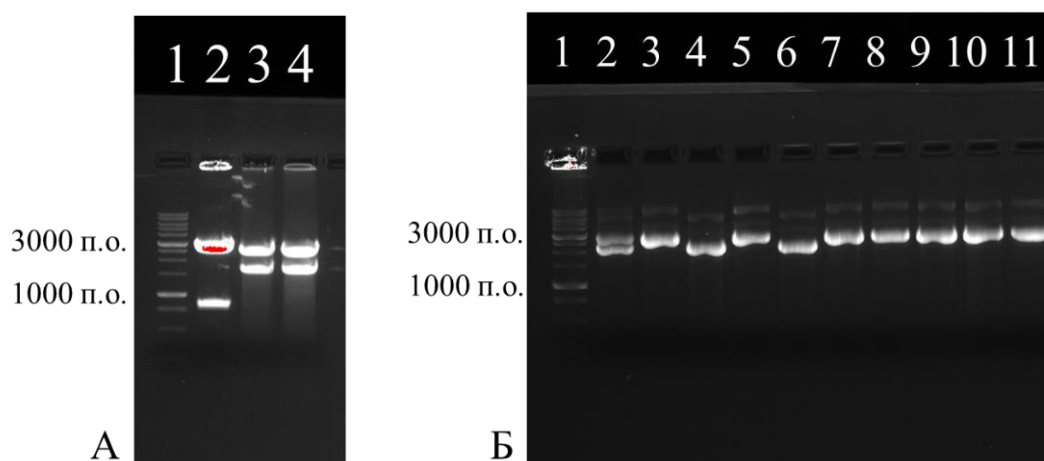


Рисунок 3.3 – Электрофореграммы, полученные в ходе клонирования гена Н5 в составе вектора рVAX1. А – Электрофореграмма разделения продуктов гидролиза эндонуклеазами рестрикции. 1 – маркер молекулярной массы М12, 2 – плазида рVAX-rbd, обработанная эндонуклеазами рестрикции *Asu*NI и *Cci*NI, 3, 4 – плазида рUC-Н5, обработанная эндонуклеазами рестрикции *Asu*NI и *Cci*NI. Б – Электрофореграмма разделения продуктов выделения ДНК из клонов. 1 – маркер молекулярной массы М12, 2-11 – клоны 1-10.

Для клонирования последовательностей Н5 *stebl* и Н5 *delT4* в составе вектора рVAX1 была проведена ПЦР с использованием плазмиды рUC-Н5 и пар специфических праймеров F-*stebl* и R-*stebl*, F-*delT4* и R-*delT4* (таблица 2.1) соответственно. После ПЦР продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза с последующим выделением продуктов размером ~700 п. о. (вставка Н5 *stebl*) и ~1600 п. о. (вставка Н5 *delT4*) из геля (рисунок 3.4А).

Далее плазида рVAX-Н5 и ПЦР-продукт Н5 *stebl* были обработаны эндонуклеазами рестрикции *Bgl*II и *Cci*NI, при этом при обработке плазмиды рVAX-Н5 были получены два продукта размером ~3000 п. о. (целевой вектор рVAX1) и ~1650 п. о. (фрагмент Н5), а при обработке ПЦР-продукта Н5 *stebl* – целевой продукт размером ~700

п. о. (вставка H5 stb1). Плазмиды pVAX-rbd и ПЦР-продукт H5 delT4 были обработаны эндонуклеазами рестрикции *AsuNI* и *CciNI*, при этом при обработке плазмиды pVAX-rbd были получены два продукта размером ~3000 п. о. (целевой вектор pVAX1) и ~800 п. о. (как было указано выше, рисунок 3.3А), а при обработке ПЦР-продукта H5 delT4 – целевой продукт размером ~1600 п. о. (вставка H5 delT4). Продукты были проанализированы с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим выделением целевых продуктов из геля (рисунок 3.4Б, 3.4В). Затем проводили лигирование полученных фрагментов и трансформацию полученной лигазной смесью клеток *E. coli*. Далее проводили отбор клонов путем анализа электрофоретической подвижности плазмидной ДНК, выделенной из бактериальной культуры 8 клонов (рисунок 3.4Г, 3.4Д). Исходя из разницы в электрофоретической подвижности были выбраны клоны, структуры которых были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. По итогам секвенирования наличие и целостность вставки были подтверждены в клоне 5 в случае клонирования последовательности H5 delT4 в составе pVAX1; в клоне 1 – в случае клонирования последовательности H5 stb1 в составе pVAX1. Так, были получены генетические конструкции, несущие последовательности H5 stb1 и H5 delT4 в составе вектора pVAX1, названные pVAX-H5 stb1 и pVAX-H5 delT4 соответственно.

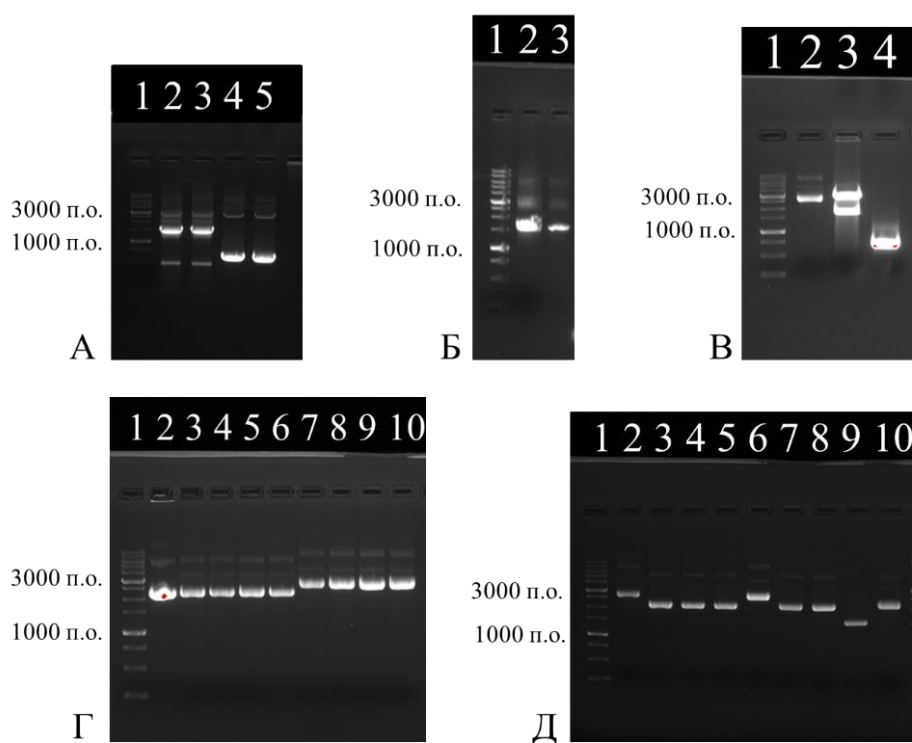


Рисунок 3.4 – Электрофореграммы, полученные в ходе клонирования генов H5 delT4 и H5 stb1 в составе вектора pVAX1. А – Электрофореграмма разделения продуктов

амплификации гена H5. 1 – маркер молекулярной массы M12, 2, 3 – ПЦР-продукт H5 delT4, 4, 5 – ПЦР-продукт H5 stebl. Б – Электрофореграмма разделения продуктов гидролиза эндонуклеазами рестрикции. 1 – маркер молекулярной массы M12, 2, 3 – ПЦР-продукт H5 delT4, обработанный эндонуклеазами рестрикции AsuNI и CciNI. В – Электрофореграмма разделения продуктов гидролиза эндонуклеазами рестрикции. 1 – маркер молекулярной массы M12, 2 – плазмида pVAX-H5, 3 – плазмида pVAX-H5, обработанная эндонуклеазами рестрикции BglII и CciNI, 4 – ПЦР-продукт H5 stebl, обработанный эндонуклеазами рестрикции BglII и CciNI. Г – Электрофореграмма разделения продуктов выделения ДНК из клонов, полученных в ходе клонирования последовательности H5 delT4 в составе вектора pVAX1. 1 – маркер молекулярной массы M12, 2 – плазмида pVAX-rbd, 3-10 – клоны 1-8. Д – Электрофореграмма разделения продуктов выделения ДНК из клонов, полученных в ходе клонирования последовательности H5 stebl в составе вектора pVAX1. 1 – маркер молекулярной массы M12, 2 – плазмида pVAX-H5, 3-10 – клоны 1-8.

Таким образом, были получены генетические конструкции pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4, несущие последовательности H5, H5 stebl, H5 delT4 в составе вектора pVAX1. Карты полученных плазмид представлены на рисунке 3.5. Полученные генетические конструкции были депонированы в Коллекцию бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (номера справок: № 1302/153, № 1302/159, № 1302/155 соответственно). ДНК-конструкции были наработаны и очищены в препаративном количестве с помощью набора EndoFree Plasmid Giga Kit для выделения плазмидной ДНК.

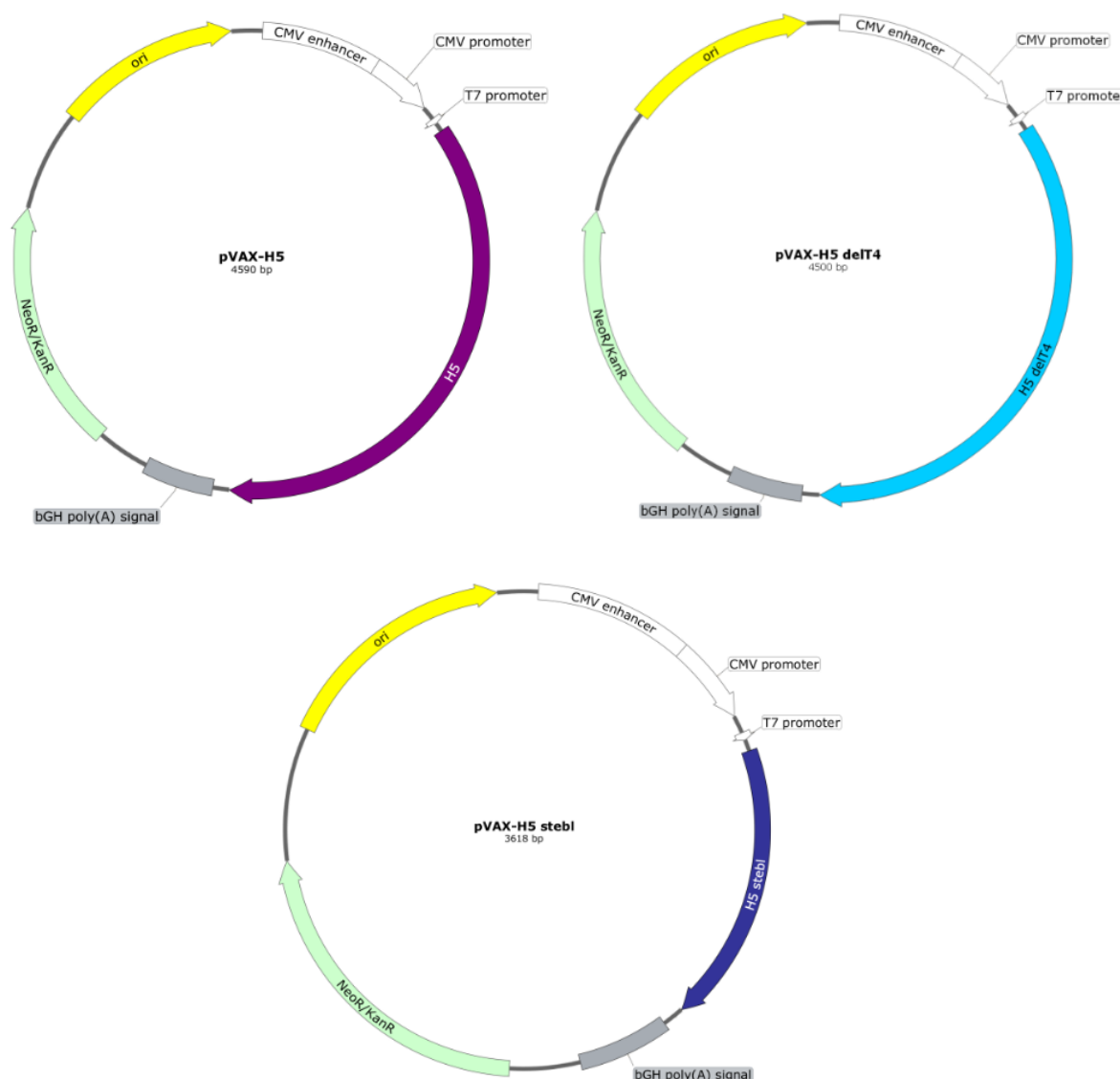


Рисунок 3.5 – Карты плазмид pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4.

3.3 Анализ экспрессии целевых генов в составе полученных ДНК-вакцин

Экспрессия целевых генов в составе полученных плазмид была исследована путем трансфекции эукариотических клеток НЕК293 плазмидами pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4 и последующего анализа трансфицированных клеток и культуральной среды методами ОТ-ПЦР и вестерн-блот анализа соответственно. Из трансфицированных клеток была выделена тотальная РНК, далее была проведена ОТ-ПЦР с использованием выделенной РНК и специфических праймеров Uni-pVAX-F и Uni-pVAX-R (таблица 2.1). Продукты ОТ-ПЦР были проанализированы с помощью электрофореза в агарозном геле; было показано, что размеры продуктов ОТ-ПЦР соответствуют теоретически

рассчитанным размерам спроектированных генов – ~1650 п. о., ~1600 п. о. и ~750 п. о. (рисунок 3.6А). Таким образом, была показана экспрессия генов на уровне транскрипции.

Иммуногены были спроектированы таким образом, чтобы получить секретируемый растворимый продукт, поэтому культуральная среда после трансфекции была исследована на наличие целевого белка методом вестерн-блот анализа. В качестве первичного антитела была использована инактивированная сыворотка хорька, зараженного вирусом гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). В результате вестерн-блот анализа после трансфекции клеток плазмидами pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4 было показано наличие целевого белка в культуральной среде по подвижности продукта на уровне 75 kDa, что свидетельствует о стабильности целевого белка (рисунок 3.6Б). После трансфекции клеток плазмидой pVAX-H5 stebl целевого белка в культуральной среде обнаружено не было, что могло быть связано с недостаточной эффективностью трансляции или выхода белка из клетки.

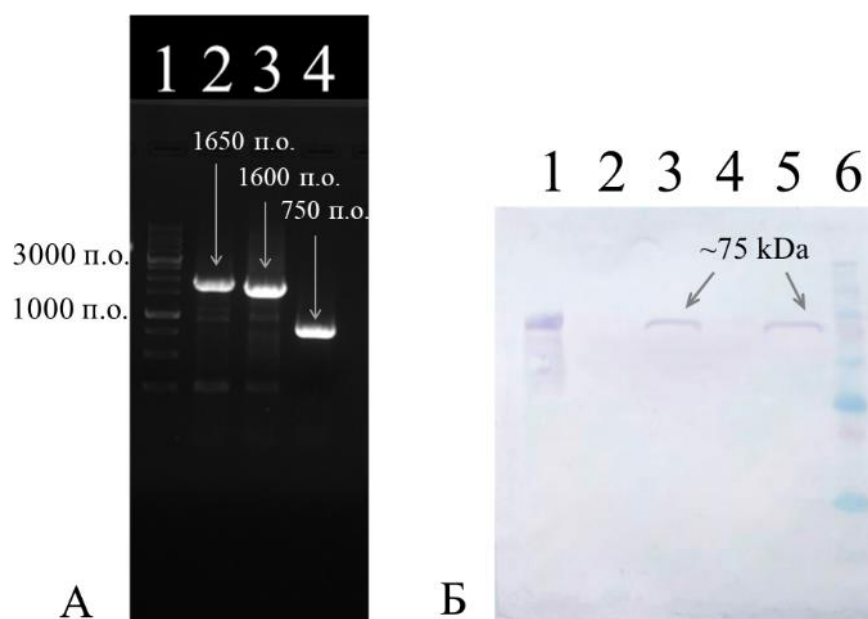


Рисунок 3.6 – Анализ экспрессии целевых генов в составе плазмид pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4. А – Электрофореграмма разделения продуктов ОТ-ПЦР. 1 – маркер молекулярной массы M12, 2 – продукты ОТ-ПЦР, полученные с тотальной РНК из клеток, трансфицированных плазмидой pVAX-H5, 3 – продукты ОТ-ПЦР, полученные с тотальной РНК из клеток, трансфицированных плазмидой pVAX-H5 delT4, 4 – продукты ОТ-ПЦР, полученные с тотальной РНК из клеток, трансфицированных плазмидой pVAX-H5 stebl. Б – Вестерн-блот анализ. 1 – рекомбинантный белок гемагглютинаина HA/H5 вируса гриппа штамма

A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), 2 – культуральная среда с чистых клеток HEK293, 3 – культуральная среда с клеток HEK293, трансфицированных плазмидой pVAX-H5 delT4, 4 – культуральная среда с клеток HEK293, трансфицированных плазмидой pVAX-H5 stebl, 5 – культуральная среда с клеток HEK293, трансфицированных плазмидой pVAX-H5, 6 – маркер молекулярных масс Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-rad, США).

По итогам анализа экспрессии было показано, что плазмиды pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4 обеспечивают синтез целевой РНК и целевых белков в эукариотических клетках.

3.4 Анализ иммуногенных и протективных свойств полученных ДНК-вакцин

Для анализа иммуногенности полученных экспериментальных ДНК-вакцин была проведена иммунизация лабораторных животных (мыши линии BALB/c) полученными ДНК-конструкциями. Экспериментальные ДНК-вакцины вводили животным методом безыгольной струйной инъекции (СИ). СИ представляет собой внутрикожную инъекцию под высоким давлением и обеспечивает высокую проницаемость клеточной мембраны для нуклеиновых кислот, что значительно повышает иммуногенность вакцины (Abbasi S. *et al.*, 2023). В качестве отрицательного контроля мышам также вводили исходный вектор pVAX1 с помощью СИ.

После двукратной иммунизации сыворотки животных были исследованы в ИФА, в качестве антигена для ИФА был использован рекомбинантный гемагглютинин HA/H5. Титры специфических антител были выявлены в группах животных, иммунизированных ДНК-конструкциями pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4; средние титры составили 1:219000 и 1:73000 соответственно (рисунок 3.7А). Далее сыворотки иммунизированных мышей были исследованы в реакции вируснейтрализации на культуре клеток MDCK-SIAT1. В результате было установлено, что сыворотки животных, иммунизированных ДНК-вакцинами pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4, способны нейтрализовать живой вирус гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8); средний 50 % нейтрализующий титр составил 1:7700 и 1:4000 соответственно (рисунок 3.7Б). Так, показано, что экспериментальные ДНК-вакцины pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4 индуцируют у иммунизированных животных формирование специфических к рекомбинантному гемагглютнину антител, обладающих вируснейтрализующей активностью.

В группе животных, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной pVAX-H5 stebl, не было показано формирования специфических к гемагглютинирующим антител. Отсутствие гуморального иммунного ответа согласуется с результатами вестерн-блот анализа, показавшими, что целевой белок, продуцируемый с ДНК-конструкции pVAX-H5 stebl, не транслируется или не выходит из клетки с достаточной эффективностью. Также есть данные, что при удалении головного домена гемагглюнина из нативной последовательности требуется оптимизация аминокислотной последовательности для формирования правильной конформации целевого белка-иммуногена на основе стебля HA (De Jong N. M. C. *et al.*, 2020).

По результатам эксперимента для дальнейшей работы была выбрана конструкция pVAX-H5, несущая модифицированный гемагглютинин вируса гриппа А (H5N8) с тримеризующим доменом, так как в случае pVAX-H5 наблюдалась тенденция к увеличению титра специфических к гемагглютинирующим антителам и вируснейтрализующих антител.

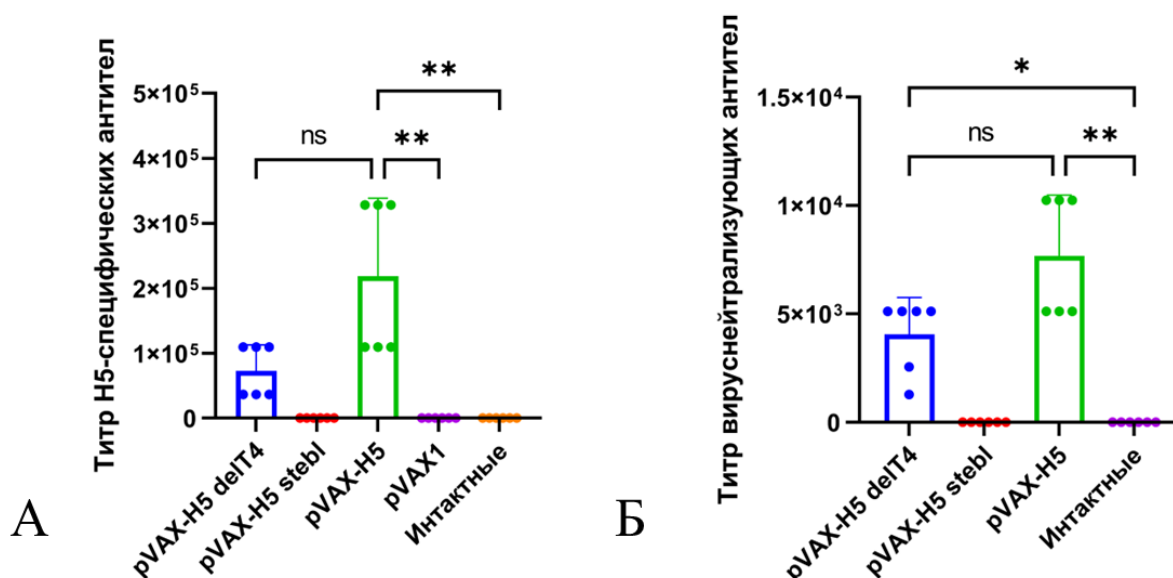


Рисунок 3.7 – Анализ иммуногенности ДНК-конструкций pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4 на мышах линии BALB/c. pVAX-H5 delT4 – группа животных, иммунизированных ДНК-конструкцией pVAX-H5 delT4; pVAX-H5 stebl – группа животных, иммунизированных ДНК-конструкцией pVAX-H5 stebl; pVAX-H5 – группа животных, иммунизированных ДНК-конструкцией pVAX-H5; pVAX1 – группа животных, иммунизированных вектором pVAX1; интактные животные – группа животных, не подвергавшихся никаким манипуляциям. А – Результаты ИФА сывороток мышей линии BALB/c, иммунизированных ДНК-конструкциями, кодирующими гемагглютинин вируса гриппа и его фрагменты. Данные представлены как среднее $\pm$ с. о.

Б – Вируснейтрализующая активность иммунных сывороток в отношении вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Данные представлены как среднее $\pm$ с. о (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Следующим этапом работы стало исследование дозозависимого эффекта ДНК-вакцины pVAX-H5. Мыши линии BALB/c были дважды иммунизированы 1, 10, 50, 100 или 200 мкг pVAX-H5 с использованием СИ. В качестве положительного контроля мышам также вводили рекомбинантный белок HA/H5 внутримышечно. Сыворотки крови иммунизированных животных были проанализированы в ИФА. Все дозы вакцины pVAX-H5 вызывали формирование специфических антител к рекомбинантному гемагглютининому HA/H5 вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) (рисунок 3.8А). Средние титры для разных доз составили: 1 мкг – 1:11000, 10 мкг – 1:30000, 50 мкг – 1:61000, 100 мкг – 1:70000, 200 мкг – 1:30000. Все дозы вакцины вызывали также формирование нейтрализующих антител в отношении штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) (рисунок 3.8Б). Согласно результатам сравнительного анализа иммуногенности, высокий уровень специфических антител к рекомбинантному гемагглютининому наблюдался при введении дозы 50 мкг и 100 мкг вакцины. Примечательно, что более высокая доза pVAX-H5 (200 мкг) не привела к увеличению титра антител по сравнению с дозой 100 мкг (разница статистически незначима, но в случае с дозой 200 мкг наблюдается тенденция к снижению). Наблюдаемый эффект может быть связан с тем, что чужеродная ДНК обладает адъювантными свойствами и активирует врожденный иммунитет, что, в свою очередь, может негативно влиять на экспрессию целевого гена и на специфическую иммуногенность (Werninghaus I. C. *et al.*, 2023; Kozak M. *et al.*, 2024). Таким образом, увеличение дозы может быть нецелесообразным или даже вредным в случае с ДНК-вакцинами, вводимыми методом СИ. Исходя из полученных данных для дальнейших исследований была выбрана доза 100 мкг ДНК-вакцины pVAX-H5.

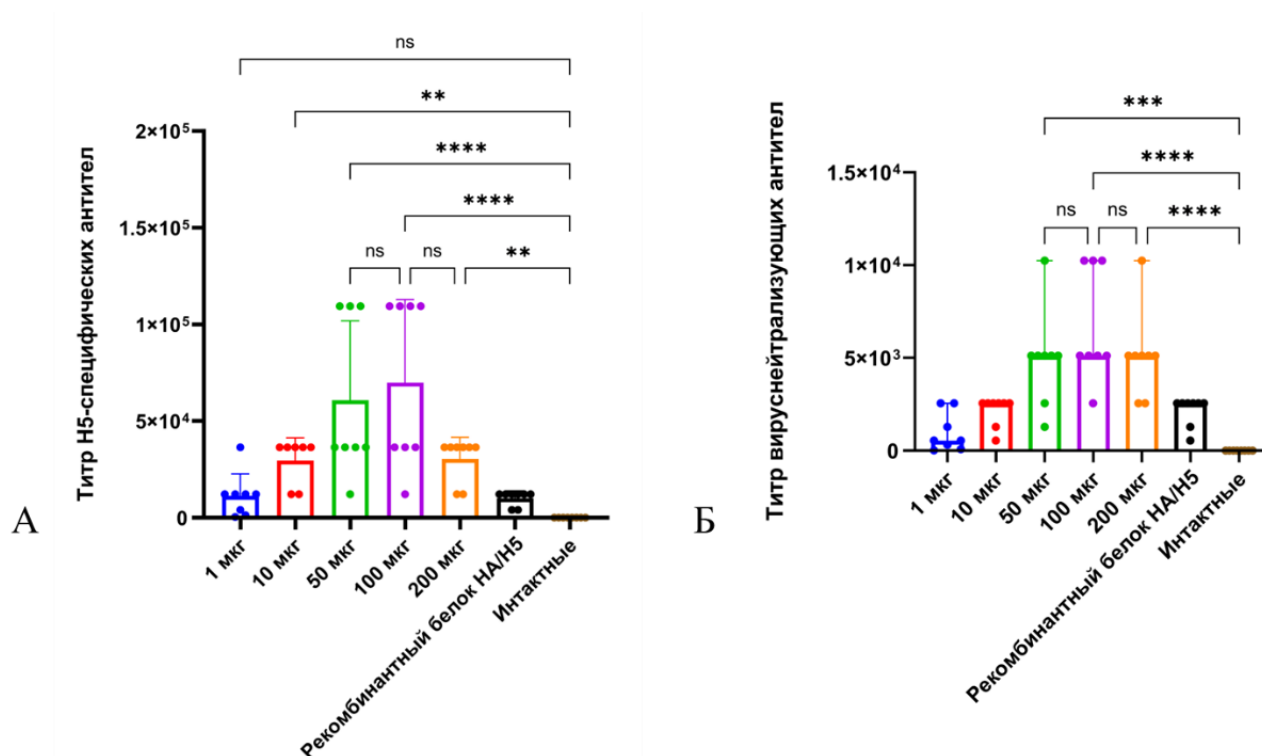


Рисунок 3.8 – Анализ дозозависимого эффекта pVAX-H5. 1 мкг – группа животных, иммунизированных 1 мкг pVAX-H5; 10 мкг – группа животных, иммунизированных 10 мкг pVAX-H5; 50 мкг – группа животных, иммунизированных 50 мкг pVAX-H5; 100 мкг – группа животных, иммунизированных 100 мкг pVAX-H5; 200 мкг – группа животных, иммунизированных 200 мкг pVAX-H5; Рекombинантный белок HA/H5 – группа животных, иммунизированных рекombинантным белком HA/H5 вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8); Интактные – группа животных, не подвергавшихся никаким манипуляциям. А – Результаты ИФА сывороток мышей линии BALB/c, иммунизированных разными дозами ДНК-вакцины pVAX-H5. Данные представлены как среднее ± с. о. Б – Вируснейтрализующая активность иммунных сывороток в отношении вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Данные представлены как медиана с диапазоном (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Далее было проведено подробное исследование формирования гуморального и клеточного иммунного ответа на ДНК-вакцину pVAX-H5, введенную лабораторным животным с помощью СИ в дозе 100 мкг. Для анализа иммуногенности была проведена двухкратная иммунизация мышей линии BALB/c. В качестве отрицательного контроля мышам также вводили исходный вектор pVAX1 с помощью СИ.

После иммунизации сыворотки животных были исследованы в ИФА. Титры специфических антител были выявлены только в группе животных, иммунизированных pVAX-H5, средний титр составил 1:97000 (рисунок 3.9А).

Сыворотки крови иммунизированных мышей также исследовали в реакции вируснейтрализации в культуре клеток MDCK-SIAT1. В результате было установлено, что сыворотки животных, иммунизированных ДНК-вакциной pVAX-H5, способны нейтрализовать живой вирус гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8); средний 50 % нейтрализующий титр составил 1:1600 (рисунок 3.9Б).

Для оценки способности полученной вакцинной конструкции индуцировать специфический клеточный иммунитет через 14 дней после второй иммунизации у мышей извлекали селезёнки, которые были гомогенизированы и исследованы с помощью метода ELISpot. Ответ оценивали по способности спленоцитов отвечать выделением IFN- γ на стимуляцию пептидами, входящими в состав НА. С помощью ELISpot было показано, что только в группе мышей, иммунизированных ДНК-вакциной, активируется специфический клеточный иммунитет, выраженный в значительном повышении количества спленоцитов, продуцирующих IFN- γ (рисунок 3.9В).

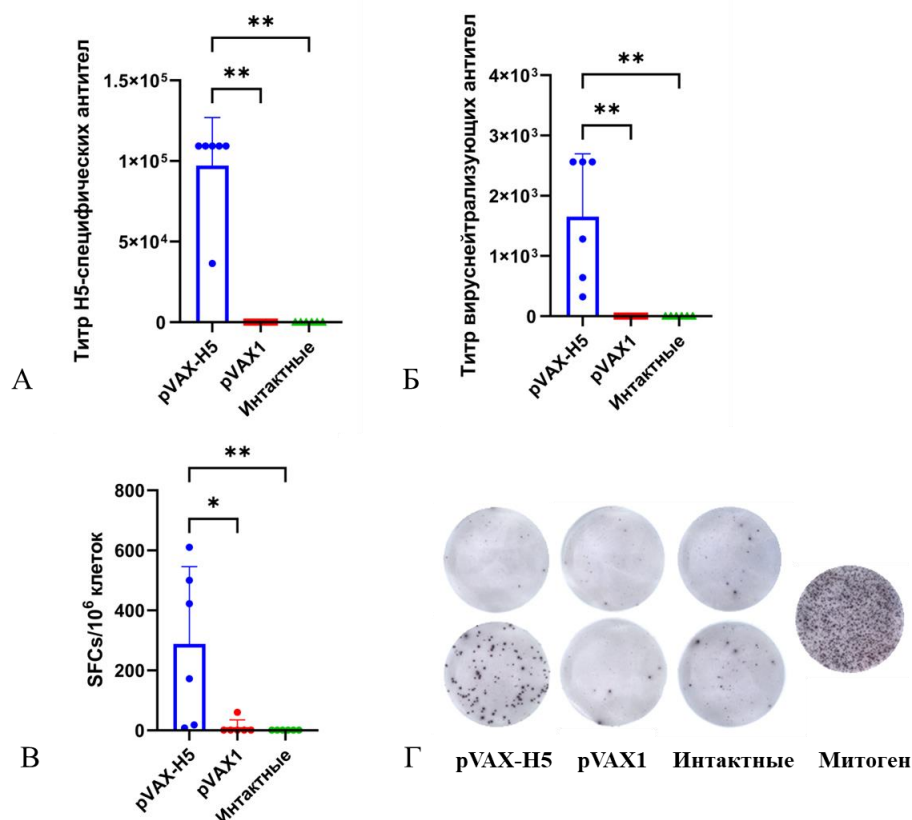


Рисунок 3.9 – Анализ иммуногенных свойств 100 мкг ДНК-вакцины pVAX-H5. pVAX-H5 – группа животных, иммунизированных pVAX-H5; pVAX1 – группа животных,

иммунизированных исходным вектором pVAX1; Интактные – группа животных, не подвергавшихся никаким манипуляциям. А – Результаты ИФА сывороток мышей линии BALB/c, иммунизированных ДНК-вакциной pVAX-H5. Данные представлены как среднее $\pm$ с. о. Б – Вируснейтрализующая активность иммунных сывороток в отношении вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Данные представлены как среднее $\pm$ с. о. В – Количество спленоцитов, экспрессирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов, определённое методом ELISpot. Каждый столбик представляет собой среднее число клеток, образующих пятна IFN- γ (SFCs), на миллион стимулированных спленоцитов. Данные представлены как среднее $\pm$ с. о. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Г – Репрезентативные изображения лунок ELISpot (верхний ряд: спленоциты, не стимулированные пептидами; нижний ряд: спленоциты, стимулированные пулом пептидов или митогеном).

Таким образом, было показано эффективное формирование вирус-специфического гуморального и клеточного иммунных ответов на ДНК-вакцину pVAX-H5 в дозе 100 мкг у мышей линии BALB/c.

После того, как была подтверждена иммуногенность pVAX-H5, следующим этапом работы был анализ способности экспериментальной ДНК-вакцины стимулировать формирование протективного иммунитета. Мыши линии BALB/c были дважды проиммунизированы 100 мкг pVAX-H5 с помощью СИ. В качестве положительного контроля мышам также вводили инактивированный вирус гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) внутримышечно. После двухкратной иммунизации у животных проводили забор крови из ретроорбитального синуса для оценки уровня антител после иммунизации при помощи ИФА. Результаты ИФА показали, что ДНК-вакцина pVAX-H5 индуцирует специфический гуморальный иммунный ответ; специфические антитела были выявлены и в группе животных, которым вводили инактивированный вирус. Средние титры антител составили 1:100000 и 1:30000 соответственно (рисунок 3.10А).

Через 14 дней после второй иммунизации мышей заражали интраназально вирусом гриппа штамма A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) (в дозе 20 ЛД₅₀) той же субклады 2.3.4.4b (по гемагглютанину), что и штамм A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), но выделенный от человека и рекомендованный ВОЗ в качестве вакцинного штамма. В

течение 14 дней после заражения регистрировали физиологические реакции и смертность животных. Результаты эксперимента (рисунок 3.10Б) показали, что выживаемость в группах мышей, иммунизированных ДНК-вакциной pVAX-H5 и инактивированным вирусом, составила 100 %. В группе контрольных животных выжило 10 % мышей (рисунок 3.10В), однако наблюдались явные признаки заболевания (гипотермия, снижение активности и аппетита), чего не наблюдалось в группах мышей, которым вводили ДНК-вакцину pVAX-H5 и инактивированный вирус. Эти результаты показывают, что ДНК-вакцина pVAX-H5 эффективно индуцирует защитный иммунитет у мышей.

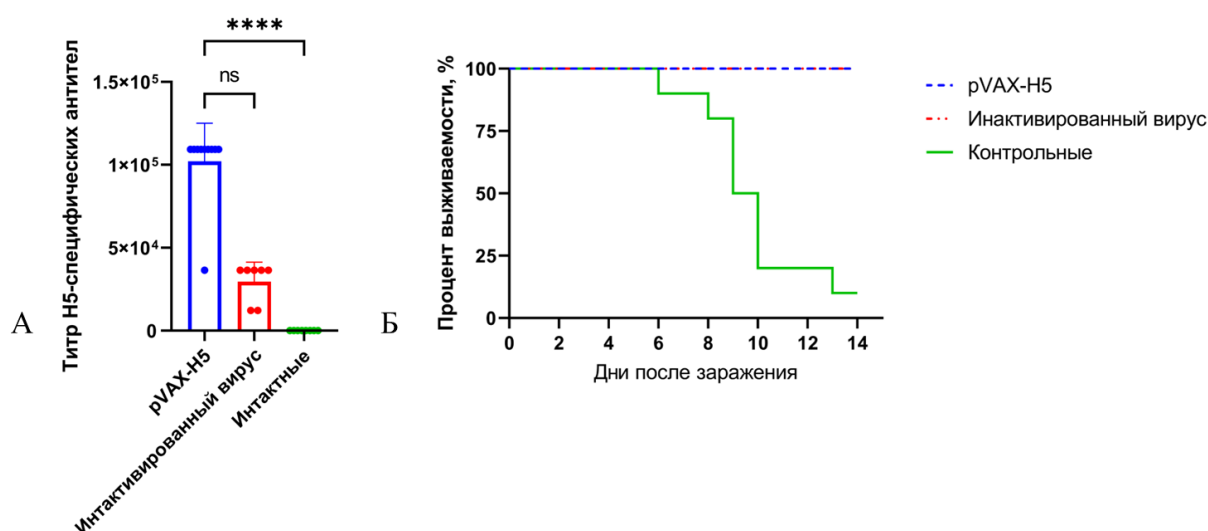


Рисунок 3.10 – Анализ протективных свойств ДНК-вакцины pVAX-H5. pVAX-H5 – группа животных, иммунизированных 100 мкг ДНК-вакцины pVAX-H5 с помощью СИ; Инактивированный вирус – группа животных, иммунизированных инактивированным вирусом гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8); Интактные – группа животных, не подвергавшихся каким-либо манипуляциям; Контрольные – группа животных, не подвергавшихся иммунизациям. А – Результаты ИФА для оценки иммуногенности экспериментальной ДНК-вакцины pVAX-H5. Данные представлены как среднее $\pm$ с. о. (**** $p < 0,0001$). Б – Кривые выживаемости иммунизированных животных после заражения вирусом гриппа штамма A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8).

Следующим этапом работы было исследование вируснейтрализующих свойств иммунных сывороток и протективных свойств ДНК-вакцины pVAX-H5 в отношении различных штаммов вируса гриппа. Все штаммы были выделены из секционного материала птиц во время вспышек ВППГ на территории России в 2022-2024 годах, в том

числе штаммы A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1), A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) и A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1). Сыворотки животных, иммунизированных 100 мкг рVAX-H5, были проанализированы в реакции вируснейтрализации в отношении четырех штаммов вируса гриппа А (H5) клады 2.3.4.4b. В результате было показано, что ДНК-вакцина рVAX-H5 на основе гемагглютинина штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) вызывала выработку антител, которые нейтрализовали как штамм A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8), так и штаммы A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1), A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) и A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1). Сыворотки реагировали со всеми штаммами вируса, при этом титры в отношении A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1) и A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1) варьировались от 1:160 до 1:1280. Самые низкие титры нейтрализующих антител были выявлены в отношении вируса гриппа A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) (1:40-1:80), что может быть связано с более низким антигенным сходством этого штамма с вакцинным штаммом (рисунок 3.11).

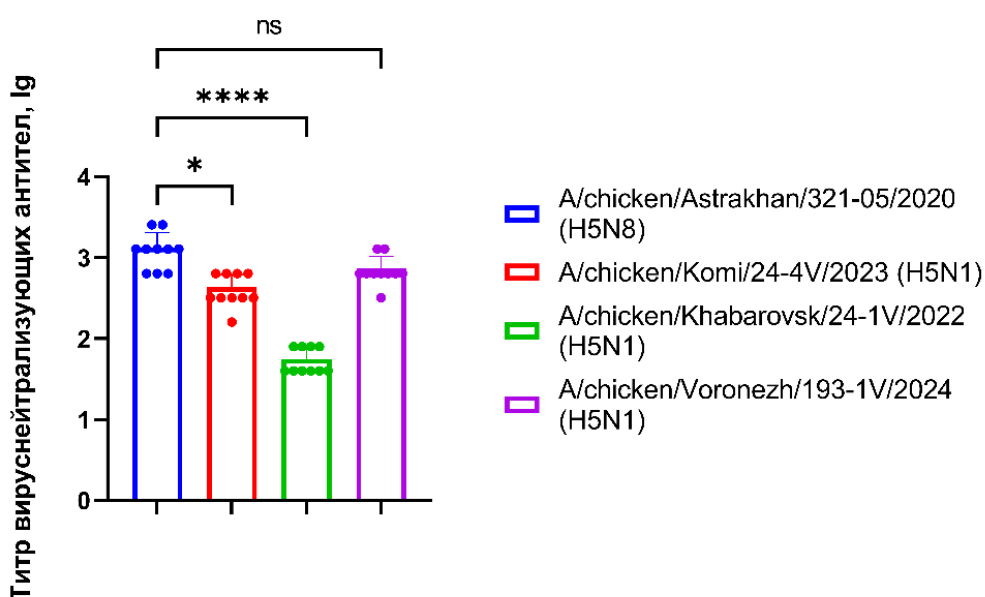


Рисунок 3.11 – Вируснейтрализующая активность сывороток мышей, иммунизированных 100 мкг ДНК-вакцины рVAX-H5 методом СИ в отношении штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8), A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1), A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) и A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1). Данные представлены как среднее $\pm$ с. о (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$).

Далее было исследовано защитное действие ДНК-вакцины pVAX-H5 при заражении иммунизированных животных разными штаммами вируса гриппа подтипа А (H5) клады 2.3.4.4b при увеличении дозы вируса до 50 ЛД₅₀. Мыши линии BALB/c были двухкратно иммунизированы с помощью СИ. Через 14 дней после второй иммунизации мышей заражали 50 ЛД₅₀ штамма вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) или 50 ЛД₅₀ штамма вируса гриппа A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1). Все иммунизированные ДНК-вакциной животные после заражения вирусом гриппа штамма A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) выжили, и у них отсутствовали клинические признаки заболевания. При этом животные, иммунизированные вектором pVAX1, погибли или были усыплены из-за сильной (более 20 %) потери веса или неврологических симптомов к 10-му дню после заражения, что свидетельствует об отсутствии у pVAX1 способности активировать неспецифический иммунитет, приводящий к защите животных от гибели. Контрольные животные также погибли или были усыплены к 10-му дню после заражения (рисунок 3.12А). При заражении летальной дозой штамма вируса гриппа A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) все вакцинированные животные также выжили, в то время как все контрольные животные погибли или были усыплены к 9-му дню после заражения (рисунок 3.12Б). Эти результаты показывают, что ДНК-вакцина эффективно индуцирует перекрестный защитный иммунитет *in vivo*, который, в частности, был обеспечен эффективным формированием Т-клеточного ответа (Rudometov A. P. *et al.*, 2025).

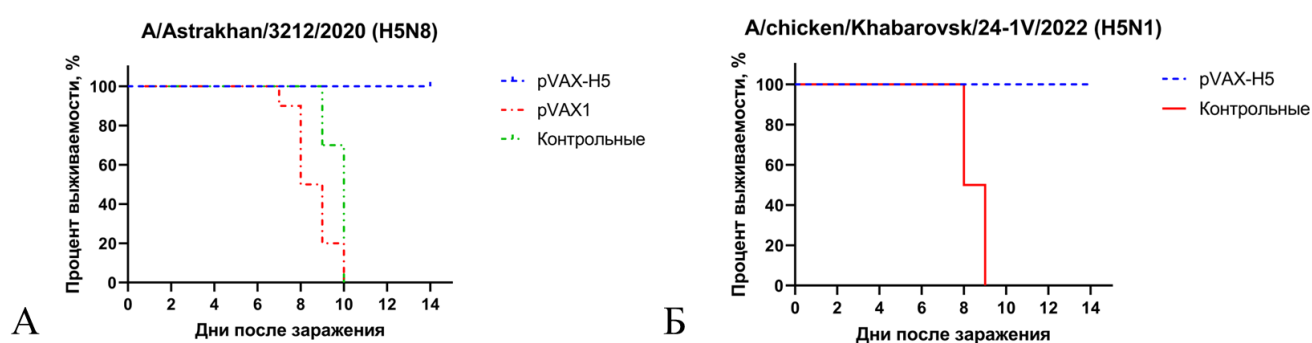


Рисунок 3.12 – Анализ протективных свойств ДНК-вакцины pVAX-H5 на гомологичном и гетерологичном штамме вируса гриппа. pVAX-H5 – группа животных, иммунизированных 100 мкг ДНК-вакцины pVAX-H5 с помощью СИ; pVAX1 – группа животных, иммунизированных исходным вектором pVAX1; Контрольные – группа животных, не подвергавшихся иммунизациям. А – Кривые выживаемости

иммунизированных животных после заражения вирусом гриппа штамма A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8). Б – Кривые выживаемости иммунизированных животных после заражения вирусом гриппа штамма A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1).

Таким образом, было показано, что ДНК-вакцина pVAX-H5 индуцирует у мышей линии BALB/c формирование высоких уровней гуморального и клеточного иммунных ответов и обеспечивает протективный иммунитет в отношении штаммов A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1).

3.5 Получение мРНК-вакцины mRNA-H5

Следующий раздел работы посвящен разработке прототипа мРНК-вакцины для профилактики заболевания, вызываемого вирусом гриппа А (H5). В качестве иммуногена была использована та же структура белка НА и кодирующий его ген H5, что и в ДНК-вакцине pVAX-H5.

Для создания мРНК-вакцины необходимо получить ДНК-матрицу, кодирующую ген целевого антигена, с которой будет транскрибироваться мРНК *in vitro*. В отличие от ДНК, мРНК достаточно попасть в цитозоль, где она будет транслироваться в антиген *in vivo* с помощью клеточных механизмов. Таким образом, можно создать любую желаемую последовательность, произвести ее *in vitro* и доставить в клетки любого типа (Kis Z. *et al.*, 2020; Rosa S. S. *et al.*, 2021).

Одним из важнейших преимуществ мРНК по сравнению с традиционными вакцинами является относительная простота ее производства. Для получения продукта на основе мРНК с заданными характеристиками качества необходимо выполнить ряд производственных этапов (рисунок 3.13). В настоящее время не существует устоявшейся производственной платформы и возможны различные комбинации этапов (Maruggi G. *et al.*, 2019). Основными этапами являются получение плазмидной ДНК-матрицы для синтеза мРНК, *in vitro* синтез мРНК, совмещенный с кэпированием или полиаденилированием в одной или двух последовательных реакциях, очистка полученной мРНК от примесей ДНК и других компонентов и последующий выбор метода доставки и хранения мРНК (Sharabrin S. V. *et al.*, 2026).

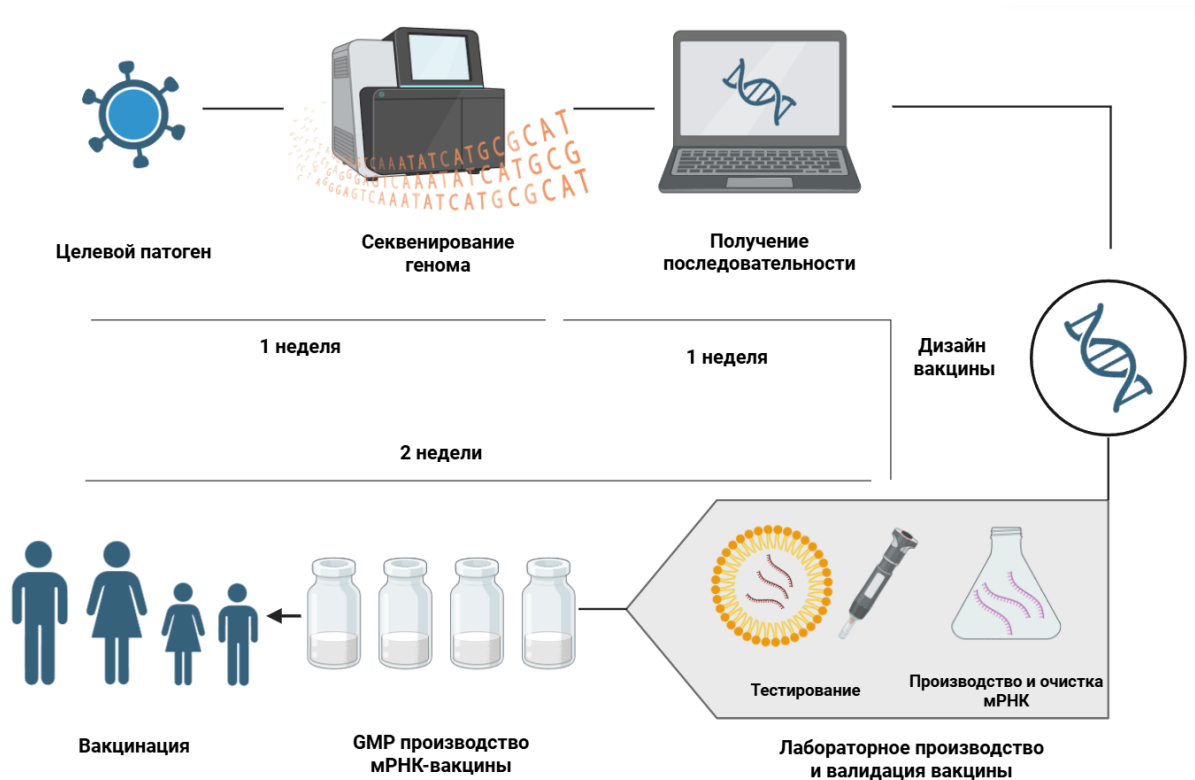


Рисунок 3.13 – Схема процесса создания мРНК-вакцины (Maruggi G. *et al.*, 2019).

Для получения ДНК-матрицы спроектированный ген Н5 был клонирован в составе экспрессионной кассеты pVAX-Cas1, содержащей нетранслируемые области α -глобина человека, модифицированный T7-промотор (5'-TAATACGACTCACTATAG-3'), необходимый для котранскрипционного присоединения аналога кэпа (Yamada K. *et al.*, 2025), область, необходимую для котранскрипционного присоединения поли(А)-хвоста длиной 100 нуклеотидов, и сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции EcoRI для линейаризации ДНК-матрицы. Схема структуры мРНК-вакцины mRNA-H5, получаемой с данной ДНК-матрицы, приведена на рисунке 3.14.



Рисунок 3.14 – Схематическое изображение структуры мРНК-вакцины mRNA-H5.

В ходе клонирования была проведена ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды pVAX-H5 и специфических праймеров C1M-H5N8-F и R-H5-Cas (таблица 2.1). Продукты амплификации были проанализированы с помощью электрофореза с

последующим выделением продукта амплификации длиной ~1750 п. о. из геля (рисунок 3.15А). Далее плазида pVAX-Cas1+GFP, несущая необходимые нетранслируемые области, и продукты амплификации гена H5 были обработаны эндонуклеазами рестрикции Psp124BI и BamHI, при этом при обработке плазмиды pVAX-Cas1+GFP были получены два продукта размером ~3000 п. о. (целевой вектор pVAX-Cas1) и ~750 п. о. (фрагмент GFP), а при обработке ПЦР-продукта H5 – целевой продукт размером ~1750 п. о. (вставка H5). Продукты были проанализированы с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим выделением целевых продуктов из геля (рисунок 3.15Б). После проводили лигирование полученных фрагментов и трансформацию полученной лигазной смесью клеток *E. coli*. Далее проводили отбор клонов путем анализа электрофоретической подвижности плазмидной ДНК, выделенной из бактериальной культуры 7 клонов (рисунок 3.15В). Исходя из разницы в электрофоретической подвижности были выбраны клоны, структуры которых были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. По итогам секвенирования наличие вставки было подтверждено в клоне 5.

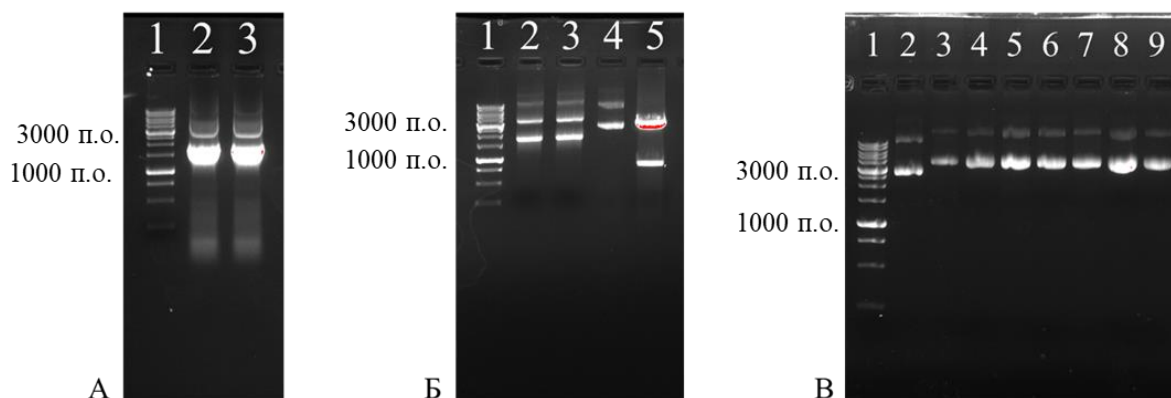


Рисунок 3.15 – Электрофореграммы, полученные к ходе клонирования гена H5 в составе кассеты pVAX-Cas1. А – Электрофореграмма разделения продуктов амплификации гена H5. 1 – маркер молекулярной массы M12, 2, 3 – ПЦР-продукт H5. Б – Электрофореграмма разделения продуктов гидролиза эндонуклеазами рестрикции. 1 – маркер молекулярной массы M12, 2, 3 – ПЦР-продукт H5, обработанный эндонуклеазами рестрикции Psp124BI и BamHI, 4 – плазида pVAX-Cas1+GFP, 5 – плазида pVAX-Cas1+GFP, обработанная эндонуклеазами рестрикции Psp124BI и BamHI. В – Электрофореграмма разделения продуктов выделения ДНК из клонов. 1 – маркер молекулярной массы M12, 2 – плазида pVAX-Cas1+GFP, 3-9 – клоны 1-7.

В результате была получена ДНК-матрица для синтеза мРНК, названная pVAX-Cas1CC-H5 (рисунок 3.16).

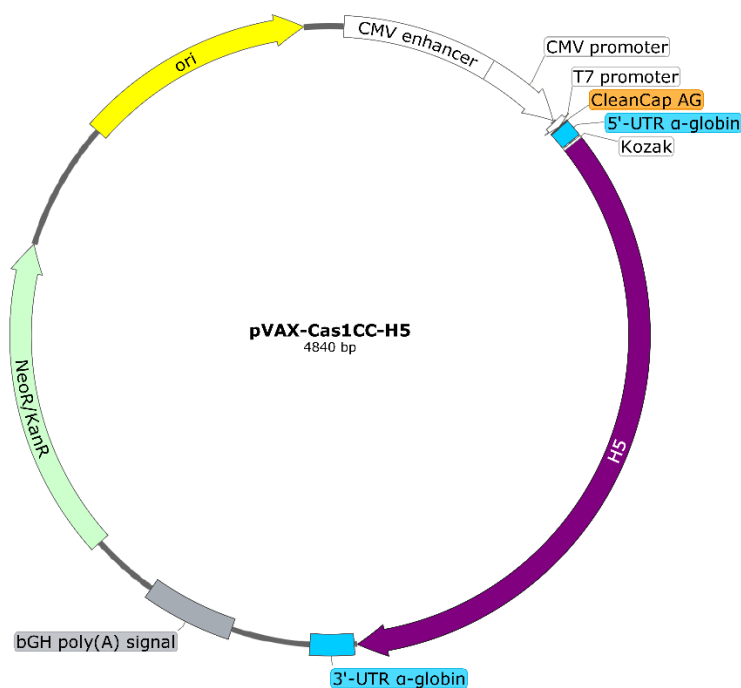


Рисунок 3.16 – Карта плазмиды pVAX-Cas1CC-H5.

Перед синтезом мРНК ДНК-матрица была линейаризована с использованием эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*, продукты рестрикции были проанализированы с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим выделением целевого продукта размером ~4850 п. о. из геля (рисунок 3.17А). С линейаризованной ДНК-матрицы был проведен синтез целевой мРНК-вакцины mRNA-H5 с котранскрипционным экпированием и полиаденилированием и с использованием смеси нуклеотидов с N1-метилпсевдоуридином; продукты синтеза были проверены с помощью электрофореза (рисунок 3.17Б). Показано, что размер полученной мРНК mRNA-H5 соответствует теоретическому расчету (~1900 о.), а также показана целостность продукта синтеза.

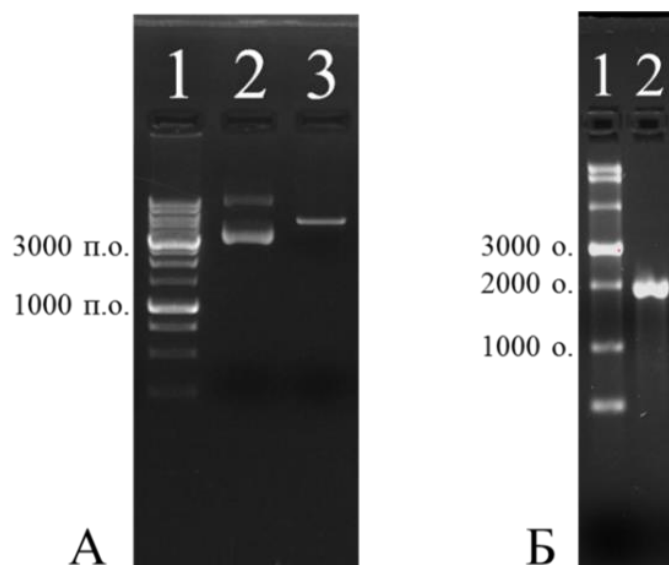


Рисунок 3.17 – Получение мРНК-вакцины mRNA-H5. А – Электрофореграмма разделения продуктов обработки ДНК-матрицы pVAX-Cas1CC-H5 эндонуклеазой рестрикции. 1 – маркер молекулярной массы M12, 2 – плазмидная ДНК-матрица pVAX-Cas1CC-H5, 3 – плазмидная ДНК-матрица pVAX-Cas1CC-H5, обработанная эндонуклеазой рестрикции EcoRI. Б – Электрофореграмма разделения продуктов синтеза мРНК-вакцины mRNA-H5. 1 – маркер молекулярной массы ssRNA Ladder, 2 – мРНК mRNA-H5.

3.6 Получение мРНК mRNA-H5, инкапсулированной в LNP

Для эффективного действия мРНК-вакцины необходимо, чтобы мРНК попадала в клетки-мишени и продуцировала достаточное количество белка. Поэтому разработка эффективных систем доставки является необходимой и крайне важной задачей (Zong Y. *et al.*, 2023). LNP являются самой распространенной системой доставки мРНК, обеспечивающей эффективное проникновение мРНК в клетки (Bae S. H. *et al.*, 2025).

Полученную мРНК mRNA-H5 инкапсулировали в LNP для дальнейшей иммунизации мышей. Аналогичным образом были получены LNP без мРНК в качестве контроля. Полученные комплексы были охарактеризованы методами электронной микроскопии и гидродинамического светорассеяния (рисунок 3.18).

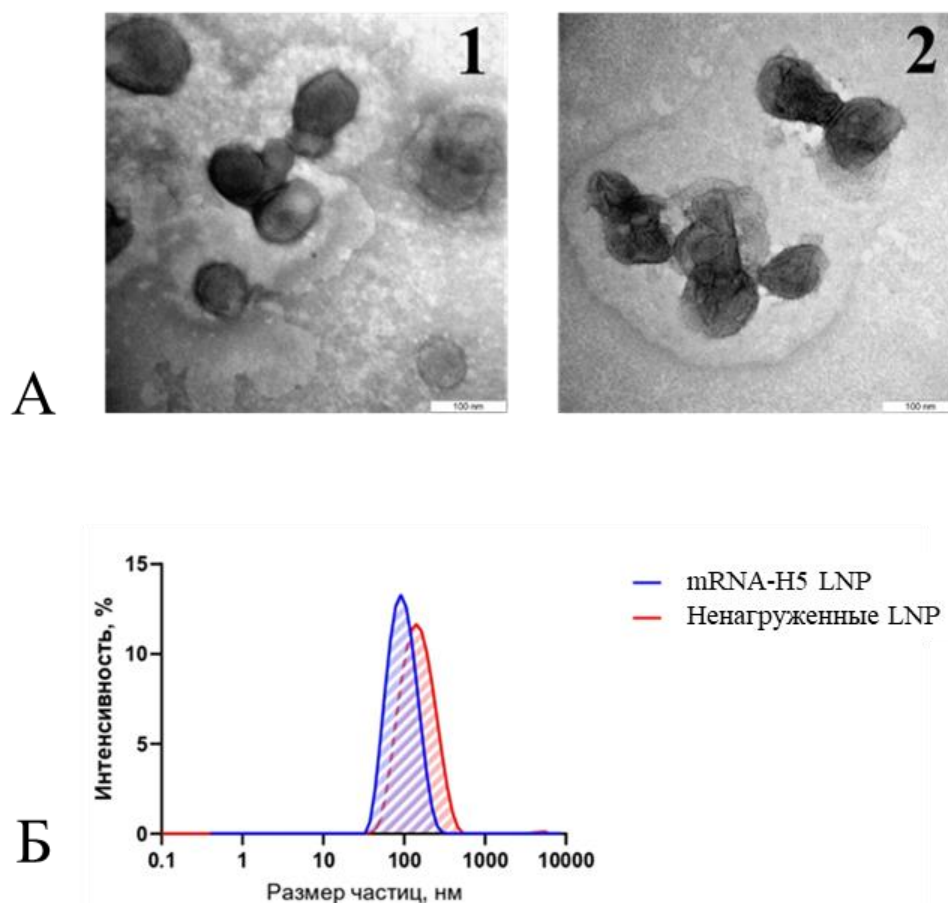


Рисунок 3.18 – Получение и характеристика комплексов mRNA-H5 LNP. А – Электронная микрофотография комплексов: 1 – mRNA-H5 LNP; 2 – ненагруженные LNP. Б – Динамическое рассеяние света: профили распределения по размерам наночастиц, полученных с мРНК или без нее.

Полученные комплексы были охарактеризованы с помощью динамического рассеяния света и измерения ζ -потенциала. Анализ с помощью метода динамического рассеяния света (таблица 3.2) показал, что как в случае комплекса mRNA-H5 LNP, так и в случае ненагруженных LNP была сформирована монодисперсная суспензия наночастиц ($PdI = 0,149 \pm 0,01$ и $0,175 \pm 0,01$ соответственно). Средний гидродинамический диаметр mRNA-H5 LNP составил $93,5 \pm 0,8$ нм, для ненагруженных LNP же этот параметр был выше – $131,6 \pm 1,6$ нм, что может быть следствием того, что в отсутствие мРНК наночастица спонтанно самособирается случайным образом, что может приводить к увеличению средних размеров. Профиль распределения частиц (рисунок 3.18Б) показывает, что наблюдается один пик, указывающий на отсутствие фракций с другими размерами частиц или примесей.

Таблица 3.2 – Физические характеристики полученных LNP

Препарат	Средний размер частицы, нм	PdI	ζ -потенциал, мВ
mRNA-H5 LNP	93,5±0,8	0,149 ± 0,01	-0,02±0,26
Ненагруженные LNP	131,6±1,6	0,175 ± 0,01	1,15±0,26

Значение ζ -потенциала частиц mRNA-H5 LNP в трёх разных сериях измерений составило $-0,02 \pm 0,26$ мВ, что согласуется с теоретическим расчетом. Наличие слабого заряда может указывать на то, что отрицательно заряженные молекулы мРНК были почти полностью упакованы в LNP. Это также было подтверждено анализом Quant-iT RiboGreen RNA, в котором было показано, что эффективность инкапсуляции составила более 90 %. Для подтверждения образования наночастиц была проведена электронная микроскопия (рисунок 3.18А).

3.7 Анализ иммуногенных и протективных свойств мРНК-вакцины mRNA-H5

Несмотря на высокую эффективность доставки с помощью LNP, их использование может вызывать нежелательные побочные эффекты, такие как аллергические реакции, патологии почек, перикардит, миокардит и другие (Fang E. *et al.*, 2022; Kisakova L. A. *et al.*, 2026). Поэтому разработка усовершенствованных, но при этом простых и безопасных методов доставки является актуальной задачей (Abbasi S. *et al.*, 2023; Kisakov D. N. *et al.*, 2025). В данной работе была исследована эффективность мРНК-вакцины mRNA-H5 при доставке с помощью такого физического метода, как СИ, и проведено сравнение с ее эффективностью при доставке в составе LNP.

Было проведено исследование иммуногенных и протективных свойств мРНК-вакцины mRNA-H5 на мышах линии BALB/c. Мыши были дважды проиммунизированы мРНК-вакциной mRNA-H5 в дозе 30 мкг с помощью СИ и мРНК-вакциной mRNA-H5 в дозе 10 мкг в составе LNP. В качестве положительного контроля также вводили рекомбинантный белок HA/H5. Была проведена двухкратная иммунизация мышей, после чего наличие специфических к HA антител в сыворотках крови исследовали с помощью ИФА. Титры специфических антител были выявлены в группах животных, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5 с помощью СИ и в составе LNP, а также

в группе животных, иммунизированных рекомбинантным белком HA/H5; средние титры составили 1:400000, 1:765000 и 1:93000 соответственно (рисунок 3.19А).

Сыворотки крови иммунизированных мышей далее исследовали в реакции вируснейтрализации в культуре клеток MDCK-SIAT1 в отношении вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Было показано, что сыворотки животных, иммунизированных мРНК-вакциной 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 1:1900, 1:3400 и 1:1100 соответственно (рисунок 3.19Б).

Формирование Т-клеточного иммунитета у мышей было исследовано с помощью метода ELISpot. Для этого у иммунизированных мышей извлекали селезёнки, которые были гомогенизированы и исследованы с помощью метода ELISpot. Ответ оценивали по их способности выделять IFN- γ в ответ на стимуляцию пептидами, входящими в состав гемагглютенина. Было показано, что в группах мышей, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5 и рекомбинантным белком HA/H5, активируется специфический клеточный иммунитет, выраженный в значительном повышении количества спленоцитов, продуцирующих IFN- γ (рисунок 3.19В).

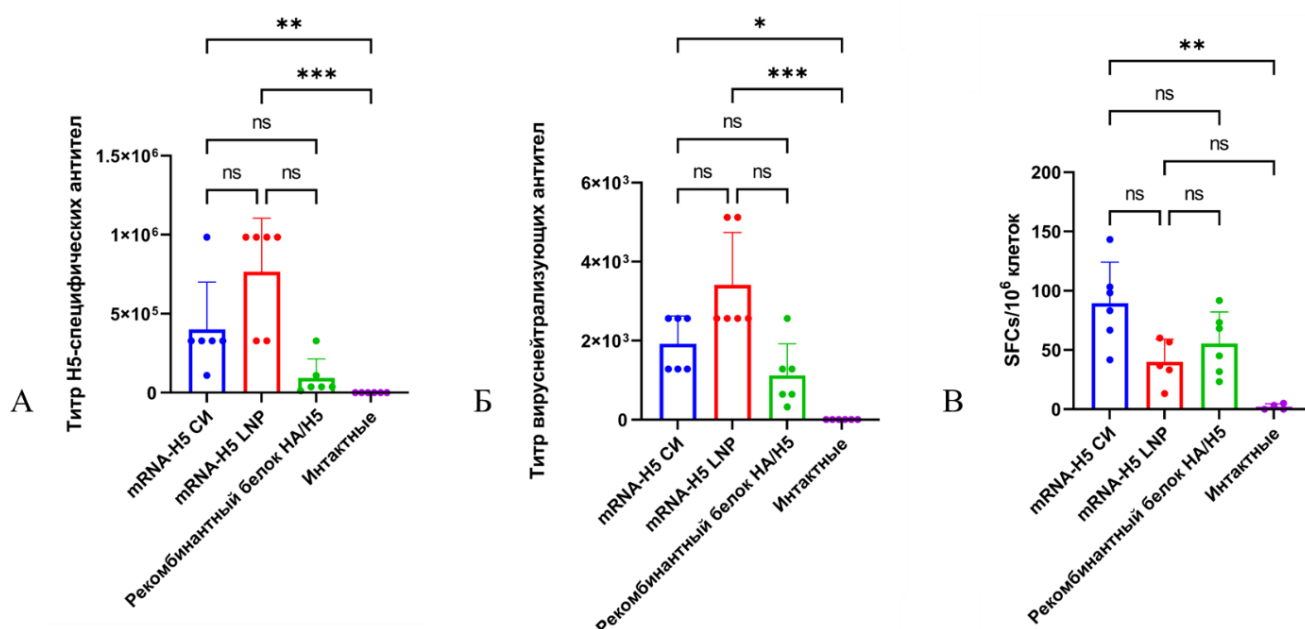


Рисунок 3.19 – Анализ иммуногенности мРНК-вакцины mRNA-H5 на мышах линии BALB/c. mRNA-H5 СИ – группа животных, иммунизированных 30 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 с помощью СИ; mRNA-H5 LNP – группа животных, иммунизированных 10 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 в составе LNP; Рекombинантный

белок HA/H5 – группа животных, иммунизированных рекомбинантным белком HA/H5; Интактные – группа животных, не подвергавшихся каким-либо манипуляциям. А – Результаты ИФА сывороток мышей, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5. Б – Вируснейтрализующая активность иммунных сывороток мышей в отношении вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). В – Количество спленоцитов, экспрессирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов, определённое методом ELISpot. Каждый столбик представляет собой среднее число SFCs на миллион стимулированных спленоцитов. Данные представлены как среднее $\pm$ с. о. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности активации вирус-специфического гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5 в случае доставки методом СИ или в комплексе с LNP. При этом статистических различий между доставкой mRNA-H5 методом СИ и в комплексе с LNP показано не было, но наблюдалась тенденция к более высокому уровню гуморального ответа в случае LNP, а также к более высокому уровню клеточного ответа в случае СИ.

Через 14 дней после второй иммунизации мыши были заражены интраназально 20 ЛД₅₀ штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1) для анализа протективных свойств мРНК-вакцины mRNA-H5. В течение 14 дней после заражения регистрировали физиологические реакции и смертность животных. По результатам эксперимента выживаемость всех животных, иммунизированных мРНК-вакциной mRNA-H5, составила 100 %, клинические признаки заболевания отсутствовали. Выживаемость в группе контрольных животных составила 0 %, наблюдались явные признаки заболевания (рисунок 3.20). Таким образом, были показаны протективные свойства мРНК-вакцины mRNA-H5 в отношении штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

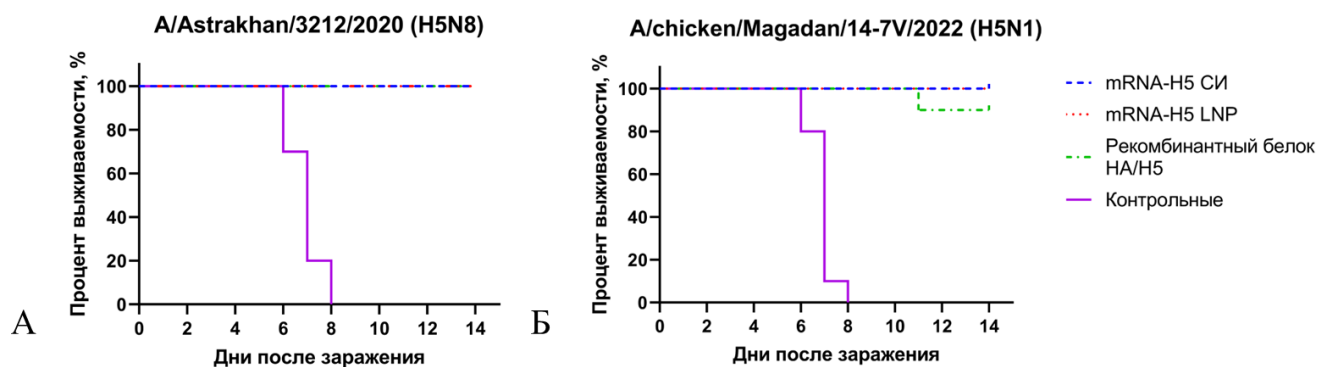


Рисунок 3.20 – Анализ протективных свойств мРНК-вакцины mRNA-H5 на мышях линии BALB/c. mRNA-H5 СИ – группа животных, иммунизированных 30 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 с помощью СИ; mRNA-H5 LNP – группа животных, иммунизированных 10 мкг мРНК-вакцины mRNA-H5 в составе LNP; Рекombинантный белок HA/H5 – группа животных, иммунизированных рекомбинантным белком HA/H5; Контрольные – группа животных, не подвергавшихся иммунизациям. А – Кривые выживаемости иммунизированных животных после заражения вирусом гриппа штамма A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8). Б – Кривые выживаемости иммунизированных животных после заражения вирусом гриппа штамма A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

Таким образом, было показано, что мРНК-вакцина mRNA-H5 индуцирует формирование высоких уровней гуморального и клеточного иммунных ответов и обеспечивает протективный иммунитет у мышей линии BALB/c при доставке методом СИ или в комплексе с LNP.

3.8 Заключение

Вирус высокопатогенного гриппа А (H5) представляет собой серьезную угрозу из-за пандемического потенциала, а также наносит серьезный экономический ущерб птицеводческой отрасли. Для эффективной борьбы с заболеванием необходима разработка гибких вакцинных платформ, к которым относятся вакцины на основе нуклеиновых кислот. Они обладают рядом преимуществ, к которым относятся масштабируемое производство с возможностью замены целевого гена, высокая безопасность и эффективная активация иммунного ответа. Эти особенности делают их удобной платформой для борьбы с заболеванием, вызываемым высокопатогенным вирусом гриппа А (H5).

В данном исследовании были разработаны экспериментальные ДНК- и мРНК-вакцины против заболевания, вызываемого высокопатогенным вирусом гриппа А (H5). В качестве иммуногена был выбран ген, кодирующий НА вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), циркулировавший в России в Ставропольском крае в 2020 году среди сельскохозяйственной птицы и гомологичный по гемагглютинирующему домену штамму A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8), рекомендованному ВОЗ в качестве вакцинного. Для стабилизации иммуногена и его корректного представления иммунной системе были внесены точечные замены в pH-чувствительных областях НА, удалены трансмембранный и цитоплазматический домены для получения секретируемого белка, а также полиосновный сайт протеолиза высокопатогенного вируса гриппа был заменен на моноосновный сайт. Были сконструированы варианты иммуногенов с добавлением тримеризующего домена фибритина бактериофага T4 (последовательность H5) и без него (последовательность H5 delT4), а также последовательность на основе стеблевого домена НА (последовательность H5 stebl).

Получены экспериментальные ДНК-вакцины pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4, для pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4 продемонстрирован синтез целевых РНК и белков в эукариотических клетках HEK293. На мышах линии BALB/c показано формирование вирус-специфического гуморального ответа для pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4, а также показано, что наиболее высокие титры антител индуцирует конструкция pVAX-H5. С помощью анализа дозозависимого эффекта была выбрана доза 100 мкг pVAX-H5, при которой наблюдалась эффективная индукция вируснейтрализующего гуморального ответа. ДНК-вакцина pVAX-H5 в дозе 100 мкг также вызывала формирование Т-клеточного иммунного ответа.

Была показана вируснейтрализующая активность иммунных сывороток мышей, иммунизированных pVAX-H5, в отношении штаммов вируса гриппа клады 2.3.4.4b A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8), A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1), A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) и A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1). Протективные свойства pVAX-H5 были исследованы в отношении штаммов A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1). В обоих случаях выживаемость иммунизированных животных составила 100 %. Показанные протективные свойства вакцины, вероятно, были достигнуты благодаря эффективному формированию не только гуморального, но и Т-клеточного иммунного ответа, что, в свою

очередь, было обеспечено стабилизацией целевого иммуногена и его правильным представлением иммунной системе в формате ДНК-вакцины.

На основе последовательности H5 была получена ДНК-матрица pVAX-Cas1CC-H5 для синтеза мРНК, включающая нетранслируемые области α -глобина человека; модифицированный Т7-промотор, необходимый для котранскрипционного присоединения аналога кэпа; область, необходимую для котранскрипционного присоединения поли(А)-хвоста длиной 100 нуклеотидов; и сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции EcoRI для линейаризации ДНК-матрицы. С линейаризованной ДНК-матрицы был проведен синтез целевой мРНК-вакцины mRNA-H5 с включением N1-метилпсевдоуридина. Для иммунизации mRNA-H5 инкапсулировали в LNP, а также применяли в «голом» виде в случае доставки методом СИ.

На мышах линии BALB/c показана высокая эффективность активации вирус-специфического гуморального и клеточного иммунного ответа в случае доставки mRNA-H5 методом СИ или в комплексе с LNP, при этом в случае LNP наблюдалась тенденция к более высокому уровню гуморального ответа, а в случае СИ – к более высокому уровню клеточного ответа. Были показаны протективные свойства mRNA-H5 в отношении штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1), при этом выживаемость составила 100 %.

Полученные ДНК-вакцина pVAX-H5 и мРНК-вакцина mRNA-H5 являются перспективными вакцинными кандидатами для доклинических исследований и для дальнейшего использования в качестве препарата для профилактики заболевания, вызываемого высокопатогенным вирусом гриппа А (H5).

ВЫВОДЫ

1. На основе модифицированного гемагглютиниона вируса гриппа штамма A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) проведен дизайн трех иммуногенов H5, H5 stebl и H5 delT4 со стабилизирующими мутациями; получены экспериментальные ДНК-вакцины pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4.
2. Показано формирование вирус-специфического гуморального иммунного ответа для экспериментальных ДНК-вакцин pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4, введенных методом струйной инъекции мышам линии BALB/c; установлено, что наиболее высокие титры специфических к гемагглютиниону антител индуцирует pVAX-H5.
3. Установлено, что доза 100 мкг pVAX-H5 обеспечивает эффективную индукцию вируснейтрализующего гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у мышей линии BALB/c; показана вируснейтрализующая активность иммунных сывороток в отношении штаммов вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8), A/chicken/Komi/24-4V/2023 (H5N1), A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1) и A/chicken/Voronezh/193-1V/2024 (H5N1); продемонстрирована 100 % выживаемость иммунизированных мышей при заражении 50 ЛД₅₀ штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Khabarovsk/24-1V/2022 (H5N1).
4. Получена экспериментальная мРНК-вакцина mRNA-H5 с использованием разработанной ДНК-матрицы pVAX-Cas1CC-H5, кодирующей иммуноген H5; проведена инкапсуляция mRNA-H5 в липидные наночастицы со средним гидродинамическим диаметром частиц $93,5 \pm 0,8$ нм и эффективностью инкапсуляции >90 %.
5. Показано формирование специфического гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на мРНК-вакцину mRNA-H5, введенную мышам линии BALB/c как с помощью струйной инъекции, так и в составе липидных наночастиц; показана вируснейтрализующая активность сывороток иммунизированных мышей в отношении штамма вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8); продемонстрирована 100 % выживаемость иммунизированных мышей при заражении 20 ЛД₅₀ штаммов вируса гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abbasi S. et al. Jet injection potentiates naked mRNA SARS-CoV-2 vaccine in mice and non-human primates by adding physical stress to the skin //bioRxiv. – 2023. – C. 2023.02. 27.530188.
2. Anurogo D. et al. Codon optimized influenza H1 HA sequence but not CTLA-4 targeting of HA antigen to enhance the efficacy of DNA vaccines in an animal model //Journal of immunotoxicology. – 2024. – Т. 21. – №. 1. – C. 2400624.
3. Azzoni A. R. et al. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression //The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications. – 2007. – Т. 9. – №. 5. – C. 392-402.
4. Bae S. H. et al. Rational design of lipid nanoparticles for enhanced mRNA vaccine delivery via machine learning //Small. – 2025. – Т. 21. – №. 8. – C. 2405618.
5. Baghban R., Ghasemian A., Mahmoodi S. Nucleic acid-based vaccine platforms against the coronavirus disease 19 (COVID-19) //Archives of Microbiology. – 2023. – Т. 205. – №. 4. – C. 150.
6. Bazhan S. et al. Immunogenicity and protective efficacy of influenza a DNA vaccines encoding artificial antigens based on conservative hemagglutinin stem region and M2 protein in mice //Vaccines. – 2020. – Т. 8. – №. 3. – C. 448.
7. Berger S. et al. New insights for the development of efficient DNA vaccines //Microbial Biotechnology. – 2024. – Т. 17. – №. 11. – C. e70053.
8. Broecker F. et al. A mosaic hemagglutinin-based influenza virus vaccine candidate protects mice from challenge with divergent H3N2 strains //npj Vaccines. – 2019. – Т. 4. – №. 1. – C. 31.
9. Bullard B. L., Weaver E. A. Strategies targeting hemagglutinin as a universal influenza vaccine //Vaccines. – 2021. – Т. 9. – №. 3. – C. 257.
10. Cagigi A., Douradinha B. Have mRNA vaccines sentenced DNA vaccines to death? //Expert Review of Vaccines. – 2023. – Т. 22. – №. 1. – C. 1154-1167.
11. Calle-Hernández D. M., Hoyos-Salazar V., Bonilla-Aldana D. K. Prevalence of the H5N8 influenza virus in birds: Systematic review with meta-analysis //Travel medicine and infectious disease. – 2023. – Т. 51. – C. 102490.

12. Charostad J. et al. A comprehensive review of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1: An imminent threat at doorstep //Travel medicine and infectious disease. – 2023. – T. 55. – C. 102638.
13. Chauhan R. P., Gordon M. L. An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates //Virus genes. – 2022. – T. 58. – №. 4. – C. 255-269.
14. Chen H. et al. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – T. 103. – №. 8. – C. 2845-2850.
15. Chen Y. et al. Structural basis for a human broadly neutralizing influenza A hemagglutinin stem-specific antibody including H17/18 subtypes //Nature Communications. – 2022. – T. 13. – №. 1. – C. 7603.
16. Chen Z. et al. Minimized antibiotic-free plasmid vector for gene therapy utilizing a new toxin-antitoxin system //Metabolic engineering. – 2023. – T. 79. – C. 86-96.
17. Cheng F. et al. Research advances on the stability of mRNA vaccines //Viruses. – 2023. – T. 15. – №. 3. – C. 668.
18. Cheng M. A. et al. Therapeutic DNA vaccines for human papillomavirus and associated diseases //Human gene therapy. – 2018. – T. 29. – №. 9. – C. 971-996.
19. Chowdhury T. et al. NeuralCodOpt: Codon optimization for the development of DNA vaccines //Computational Biology and Chemistry. – 2025. – T. 116. – C. 108377.
20. Cross K. J. et al. Composition and functions of the influenza fusion peptide //Protein and peptide letters. – 2009. – T. 16. – №. 7. – C. 766-778.
21. Corbett K. S. et al. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates //New England Journal of Medicine. – 2020. – T. 383. – №. 16. – C. 1544-1555.
22. Couty M. et al. The role of wild birds in the global highly pathogenic avian influenza H5 panzootic, 2020–2023 //npj Biodiversity. – 2026. – T. 5. – №. 1. – C. 1.
23. Cui X. et al. Immunogenicity and biodistribution of lipid nanoparticle formulated self-amplifying mRNA vaccines against H5 avian influenza //npj Vaccines. – 2024. – T. 9. – №. 1. – C. 138.

24. Das D. K. et al. Direct visualization of the conformational dynamics of single influenza hemagglutinin trimers //Cell. – 2018. – T. 174. – №. 4. – C. 926-937. e12.
25. de Bruin A. C. M. et al. Hemagglutinin subtype specificity and mechanisms of highly pathogenic avian influenza virus genesis //Viruses. – 2022. – T. 14. – №. 7. – C. 1566.
26. De Jong N. M. C. et al. Development of broadly reactive influenza vaccines by targeting the conserved regions of the hemagglutinin stem and head domains //Expert Review of Vaccines. – 2020. – T. 19. – №. 6. – C. 563-577.
27. Deviatkin A. A. et al. Universal flu mRNA vaccine: promises, prospects, and problems //Vaccines. – 2022. – T. 10. – №. 5. – C. 709.
28. Dey A. et al. Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models //Vaccine. – 2021. – T. 39. – №. 30. – C. 4108-4116.
29. Deng Z. et al. mRNA vaccines: the dawn of a new era of cancer immunotherapy //Frontiers in immunology. – 2022. – T. 13. – C. 887125.
30. Dosey A. et al. Stabilization of H5 highly pathogenic avian influenza hemagglutinin improves vaccine-elicited neutralizing antibody responses //bioRxiv. – 2025.
31. Ebel H., Benecke T., Vollmer B. Stabilisation of viral membrane fusion proteins in prefusion conformation by structure-based design for structure determination and vaccine development //Viruses. – 2022. – T. 14. – №. 8. – C. 1816.
32. Esaki M. et al. Surveillance of avian influenza viruses in the Izumi plain reveals the role of wild ducks in the introduction of H5N1 HPAIVs during the 2023/24 winter season //Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 2025. – C. 102389.
33. Fang E. et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development //Signal transduction and targeted therapy. – 2022. – T. 7. – №. 1. – C. 94.
34. Ferraro B. et al. Clinical applications of DNA vaccines: current progress //Clinical infectious diseases. – 2011. – T. 53. – №. 3. – C. 296-302.
35. Franck C. O. et al. Biopolymer-based carriers for DNA vaccine design //Angewandte Chemie International Edition. – 2021. – T. 60. – №. 24. – C. 13225-13243.

36. Fu H. et al. Codon optimization with deep learning to enhance protein expression //Scientific reports. – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 17617.
37. Fukuyama H., Shinnakasu R., Kurosaki T. Influenza vaccination strategies targeting the hemagglutinin stem region //Immunological reviews. – 2020. – T. 296. – №. 1. – C. 132-141.
38. Furey C. et al. Development of a nucleoside-modified mRNA vaccine against clade 2.3. 4.4 b H5 highly pathogenic avian influenza virus //Nature Communications. – 2024. – T. 15. – №. 1. – C. 4350.
39. Fusade-Boyer M. et al. Investigation and impact of mammalian adaptation markers on H5N8 high pathogenicity avian influenza polymerase activity //npj Viruses. – 2026. – T. 4. – №. 1. – C. 22.
40. Gamblin S. J. et al. Hemagglutinin structure and activities //Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. – 2021. – T. 11. – №. 10. – C. a038638.
41. Guimaraes G. J., Kim J., Bartlett M. G. Characterization of mRNA therapeutics //Mass Spectrometry Reviews. – 2024. – T. 43. – №. 5. – C. 1066-1090.
42. Giotis E. S. et al. Entry of the bat influenza H17N10 virus into mammalian cells is enabled by the MHC class II HLA-DR receptor //Nature microbiology. – 2019. – T. 4. – №. 12. – C. 2035-2038.
43. Godley L. et al. Introduction of intersubunit disulfide bonds in the membrane-distal region of the influenza hemagglutinin abolishes membrane fusion activity //Cell. – 1992. – T. 68. – №. 4. – C. 635-645.
44. Gómez-Aguado I. et al. Nanomedicines to deliver mRNA: state of the art and future perspectives //Nanomaterials. – 2020. – T. 10. – №. 2. – C. 364.
45. Grote A. et al. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host //Nucleic acids research. – 2005. – T. 33. – №. suppl_2. – C. W526-W531.
46. Corbett K. S. et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness //Nature. – 2020. – T. 586. – №. 7830. – C. 567-571.
47. Gopal A. B. et al. Characterization of two non-competing antibodies to influenza H3N2 hemagglutinin stem reveals its evolving antigenicity //Nature communications. – 2025. – T. 16. – №. 1. – C. 10557.

48. Graziosi G. et al. Highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5 clade 2.3. 4.4 b virus infection in birds and mammals // *Animals*. – 2024. – T. 14. – №. 9. – C. 1372.
49. Gu Y. et al. mRNA vaccines in the prevention and treatment of diseases // *MedComm*. – 2022. – T. 3. – №. 3. – C. e167.
50. Guo X. et al. Revolutionizing viral disease vaccination: the promising clinical advancements of non-replicating mRNA vaccines // *Virology Journal*. – 2023. – T. 20. – №. 1. – C. 64.
51. Han Y. G. et al. Hepatitis B Surface Antigen S Gene is an Effective Carrier Molecule for Developing Gn RH DNA Immunocastration Vaccine in Mice // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2016. – T. 51. – №. 3. – C. 445-450.
52. Henderson J. M. et al. Cap 1 messenger RNA synthesis with co-transcriptional cleancap® analog by in vitro transcription // *Current protocols*. – 2021. – T. 1. – №. 2. – C. e39.
53. Hobernik D., Bros M. DNA vaccines—how far from clinical use? // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – T. 19. – №. 11. – C. 3605.
54. Inagaki M. et al. Cap analogs with a hydrophobic photocleavable tag enable facile purification of fully capped mRNA with various cap structures // *Nature communications*. – 2023. – T. 14. – №. 1. – C. 2657.
55. Jackson N. A. C. et al. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective // *npj Vaccines*. – 2020. – T. 5. – №. 1. – C. 11.
56. Jin L. et al. mRNA vaccine sequence and structure design and optimization: advances and challenges // *Journal of Biological Chemistry*. – 2025. – T. 301. – №. 1. – C. 108015.
57. Jung H. E., Lee H. K. Host protective immune responses against influenza A virus infection // *Viruses*. – 2020. – T. 12. – №. 5. – C. 504.
58. Kaiko G. E. et al. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? // *Immunology*. – 2008. – T. 123. – №. 3. – C. 326-338.
59. Karakus U. et al. H19 influenza A virus exhibits species-specific MHC class II receptor usage // *Cell host & microbe*. – 2024. – T. 32. – №. 7. – C. 1089-1102. e10.

60. Karikó K. et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA //Immunity. – 2005. – T. 23. – №. 2. – C. 165-175.
61. Kenoosh H. A. et al. Recent advances in mRNA-based vaccine for cancer therapy; bench to bedside //Cell Biochemistry and Function. – 2024. – T. 42. – №. 2. – C. e3954.
62. Khobragade A. et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of the DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): the interim efficacy results of a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study in India //The Lancet. – 2022. – T. 399. – №. 10332. – C. 1313-1321.
63. Kim D. H. et al. Newcastle disease virus expressing clade 2.3. 4.4 b H5 hemagglutinin confers protection against lethal H5N1 highly pathogenic avian influenza in BALB/c mice //Frontiers in veterinary science. – 2025. – T. 12. – C. 1535274.
64. Kim S. J. et al. Enhanced immunogenicity of DNA fusion vaccine encoding secreted hepatitis B surface antigen and chemokine RANTES //Virology. – 2003. – T. 314. – №. 1. – C. 84-91.
65. Kim S. C. et al. Modifications of mRNA vaccine structural elements for improving mRNA stability and translation efficiency //Molecular & cellular toxicology. – 2022. – T. 18. – №. 1. – C. 1-8.
66. Kis Z. et al. Resources, production scales and time required for producing RNA vaccines for the global pandemic demand //Vaccines. – 2020. – T. 9. – №. 1. – C. 3.
67. Kisakov D. N. 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. – 2025. – T. 13. – №. 1. – C. 65.
68. Kisakova L. A., Ilyicheva S. A., Rudometov A. P. Possible Ways of Reducing Adverse Events Associated with mRNA Vaccines Encapsulated in Lipid Nanoparticles //Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2026. – C. 1-7.
69. Kozak M., Hu J. DNA vaccines: their formulations, engineering and delivery //Vaccines. – 2024. – T. 12. – №. 1. – C. 71.

70. Kuiken T. et al. Emergence, spread, and impact of high-pathogenicity avian influenza H5 in wild birds and mammals of South America and Antarctica // *Conservation Biology*. – 2026. – T. 40. – №. 1. – C. e70052.
71. Kutzler M. A., Weiner D. B. DNA vaccines: ready for prime time? // *Nature Reviews Genetics*. – 2008. – T. 9. – №. 10. – C. 776-788.
72. Kwon H. et al. Emergence of synthetic mRNA: in vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine // *Biomaterials*. – 2018. – T. 156. – C. 172-193.
73. Ledesma-Feliciano C. et al. Improved DNA vaccine delivery with needle-free injection systems // *Vaccines*. – 2023. – T. 11. – №. 2. – C. 280.
74. Leong K. Y., Tham S. K., Poh C. L. Revolutionizing immunization: a comprehensive review of mRNA vaccine technology and applications // *Virology Journal*. – 2025. – T. 22. – №. 1. – C. 71.
75. Li L., Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity // *Expert review of vaccines*. – 2016. – T. 15. – №. 3. – C. 313-329.
76. Li Y. et al. Protective efficacy of a universal influenza mRNA vaccine against the challenge of H1 and H5 influenza A viruses in mice // *Mlife*. – 2023. – T. 2. – №. 3. – C. 308-316.
77. Liaci A. M., Förster F. Take me home, protein roads: structural insights into signal peptide interactions during ER translocation // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – T. 22. – №. 21. – C. 11871.
78. Liang Y., Huang L., Liu T. Development and delivery systems of mRNA vaccines // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – T. 9. – C. 718753.
79. Linares-Fernández S. et al. Tailoring mRNA vaccine to balance innate/adaptive immune response // *Trends in molecular medicine*. – 2020. – T. 26. – №. 3. – C. 311-323.
80. Liu A., Wang X. The pivotal role of chemical modifications in mRNA therapeutics // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2022. – T. 10. – C. 901510.
81. Liu X. et al. A mosaic influenza virus-like particles vaccine provides broad humoral and cellular immune responses against influenza A viruses // *npj Vaccines*. – 2023. – T. 8. – №. 1. – C. 132.

82. Luczo J. M., Spackman E. Molecular evolution of the H5 and H7 highly pathogenic avian influenza virus haemagglutinin cleavage site motif //Reviews in Medical Virology. – 2025. – T. 35. – №. 1. – C. e70012.
83. Mair C. M. et al. Receptor binding and pH stability—How influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2014. – T. 1838. – №. 4. – C. 1153-1168.
84. Marchenko V. Y. et al. Characterization of H5N1 avian influenza virus isolated from bird in Russia with the E627K mutation in the PB2 protein //Scientific Reports. – 2024. – T. 14. – №. 1. – C. 26490.
85. Martínez-Puente D. H. et al. Plasmid DNA for therapeutic applications in cancer //Pharmaceutics. – 2022. – T. 14. – №. 9. – C. 1861.
86. Maruggi G. et al. mRNA as a transformative technology for vaccine development to control infectious diseases //Molecular therapy. – 2019. – T. 27. – №. 4. – C. 757-772.
87. McCarthy K. R. Some Exposure for Influenza Hemagglutinin Interface Antibodies //Immunological Reviews. – 2026. – T. 342. – №. 1. – C. e70167.
88. McCluskie M. J., Weeratna R. D., Davis H. L. The role of CpG in DNA vaccines //Springer seminars in immunopathology. – Berlin/Heidelberg : Springer-Verlag, 2000. – T. 22. – №. 1. – C. 125-132.
89. McMillan C. L. D. et al. Development of molecular clamp stabilized hemagglutinin vaccines for Influenza A viruses //npj Vaccines. – 2021. – T. 6. – №. 1. – C. 135.
90. Mignon C., Sodoyer R., Werle B. Antibiotic-free selection in biotherapeutics: now and forever //Pathogens. – 2015. – T. 4. – №. 2. – C. 157-181.
91. Milder F. J. et al. Universal stabilization of the influenza hemagglutinin by structure-based redesign of the pH switch regions //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2022. – T. 119. – №. 6. – C. e2115379119.
92. Mishra M. et al. Stabilized mosaic hemagglutinin immunogens as novel universal influenza virus vaccines //Molecular Therapy. – 2026.
93. Miyazaki H. et al. Mechanism of jet injector-induced plasmid DNA uptake: Contribution of shear stress and endocytosis //International Journal of Pharmaceutics. – 2021. – T. 609. – C. 121200.

94. Mochida Y., Uchida S. mRNA vaccine designs for optimal adjuvanticity and delivery //RNA biology. – 2024. – T. 21. – №. 1. – C. 422-448.
95. Mohamad Razif M. I. et al. Emergence of mRNA vaccines in the management of cancer //Expert Review of Vaccines. – 2023. – T. 22. – №. 1. – C. 629-642.
96. Mohammad I. et al. Deciphering HPAI Influenza A Virus (H5N1): Molecular Basis of Pathogenicity, Zoonotic Potential, and Advances in Vaccination Strategies //Viruses. – 2026. – T. 18. – №. 4. – C. 410.
97. Muslimov A. et al. The dual role of the innate immune system in the effectiveness of mRNA therapeutics //International journal of molecular sciences. – 2023. – T. 24. – №. 19. – C. 14820.
98. Neeli P. et al. DNA vaccines in the post-mRNA era: Engineering, applications, and emerging innovations //International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – T. 26. – №. 17. – C. 8716.
99. Oh A. et al. Loop structure in poly (A) tail of mRNA vaccine enhances antigen translation efficiency and mRNA stability //npj Vaccines. – 2025. – T. 10. – №. 1. – C. 234.
100. Okuda K., Wada Y., Shimada M. Recent developments in preclinical DNA vaccination //Vaccines. – 2014. – T. 2. – №. 1. – C. 89-106.
101. Ogino T., Green T. J. Transcriptional control and mRNA capping by the GDP polyribonucleotidyltransferase domain of the rabies virus large protein //Viruses. – 2019. – T. 11. – №. 6. – C. 504.
102. Pardi N. et al. mRNA vaccines – a new era in vaccinology //Nature reviews Drug discovery. – 2018. – T. 17. – №. 4. – C. 261-279.
103. Paremskaia A. I. et al. Codon-optimization in gene therapy: promises, prospects and challenges //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2024. – T. 12. – C. 1371596.
104. Park J. W. et al. mRNA vaccines for COVID-19: what, why and how //International journal of biological sciences. – 2021. – T. 17. – №. 6. – C. 1446.
105. Passmore L. A., Collier J. Roles of mRNA poly (A) tails in regulation of eukaryotic gene expression //Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2022. – T. 23. – №. 2. – C. 93-106.

106. Peacock T. P. et al. The global H5N1 influenza panzootic in mammals //Nature. – 2025. – T. 637. – №. 8045. – C. 304-313.
107. Pennacchio L. A. et al. Enhancers: five essential questions //Nature Reviews Genetics. – 2013. – T. 14. – №. 4. – C. 288-295.
108. Peng P. et al. Novel H16N3 avian influenza viruses isolated from migratory gulls in China in 2023 //Frontiers in Microbiology. – 2025. – T. 15. – C. 1543338.
109. Polack F. P. et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine //New England journal of medicine. – 2020. – T. 383. – №. 27. – C. 2603-2615.
110. Pyankova O. G. et al. Isolation of clade 2.3. 4.4 b A (H5N8), a highly pathogenic avian influenza virus, from a worker during an outbreak on a poultry farm, Russia, December 2020 //Eurosurveillance. – 2021. – T. 26. – №. 24. – C. 2100439.
111. Rafique S. et al. Global review of the H5N8 avian influenza virus subtype //Frontiers in microbiology. – 2023. – T. 14. – C. 1200681.
112. Raghuwanshi D. et al. Dendritic cell targeted chitosan nanoparticles for nasal DNA immunization against SARS CoV nucleocapsid protein //Molecular pharmaceutics. – 2012. – T. 9. – №. 4. – C. 946-956.
113. Ramanathan A., Robb G. B., Chan S. H. mRNA capping: biological functions and applications //Nucleic acids research. – 2016. – T. 44. – №. 16. – C. 7511-7526.
114. Reguzova A. et al. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens //PloS one. – 2015. – T. 10. – №. 3. – C. e0116412.
115. Ren H. et al. Self-assembling nanoparticle hemagglutinin influenza vaccines induce high antibody response //International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – T. 25. – №. 13. – C. 7259.
116. Romagnani S. Th1/th2 cells //Inflammatory bowel diseases. – 1999. – T. 5. – №. 4. – C. 285-294.
117. Rosa S. S. et al. mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks //Vaccine. – 2021. – T. 39. – №. 16. – C. 2190-2200.
118. Rudometov A. P. et al. Dose-dependent effect of DNA vaccine pVAX-H5 encoding a modified hemagglutinin of influenza A (H5N8) and its cross-reactivity against A (H5N1) influenza viruses of clade 2.3. 4.4 b //Viruses. – 2025. – T. 17. – №. 3. – C. 330.

119. Samoylov A. et al. DNA vaccine targeting gonadotropin-releasing hormone receptor and its application in animal contraception //Molecular Biotechnology. – 2019. – T. 61. – №. 2. – C. 73-83.
120. Shafaati M. et al. A brief review on DNA vaccines in the era of COVID-19 //Future Virology. – 2022. – T. 17. – №. 1. – C. 49-66.
121. Schlake T. et al. Developing mRNA-vaccine technologies //RNA biology. – 2012. – T. 9. – №. 11. – C. 1319-1330.
122. Scott V. L. et al. Novel synthetic plasmid and Doggybone™ DNA vaccines induce neutralizing antibodies and provide protection from lethal influenza challenge in mice //Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2015. – T. 11. – №. 8. – C. 1972-1982.
123. Sharabrin S. V. et al. A Naked Lyophilized mRNA Vaccine Against Seasonal Influenza, Administered by Jet Injection, Provides a Robust Response in Immunized Mice //Vaccines. – 2026. – T. 14. – №. 1. – C. 56.
124. Shoja Doost J. et al. mrna vaccination: An outlook on innate sensing and adaptive immune responses //Viruses. – 2024. – T. 16. – №. 9. – C. 1404.
125. Stachyra A. et al. Codon optimization of antigen coding sequences improves the immune potential of DNA vaccines against avian influenza virus H5N1 in mice and chickens //Virology journal. – 2016. – T. 13. – №. 1. – C. 143.
126. Sun N., Su Z., Zheng X. Research progress of mosquito-borne virus mRNA vaccines //Molecular Therapy Methods & Clinical Development. – 2025. – T. 33. – №. 1.
127. Suschak J. J., Williams J. A., Schmaljohn C. S. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity //Human vaccines & immunotherapeutics. – 2017. – T. 13. – №. 12. – C. 2837-2848.
128. Toniolo A., Maccari G., Camussi G. mRNA technology and mucosal immunization //Vaccines. – 2024. – T. 12. – №. 6. – C. 670.
129. Uddin M. N., Roni M. A. Challenges of storage and stability of mRNA-based COVID-19 vaccines //Vaccines. – 2021. – T. 9. – №. 9. – C. 1033.
130. Ustyantsev I. G. et al. Canonical and noncanonical RNA polyadenylation //Molecular Biology. – 2017. – T. 51. – №. 2. – C. 226-236.

131. Vogel A. B. et al. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2 //Nature. – 2021. – T. 592. – №. 7853. – C. 283-289.
132. Walters A. A. et al. Comparative analysis of enzymatically produced novel linear DNA constructs with plasmids for use as DNA vaccines //Gene therapy. – 2014. – T. 21. – №. 7. – C. 645-652.
133. Wang 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 //Frontiers in Immunology. – 2025. – T. 16. – C. 1530736.
134. Wang C., Yuan F. A comprehensive comparison of DNA and RNA vaccines //Advanced drug delivery reviews. – 2024. – T. 210. – C. 115340.
135. Wang S. et al. Dynamic regulation and functions of mRNA m6A modification //Cancer cell international. – 2022. – T. 22. – №. 1. – C. 48.
136. Wang W. et al. Intermonomer interactions in hemagglutinin subunits HA1 and HA2 affecting hemagglutinin stability and influenza virus infectivity //Journal of Virology. – 2015. – T. 89. – №. 20. – C. 10602-10611.
137. Wang Z. et al. Avian influenza mRNA vaccine encoding hemagglutinin provides complete protection against divergent H5N1 viruses in specific-pathogen-free chickens //Journal of Nanobiotechnology. – 2025. – T. 23. – №. 1. – C. 55.
138. Warminski M. et al. Chemical modifications of mRNA ends for therapeutic applications //Accounts of Chemical Research. – 2023. – T. 56. – №. 20. – C. 2814-2826.
139. Wei C. J. et al. Comparative efficacy of neutralizing antibodies elicited by recombinant hemagglutinin proteins from avian H5N1 influenza virus //Journal of virology. – 2008. – T. 82. – №. 13. – C. 6200-6208.
140. Wei Z. et al. Technological breakthroughs and advancements in the application of mRNA vaccines: a comprehensive exploration and future prospects //Frontiers in immunology. – 2025. – T. 16. – C. 1524317.
141. Weldon W. C. et al. Enhanced immunogenicity of stabilized trimeric soluble influenza hemagglutinin //PLoS One. – 2010. – T. 5. – №. 9. – C. e12466.
142. Werninghaus I. C. et al. Neuraminidase delivered as an APC-targeted DNA vaccine induces protective antibodies against influenza //Molecular Therapy. – 2023. – T. 31. – №. 7. – C. 2188-2205.

143. Williams J. A. Improving DNA vaccine performance through vector design //Current gene therapy. – 2014. – T. 14. – №. 3. – C. 170-189.
144. Williams J. A. Vector design for improved DNA vaccine efficacy, safety and production //Vaccines. – 2013. – T. 1. – №. 3. – C. 225-249.
145. Wu N. C., Wilson I. A. Influenza hemagglutinin structures and antibody recognition //Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2020. – T. 10. – №. 8. – C. a038778.
146. Xia X. Detailed dissection and critical evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA vaccines //Vaccines. – 2021. – T. 9. – №. 7. – C. 734.
147. Xie R. et al. The episodic resurgence of highly pathogenic avian influenza H5 virus //Nature. – 2023. – T. 622. – №. 7984. – C. 810-817.
148. Xu L. et al. Advances in nucleic acid universal influenza vaccines //Vaccines. – 2024. – T. 12. – №. 6. – C. 664.
149. Xu L. et al. From sequence to system: Enhancing IVT mRNA vaccine effectiveness through cutting-edge technologies //Molecular Pharmaceutics. – 2024. – T. 22. – №. 1. – C. 81-102.
150. Yadav P. D. et al. Needle-free injection system delivery of ZyCoV-D DNA vaccine demonstrated improved immunogenicity and protective efficacy in rhesus macaques against SARS-CoV-2 //Journal of Medical Virology. – 2023. – T. 95. – №. 2. – C. e28484.
151. Yamada K. et al. Co-transcriptional modifications of 2'-hydroxyls on synthetic mRNA enhance ribonuclease resistance and lipid nanoparticle thermostability //Molecular Therapy Nucleic Acids. – 2025. – T. 36. – №. 4.
152. Ye Z. et al. The mRNA vaccine revolution: COVID-19 has launched the future of vaccinology //ACS nano. – 2023. – T. 17. – №. 16. – C. 15231-15253.
153. Zhao C., Pu J. Influence of host sialic acid receptors structure on the host specificity of influenza viruses //Viruses. – 2022. – T. 14. – №. 10. – C. 2141.
154. Zhang J. et al. Recent advances and innovations in the preparation and purification of in vitro-transcribed-mRNA-based molecules //Pharmaceutics. – 2023. – T. 15. – №. 9. – C. 2182.
155. Zhang M. et al. Advances and Strategies in Enhancing mRNA Cancer Vaccines //Advanced Materials. – 2025. – T. 37. – №. 42. – C. e09880.

156. Zhang N., Wang D. Preparing for the Next Influenza Pandemic: Vaccine Progress, Challenges, and Prospects //China CDC Weekly. – 2025. – Т. 7. – №. 44. – С. 1377.
157. Zhang S. et al. Signal peptides: From molecular mechanisms to applications in protein and vaccine engineering //Biomolecules. – 2025. – Т. 15. – №. 6. – С. 897.
158. Zhang T. et al. Research progress of aluminum phosphate adjuvants and their action mechanisms //Pharmaceutics. – 2023. – Т. 15. – №. 6. – С. 1756.
159. Zhang Y. Y., Zhang J. P., Zhang X. B. Engineering the poly (A) tail for therapeutic mRNA: from expression control to manufacturing robustness //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2026. – Т. 14. – С. 1838589.
160. Zong Y. et al. Lipid nanoparticle (LNP) enables mRNA delivery for cancer therapy //Advanced Materials. – 2023. – Т. 35. – №. 51. – С. 2303261.
161. Жирнов О. П., Львов Д. К. Птичий грипп: «По ком звонит колокол»? //Вопросы вирусологии. – 2024. – Т. 69. – №. 2. – С. 101-118.
162. Ильичев А. А. и др. Технология мРНК как одна из перспективных платформ для разработки вакцины против SARS-CoV-2 //Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24. – №. 7. – С. 802-807.