

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ЭПИДЕМИОЛОГИИ И
МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО АКАДЕМИКА Н.Ф.ГАМАЛЕИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Мазунина Елена Петровна

**РАЗРАБОТКА КАНДИДАТНОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ мРНК-
ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ СЕЗОННОГО ГРИППА И НОВОЙ
КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19**

3.2.7 Иммунология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доцент, д.б.н., В.А. Гуцин

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Этиология возбудителей гриппа и новой коронавирусной инфекции COVID-19.....	16
1.2. Особенности эпидемиологии	21
1.2.1. Источник, механизмы передачи.....	21
1.2.2. Сезонность.....	22
1.2.3. Инцидентность.....	24
1.2.4. Влияние на общественное здравоохранение	27
1.2.5. Факторы риска	29
1.2.6. Эпидемиологический надзор.....	31
1.3. Диагностика и лечение.....	33
1.4. Профилактика	36
1.5. Особенности иммунитета, формируемые в ответ на перенесенную инфекцию и использование инактивированных и живых аттенуированных вакцин от гриппа	42
1.6. Доклинические исследования гриппозных вакцин – общепринятые корреляты протекции, оценка кросс-реактивности иммунного ответа на животных.	50
1.7. Новые технологии для создания эффективных профилактических препаратов: опыт использования мРНК-вакцин.....	55
1.8. Комбинированные препараты для одновременной профилактики гриппа и коронавирусной инфекции.....	65
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	68
2.1. Материалы.....	68
2.1.1. Оборудование.....	68
2.1.2. Наборы	69
2.1.3. Линии клеток млекопитающих	69
2.1.4. Вирусы и антигены.....	69
2.1.5. Животные	70
2.1.6. Иммунобиологические препараты.....	70
2.2. Методы	71

2.2.1 Сборка конструкции ДНК-матрицы для синтеза мРНК.....	71
2.2.2 Накопление и выделение плазмиды	72
2.2.3 Получение препаратов ДНК-матрицы, кодирующих мРНК с поли(А)- трактом разной длины методом ПЦР.....	73
2.2.4 Секвенирование по Сэнгеру	74
2.2.5 Рестрикция.....	75
2.2.6 Получение синтетической мРНК в реакции <i>in vitro</i> транскрипции (IVT)	75
2.2.7 Оценка целостности мРНК методом электрофореза в денатурирующем ПААГ 8%.....	76
2.2.8 Упаковка мРНК в липидные наночастицы	77
2.2.9 Оценка размера наночастиц методом динамического светорассеяния (DLS), измерение дзета-потенциала.....	78
2.2.10 Анализ эффективности инкапсуляции мРНК и измерение концентрации мРНК в готовом препарате	78
2.2.11 Трансфекция клеток препаратами мРНК	80
2.2.12 Иммуноцитохимический анализ клеток.....	81
2.2.13 Работа с животными.....	81
2.2.14 Методика прижизненной визуализации активности люциферазы в мышцах	82
2.2.15 Методика <i>in vitro</i> измерения люциферазной активности в гомогенатах органов мышей	83
2.2.16 Иммуноферментный анализ сывороток животных	83
2.2.17 Анализ реакции торможения гемагглютинации (РТГА).....	84
2.2.18 Нарботка вирусов.....	84
2.2.19 Инфекционные модели гриппа и коронавируса на мышцах.....	85
2.2.20 Оценка вирус нейтрализующей активности (ВНА) сыворотки мышей	86
2.2.21 Детекция вирусной РНК в образцах лёгких мышей	86
2.2.22 Гематологическое исследование крови мышей	87
2.2.23 Обработка результатов.....	87
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	89
3.1. Разработка мРНК-платформы, обеспечивающей высокую экспрессию кодируемого белка	89

3.1.1. Создание конструкций ДНК-матрицы для синтеза препаратов мРНК...	89
3.1.2. Получение и характеристика мРНК-ЛНЧ препаратов	93
3.1.3. Исследование влияния компонентов <i>in vitro</i> синтеза мРНК на экспрессию репортерного белка люциферазы светлячка.	96
3.1.4. Исследование распределения и длительности экспрессии репортерного белка после внутримышечного введения препарата мРНК	106
3.1.5. Изучение экспрессии гена гемагглютинаина вируса гриппа H1N1 <i>in vitro</i>	109
3.1.6. Исследование влияния длины поли(А)-тракта на экспрессию репортерного белка люциферазы и иммуногенность гемагглютинаина гриппа H1N1.	111
3.2. Иммуногенность кандидатных мРНК-вакцинных препаратов на животных	115
3.2.1. Исследование иммуногенности моновалентных препаратов мРНК на мышах	115
3.2.2. Иммуногенность трёхвалентного мРНК-препарата на мышах	117
3.2.3. Иммуногенность комбинированного мРНК-препарата для профилактики гриппа и коронавируса на мышах.....	121
3.2.4. Изучение показателей поствакцинального иммунного ответа в отношении гетерологичных штаммов вируса гриппа методами РТГА и ИФА ...	128
3.3. Оценка эффективности мРНК композиций на животных моделях гриппозной и коронавирусной инфекции.....	133
3.3.1. Эффективность трехвалентного мРНК-препарата, на модели гриппозной инфекции у мышей.....	134
3.3.2. Эффективность комбинированного мРНК-препарата на мышах в экспериментах по заражению вирусом гриппа и коронавирусом	136
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	141
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	155
ВЫВОДЫ	157
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	159
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	163

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности.

Сезонные вирусы гриппа и коронавирус SARS-CoV-2 являются возбудителями острых респираторных вирусных инфекций человека, которые входят в список инфекционных заболеваний с наибольшей экономической значимостью в Российской Федерации. Во всем мире острая респираторная инфекция, связанная с сезонными вирусами гриппа, ежегодно становится причиной от 3 до 5 миллионов случаев тяжелого течения заболевания и от 290 000 до 650 000 случаев смерти [104]. При этом, согласно многолетним наблюдениям, увеличение заболеваемости гриппом в человеческой популяции носит сезонный характер, что требует проведения вакцинопрофилактики перед каждым сезоном. Новая коронавирусная инфекция – это острое инфекционное заболевание, вызываемое коронавирусом SARS-CoV-2, явившимся причиной трёхлетней пандемии COVID-19 (2020-2023 гг). На июнь 2025 г. общее кумулятивное число людей, заболевших коронавирусной инфекцией по всему миру, составило 770 млн человек, из которых около 7 млн случаев закончились летально [51]. На данный момент коронавирус, несмотря на официально анонсированное ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения) завершение пандемии COVID-19, продолжает циркулировать в человеческой популяции. Так же, как и вирусы гриппа, коронавирус подвержен быстрой эволюции, в результате чего появляются новые штаммы, вызывающие опасение [165], что требует постоянной адаптации профилактических вакцин. Вакцинация от сезонного гриппа и новой коронавирусной инфекции COVID-19 оказалась эффективной мерой профилактики развития тяжёлых форм заболевания и смертельных исходов [62]. Однако проблема не регулярной и непонятной для широких слоев смены антигенного состава вакцин для профилактики COVID-19 привела к резкому сокращению их использования [167]. Высокие показатели охвата вакцинацией (60–90%), достигнутые при использовании препаратов с исходным антигенным составом, в настоящее время сменились выраженной тенденцией к

снижению темпов иммунизации актуализированными формами вакцин [53]. Низкая приверженность вакцинации наблюдается даже в группах повышенного медико-социального риска, что ставит под угрозу коллективный иммунитет и повышает вероятность роста показателей заболеваемости и летальности от COVID-19 [121; 267]. В качестве стратегии по поддержанию необходимого уровня популяционной защиты целесообразно рассмотреть переход к плановой ревакцинации. Оптимальным решением может стать интеграция иммунопрофилактики COVID-19 в программы сезонной вакцинации против гриппа, учитывая отработанную логистику и традиционно широкий охват взрослого населения данной процедурой.

Быстрая разработка вакцин для профилактики COVID-19 стала возможной благодаря платформенному подходу, который обладает большими преимуществами в случае необходимости периодической смены антигенного состава вакцин.

Платформенный подход к разработке вакцин — это современная стратегия, использующая стандартизированную технологическую базу («платформу»), которую можно быстро адаптировать для изготовления профилактических препаратов от различных патогенов [270]. Вместо разработки препарата *de novo* для каждого нового заболевания, исследователи используют одни и те же основные компоненты, такие как системы доставки, производственные процессы и нормативные данные, и заменяют только генетическую последовательность или антиген. Наиболее известными платформами для создания вакцинных препаратов на данный момент являются технологии на основе вирусных векторов, вирусоподобных частиц, белковых субъединиц, ДНК, разных типов РНК, включая мРНК [146]. Для всех платформ характерно наличие общих составляющих — средство доставки (липидные наночастицы, вирусный вектор и др.), производственный процесс, аналитические испытания и контроль качества, нормативная документация.

мРНК-вакцины представляют собой многокомпонентную систему, в которой активной субстанцией является синтетическая мРНК, инкапсулированная в липидные наночастицы с помощью микрофлюидного смешивания. В случае

профилактических вакцинных препаратов в мРНК кодируют белковый антиген того или иного инфекционного агента.

Конструкция не реплицирующихся линейных мРНК в основе вакцин, может быть модифицирована с использованием различных 5'-кэп структур, 5'- и 3'-нетранслируемых областей (НТО), модифицированных нуклеотидов, поли(А)-тракта. Выбор компонентов и типа модификаций мРНК не всегда очевиден даже на ключевых этапах создания вакцинного препарата, таких как кэпирование и полиаденилирование.

Так, при выборе реагента для ко-транскрипционного кэпирования часто применяют реагент CleanCap (m7G(3'OMe)pppA(2'OMe)pG) [229], при этом доля кэпированной мРНК очень высока и составляет порядка 90-96%. Однако, CleanCap является дорогостоящим компонентом и имеет ограничения по промышленному применению. В то же время препарат мРНК, полученный с использованием системы ARCA (Augmented Region-Specific Capping Assembly, 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')) согласно исследованиям Я. Емелиты с соавторами содержит только 71% кэпированной мРНК [124], но является более доступным вариантом и привлекательным с точки зрения отсутствия для него лицензионных ограничений.

Другим вопросом, требующим решения, является выбор модификаций нуклеиновых оснований при синтезе конструкции. Использование модифицированных нуклеотидов для получения мРНК-препаратов стало прорывным открытием в данной области и, по сути, сделало возможным использование первых мРНК-вакцин для профилактики COVID-19. Модифицированная таким образом мРНК приводит к большей продукции закодированного белка, за счёт снижения распознавания рецепторами врождённой иммунной системы [133]. Большой вклад в этой области внесли Каталин Карико и Дрю Вайсман, которые в 2023 были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине. В разрешённых к применению мРНК-вакцинах присутствует 100% замена уридина на N1-метилпсевдоурин, однако, помимо этого в коммерческом доступе в РФ имеются другие модифицированные нуклеотиды – псевдоурин, 5-метоксиурин, N6-метиладенозин, 5-метилцитидин. Замещая ими один из

четырёх нуклеотидов во время синтеза мРНК или комбинируя их, можно достичь разной степени модификации синтетической мРНК, позволяя влиять на продукцию закодированного белка и предотвратить распознавание молекулы мРНК как чужеродной для врождённой иммунной системы.

Стабильность мРНК при введении вакцины в организм и эффективность трансляции закодированного в ней антигена обуславливает эффективность применения конструкции. Немаловажным параметром, влияющим на эти процессы, является длина поли(А)-тракта мРНК. В литературе встречается много противоречивой информации. Согласно результатам предшествующих исследований, для обеспечения стабильности мРНК минимально достаточна длина примерно в 30 нуклеотидов, в то время как в одобренных мРНК-вакцинах заявляется поли(А)-тракт длиной не менее 110 нуклеотидов [205]. При этом некоторые мРНК стабильны и эффективно транслируются, несмотря на очень короткий (менее 20 нуклеотидов) или отсутствующий поли(А)-хвост [257; 36].

Таким образом, целый ряд параметров вновь создаваемых вакцинных конструкций может напрямую влиять на эффективность применения мРНК-препаратов *in vivo*. При этом, особенности формирования разнонаправленного иммунного ответа под действием мРНК-препаратов, по всей видимости, зависят от конкретного дизайна как кодирующей, так и не кодирующей частей мРНК, и могут быть оптимизированы в каждом конкретном случае.

Вакцины на основе мРНК хорошо зарекомендовали себя во время пандемии COVID-19, обладая высокой иммунологической и эпидемиологической эффективностью [25; 202]. мРНК-технология представляется привлекательной платформой для создания вакцин против инфекций, вызванных вирусами гриппа и коронавирусами и имеет ряд преимуществ перед применяемыми вакцинами, а именно: а) с помощью синтетических мРНК можно обеспечить быстрое производство вакцин в случае появления нового штамма вируса [42]; б) производство вакцины может быть инициировано с использованием генетической последовательности вируса без необходимости изоляции и адаптации самого вируса; в) отсутствие риска мутаций в результате лабораторных пассажей вируса;

г) высокая специфичность препаратов на основе мРНК позволяет экспрессировать только закодированный антиген и вызывать направленный иммунный ответ организма [275]; д) этот тип доставки антигена способствует как гуморальному, так и клеточному иммунному ответу и стимулирует реакции врожденной иммунной системы [260]; е) мРНК-платформа позволяет создавать комбинированные препараты для одновременной профилактики нескольких инфекций. Ввиду перечисленных свойств платформа мРНК перспективна для разработки профилактических вакцин от высоко изменчивых вирусов.

Данная диссертационная работа направлена на разработку кандидатных вакцинных препаратов на основе мРНК-платформы для профилактики гриппа и новой коронавирусной инфекции COVID-19, исследование их иммуногенности, кросс-специфичности иммунного ответа и протективности на лабораторных животных.

Цель работы – разработка мРНК-платформы и создание на ее основе кандидатных вакцинных препаратов для специфической профилактики сезонного гриппа и новой коронавирусной инфекции COVID-19.

Для достижения поставленной цели были определены следующие основные **задачи**:

1. Сконструировать ДНК-матрицы для синтеза мРНК, кодирующих репортерный белок, антигены сезонных вирусов гриппа и коронавируса SARS-CoV-2.
2. Оценить влияние элементов конструкции (кЭП-структуры, модификации нуклеотидов и длины поли(А)-тракта) и способа введения на трансляционную активность препаратов мРНК *in vitro* и *in vivo*.
3. Изучить иммуногенность комбинированных мРНК-препаратов, кодирующих антигены вирусов гриппа А A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)pmd09, A/Darwin/9/2021 (H3N2), B/Austria/1359417/2021 (В/линия Виктория), B/Massachusetts/02/12 (В/линия Ямагата) и коронавируса SARS-CoV-2 линии Омикрон на мышах.

4. Оценить показатели перекрестного поствакцинального иммунного ответа у животных в отношении гетерологичных штаммов вируса сезонного гриппа.

5. Охарактеризовать эффективность кандидатных вакцинных композиций мРНК-препаратов на животной модели инфекций гриппа А и коронавируса SARS-CoV-2.

Научная новизна.

В рамках данной работы исследовано влияние компонентов мРНК конструкции в прямых сравнительных экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Изучено влияние модифицированных нуклеотидов на выход мРНК в реакции транскрипции и её трансляционную активность *in vitro*. Показано, что мРНК, кэпированная с использованием системы ARCA, обеспечивает более быструю экспрессию закодированного белка, но характеризуется ее быстрым спадом по сравнению с мРНК, кэпированной CleanCap, которая обеспечивает максимум экспрессии трансгена через 8 часов и продолжительность трансляции в месте введения вплоть до 21 суток. На основе полученных данных выбран оптимальный состав компонентов синтеза мРНК для создания иммуногенных кандидатных вакцинных препаратов.

Впервые в РФ получены экспериментальные мультивалентные (трех-, четырех- и пятикомпонентные) мРНК-препараты для профилактики гриппа и коронавируса. Они охарактеризованы по иммунологическим свойствам (структуре иммунного ответа, кросс-специфичности и продолжительности) при введении животным, а также протективной активности на моделях гриппозной и коронавирусной инфекции на мышах. Экспериментально доказано отсутствие взаимного негативного влияния отдельных компонентов в составе комбинированного препарата на уровень индуцируемого ими иммунного ответа на мышах.

В рамках работы впервые продемонстрировано, что, в отличие от классических вакцин для профилактики гриппа, способ доставки антигена с помощью мРНК (на примере гемагглютинаина вируса гриппа) приводит к выработке

гуморального иммунного ответа не только на иммунодоминантный глобулярный домен антигена, но и на более консервативный стеблевой домен гемагглютинаина, потенциально являющийся одной из основных мишеней при создании универсальных вакцин от гриппа

Теоретическая и практическая значимость.

В работе исследовано влияние компонентов синтетической мРНК (кэпирование, модифицированные нуклеотиды и длина поли(А)-тракта) на трансляционную активность репортерной мРНК *in vitro* и *in vivo* и иммуногенность кандидатных мРНК-препаратов *in vivo*.

В ходе выполнения работы было выявлено преимущество линейного вектора рJAZZ-ОК над кольцевым по стабильности сегментированного поли(А)-тракта в составе конструкции мРНК. Были получены плазмидные конструкции для наработки кандидатных мРНК-препаратов, кодирующих антигены сезонных вирусов гриппа и SARS-CoV-2, а рекомбинантные штаммы-продуценты *E.coli* охарактеризованы и депонированы в лабораторную коллекцию.

Исследования гуморального иммунного ответа и протективности кандидатных вакцинных препаратов показали преимущества мРНК-препаратов над инактивированной (более высокие титры РТГА (реакция торможения гемагглютинации), высокая протективность в условиях заражения вирусом гриппа А). Так же была выявлена способность мРНК-препаратов индуцировать выработку антител к консервативному стеблевому домену гемагглютинаина, что является одним из способов достижения универсальности вакцинального иммунного ответа. Впервые показана продолжительность иммунного ответа после иммунизации мРНК-препаратом на мышах, который сохраняется в течение как минимум 245 дней, при этом титр РТГА был на уровне 1:186 после двукратной иммунизации мышей 2,5 мкг мРНК, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа А H1N1.

Разработан подход для создания мультивалентных вакцинных препаратов на основе мРНК. Созданные с помощью этого подхода препараты индуцируют выработку антител, перекрёстно реагирующих с разными штаммами вируса гриппа внутри серотипов А/H1N1, А/H3N2 и В, способствуют 100% протективности в

летальных моделях инфекций, вызванных вирусом гриппа и SARS-CoV-2 на животных. Полученные результаты стали основой для перехода к доклиническим исследованиям эффективности и безопасности кандидатного препарата.

Внедрение результатов исследования в практику.

По результатам разработки сформирован комплект объектов интеллектуальной собственности, который готовится для последующей коммерциализации. Среди них патенты №2792231 «Вектор на основе мРНК для увеличенной продукции целевого белка в клетках млекопитающих (варианты)», №2836687 «Иммунобиологическое средство для индукции комплексного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и вируса гриппа», №2838904 «Иммунобиологическое средство для индукции иммунного ответа против вируса гриппа и его применение».

Методология и методы исследования.

Методологическую основу исследования составляют: иммунологические методы, методы молекулярной биологии, методы работы с лабораторными животными, вирусологические методы.

Иммунологические: иммуноферментный анализ (ИФА), реакция торможения гемагглютинации, иммунизация животных (мышей).

Молекулярно-биологические: клонирование, полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование по Сэнгеру, *in vitro* транскрипция, агарозный и полиакриламидный денатурирующий гель-электрофорез нуклеиновых кислот.

Вирусологические методы: культивирование вирусов гриппа на куриных эмбрионах, определение титра вируса методом TCID₅₀, заражение мышей вирусом гриппа.

Статистическая обработка результатов: учет и статистическую обработку результатов экспериментов проводили общепринятыми методами с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel, GraphPad Prism. Для статистического сравнения групп первоначально проводили оценку нормальности распределения значений с использованием теста Колмогорова-Смирнова. Несвязанные величины/выборки анализировали с использованием теста

Краскела-Уоллиса для множественного непараметрического сравнения использовали t-тест с критерием Манна-Уитни. Данные по выживаемости в экспериментах с заражением анализировали, применяя тест Мантеля-Кокса.

Положения, выносимые на защиту.

1. Способ доставки антигена в организм экспериментальных животных в виде мРНК (содержащей *cap1* структуру, 100% замену уридина на N1-метилпсевдоуридин и длину поли(А)-тракта не менее 80 нуклеотидов) вызывает выработку высокого уровня антигенспецифичных антител (в том числе по отношению к гетерологичным штаммам) и продолжительности иммунного ответа на мышах.

2. Комбинирование мРНК, кодирующих 4 антигена вирусов гриппа (сезонная вакцина от гриппа) и антиген коронавируса SARS-CoV-2, не влияет на иммуногенность отдельных компонентов и обеспечивает защиту от гибели заражения летальными дозами вируса гриппа А и сниженную вирусную нагрузку в лёгких после заражения животных вирусом SARS-CoV-2.

Степень достоверности

Методологическая основа исследования полностью отвечает его целям и задачам. Репрезентативность выборки обеспечена достаточным объемом экспериментальных данных и наблюдений. Применение адекватных методов биометрической статистики подтверждает достоверность полученных результатов. Сформулированные выводы логически вытекают из анализа фактического материала и имеют глубокое научное обоснование.

Тема диссертации утверждена на ученом совете ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России 19.09.2024 г. Диссертация была апробирована 14.11.2025 г. на совместной научной конференции отделов эпидемиологии и иммунологии и лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих мероприятиях: IV Международный форум «Дни вирусологии 2023» Trends in Influenza Research – 2023, On-line – 2-4 октября 2023; Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика –

2023», Москва – 16 ноября 2023; Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус БИОТЕХ 2024», федеральная территория «Сириус» - 15-17 мая 2024; Конкурс молодых ученых, специалистов и аспирантов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва – ноябрь 2024; Научно-практическая конференция с международным участием «Всероссийский дискуссионный клуб COVID-19 и не только: все о респираторных инфекциях», Онлайн – 12 марта 2025; Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус БИОТЕХ 2025», федеральная территория «Сириус» – 21 – 23 мая 2025, Научно-практическая конференция «Все о респираторных инфекциях: диагностика, лечение, профилактика», Онлайн – 8 октября 2025.

Личный вклад автора.

Все результаты получены самим автором или при непосредственном его участии. ДНК-векторы, источники генов гемагглютинаина, для создания мРНК-конструкций были любезно предоставлены научным сотрудником группы дизайна и синтеза генов лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, к.б.н. Щербининым Д. Н. Вакцина Гам-КОВИД-Вак с обновлённым составом (Омикрон ХВВ.1.) была любезно предоставлена Филиалом «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Автор непосредственно осуществлял работы по получению препаратов мРНК, иммунизации животных, исследованию иммуногенности и эффективности полученных препаратов. Исследование активности репортерного белка люциферазы светлячка на клеточных линиях и животных проведено автором совместно с научным сотрудником лаборатории клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, к.б.н. Джаруллаевой А.Ш. Анализ сыворотки крови животных в РТГА был проведен на базе лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа под руководством профессора, д.м.н. Бурцевой Е. И. (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России). Оценка эффективности мРНК-препаратов при заражении коронавирусом, а также анализ вируснейтрализующей активности сывороток крови

животных проведен непосредственно автором совместно с научным сотрудником лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, к.х.н. А. Э. Синявиным. Автор принимал непосредственное участие при подготовке публикаций по материалам работы, ссылки на которые с указанием соавторов присутствуют в тексте работы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации и результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 6 и 7 паспорта научной специальности 3.2.7. Иммунология.

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 7 работ: из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и/или рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ и 4 патента РФ на изобретение:

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 194 страницах, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы и список используемой литературы (291 источник, в том числе 13 отечественных и 278 зарубежных). Работа содержит 4 таблицы и 30 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Данная глава диссертационной работы посвящена обзору отечественной и зарубежной литературы относительно характеристики гриппозной и новой коронавирусной инфекции; методов и средств специфической профилактики гриппа и COVID-19, особенностей иммунного ответа на разные типы вакцин от гриппа и новой коронавирусной инфекции COVID-19, доклинических исследований выраженности и кросс-реактивности индуцируемого вакцинацией иммунного ответа на лабораторных животных, а также касает особенностей мРНК-платформы для создания вакцинных препаратов.

1.1. Этиология возбудителей гриппа и новой коронавирусной инфекции COVID-19

Вирусы гриппа могут вызывать вспышки и отдельные спорадические случаи, эпидемии и пандемии. По оценкам некоторых исследователей крупные эпидемии гриппа возникали со времён Средневековья и, возможно, даже древних времён. За последние 136 лет были зафиксированы пандемии, вызванные различными вирусами гриппа в т.ч.: в 1889 (А/Н3N2), 1918 (А/Н1N1), 1957 (А/Н2N2), 1968 (А/Н3N2), 1977 (А/Н1N1) и 2009 (А/Н1N1) годах, сведения о которых задокументированы в научных статьях [177]. Пандемия гриппа Н1N1 1918-1919 годов, названная «испанкой», была одним из самых летальных событий в истории человечества, унеся жизни, по различным оценкам, от 50 до 100 миллионов человек [128].

Вариабельность антигенной структуры вирусов гриппа А, выделенных в период разных эпидемий, активно начала исследоваться в 1960 гг. Было открыто более двух десятков новых, ранее неизвестных, вирусов, совершенно по-новому стала изучаться экология вирусов гриппа. Вскоре В.М. Ждановым, Д.К. Львовым и Р.Г. Вебстером была выдвинута гипотеза, согласно которой «антигенные шифты являются результатом рекомбинации генов вируса гриппа человека и животных» [3; 266].

Вирусы гриппа относятся к семейству вирусов *Orthomyxoviridae*, геном которых представлен одноцепочечной сегментированной РНК с отрицательной полярностью. Наличие (-)РНК подразумевает, что для начала трансляции закодированных в РНК белков вирусу необходимо получить сначала комплементарную (+)РНК цепь. На данный момент известно о четырех типах вирусов гриппа – А, В, С и D. Вирусы гриппа А и В циркулируют в человеческой популяции и вызывают сезонные подъемы заболеваемости гриппом [60]. Вирусы типа С также циркулируют среди людей, что проявляется слабо выраженными симптомами поражения верхних дыхательных путей, эпидемиологически заболевание характеризуется спорадическими случаями и незначительными локальными вспышками [46]. Вирусы типа D в основном поражают свиней и крупный рогатый скот и не вызывают заражения людей [76].

Вирусы гриппа А уникальны тем, что они циркулируют не только среди людей, но и среди домашних животных (свиней, лошадей и домашней птицы), а также среди диких перелетных птиц (известно более 100 видов, среди которых утки, гуси, лебеди, чайки, кулики и дикие водоплавающие птицы), которые считаются естественными резервуарами [5; 188]. Вирусы гриппа А классифицируются на подтипы на основе комбинации гликопротеинов гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (NA) на поверхности вирионов. Среди различных штаммов вируса гриппа А у птиц было выявлено 16 антигенно различных серотипов или подтипов НА и 9 антигенно различных серотипов или подтипов NA (по другим оценкам - 18 НА и 11 NA, если принимать во внимание вирусы гриппа летучих мышей, относящихся к типу А, которые филогенетически близки к вирусу гриппа А, но вероятно не способны реассортировать с ними [247]).

У людей наиболее широко циркулируют следующие варианты вирусов типа А – А/Н1N1, А/Н2N2 и А/Н3N2. Вирусы подтипов А/Н1N1 и А/Н3N2 в настоящее время вызывают сезонные эпидемии вируса гриппа. Вирусы гриппа В не имеют резервуара среди животных, циркулируют только среди людей, делятся на две основные линии (В/Victoria и В/Yamagata), отличить которые удалось в 1970-х годах [30; 130].

В силу различных механизмов непрерывной генетической эволюции вирусов гриппа, включающих антигенный дрейф [33], реассортацию [103] и рекомбинацию [88], приводящих к изменению антигенных характеристик возбудителя, иммунитет человеческой популяции, сформированный либо естественным путем - в результате перенесенной инфекции, либо в результате вакцинации, становится не эффективным уже менее чем через год [33; 34]. Это создает постоянную угрозу сезонных эпидемий гриппа в человеческой популяции.

У вирусов гриппа А и В геном включает восемь отдельных сегментов, каждый из которых кодирует один или несколько функционально важных белков, необходимых для проникновения вируса в клетку, репликации или входящих в состав структуры вируса. В совокупности геном кодирует 11 различных белков, из которых 8 образуют структуру вирусной частицы [40]. На поверхности вируса находятся два основных шиповидных гликопротеина, которые являются основными антигенными детерминантами - гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA). Гемагглютинин (HA) опосредует проникновение вируса в клетки и обладает активностью связывания с рецептором и слияния мембран. NA опосредует ферментативное расщепление вирусного рецептора на поздних стадиях инфекции, что позволяет высвободить из клетки вирионы потомства. Ещё один мембранный белок, M2, является многофункциональным протонселективным ионным каналом, который участвует как в проникновении вируса, так и в сборке и высвобождении вирусных частиц. Внутри вирусной оболочки матричный белок (M1) поддерживает структуру вириона и обеспечивает взаимодействие между вирусной липидной мембраной и рибонуклеопротеиновым (RNP) ядром [201]. Ядро RNP состоит из белков комплекса РНК-полимеразы, PB1, PB2 и PA, и белка нуклеокапсида (NP), который опосредует связывание и упаковку вирусного генома. Во время репликации вируса экспрессируются три других белка, которые не включаются в зрелый вирион. Неструктурный белок 1 (NS1) является многофункциональным белком, играющим важную роль в уклонении от иммунной системы хозяина. Неструктурный белок 2 - NS2 (NEP) – играет решающую роль в обеспечении экспорта вирусных RNP из ядра клетки во время репликации. Кроме того, многие

штаммы вируса гриппа, экспрессируют белок, обозначенный как PB1-F2, который транскрибируется со второй рамки считывания в PB1. Белок PB1-F2 участвует в индукции апоптоза клетки-хозяина [155]. Менее изученными в контексте иммуногенности и вакцинных мишеней являются амбиполярные белки вирусов гриппа – продукты амбиполярных генов NSP1-NSP8 соответствующих сегментов вирусной РНК [289; 290], которые возможно играют определённую роль в выживаемости вируса и его эволюции. Предполагается, что указанные неканонические белки могут участвовать в структурировании (декорировании) вирусного генома, способствуя формированию морфологически новых классов вирусных частиц. Помимо структурной роли, данные протеины могут обладать специфическим регуляторным потенциалом, детерминирующим изменение биологических свойств вируса в организме хозяина. В частности, они могут выступать модуляторами инфекционного процесса, инициируя переход от продуктивной репликации к латентной персистенции с низкой интенсивностью вирусной репродукции.

В зависимости от пути передачи вирус гриппа поражает эпителиальные клетки дыхательных путей для инфицирования и продуктивной репликации. Кроме того, некоторые вирусы птичьего гриппа А, особенно подтипа H7, были связаны с инфекциями глаз и конъюнктивитом (воспалением конъюнктивы) у человека [79]. Тяжесть инфекции у людей связана с репликацией вируса в нижних дыхательных путях, что сопровождается сильным воспалением из-за инфильтрации иммунными клетками.

Возбудителем новой коронавирусной инфекции COVID-19 является коронавирус SARS-CoV-2. Он представляет собой оболочечный зооантропонозный РНК-вирус, отнесённый к семейству *Coronaviridae*, роду *Betacoronavirus*, подсемейству *Orthocoronavirinae*, роду *Betacoronavirus*, подроду *Sarbecovirus*, виду SARS [45]. Коронавирусы являются распространёнными патогенами людей и животных. Четыре коронавируса являются эндемичными для человека (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1) и обычно поражают верхние дыхательные пути, вызывая симптомы простуды. За последние два десятилетия три

зооантропонозных коронавируса (коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) и SARS-CoV-2) вызвали инфекции среди людей, перейдя к ним от животных-носителей. SARS-CoV возник в Китае и вызвал эпидемию в 2003 году, а MERS-CoV в настоящее время вызывает периодические вспышки на Ближнем Востоке [66; 197; 286]. SARS-CoV-2, возбудитель COVID-19, был впервые обнаружен в китайском городе Ухане провинции Хубей в декабре 2019 у группы пациентов с пневмонией [291]. Эти три вируса могут размножаться в нижних дыхательных путях и вызывать потенциально смертельный острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС). По сравнению с коронавирусами SARS-CoV и MERS-CoV, SARS-CoV-2 характеризуется существенно меньшим уровнем летальности 5,6% против 13% и 35% соответственно [204]. Как и многим РНК-вирусам SARS-CoV-2 присуща высокая частота мутаций при репликации генетического материала, что приводит к образованию новых вариантов вируса. В начале пандемии ВОЗ была принята следующая классификация циркулирующих вариантов вируса и его суб-линий: варианты под наблюдением (VUM – variant under monitoring), варианты, вызывающие интерес (VOI – variant under interest) и варианты, вызывающие обеспокоенность (VOC – variant of concern). Эта классификация отражает потенциальное влияние варианта вируса на общественное здравоохранение, при этом VUM вызывает наименьшее беспокойство, а VOC – наибольшее [220]. Наблюдения показали, что каждый VOC вариант SARS-CoV-2 увеличивает свою инфекционность с различными последствиями для общественного здравоохранения. Например, вариант Delta показал повышенную ускользание от нейтрализующих антител, обнаруженных у перенесших инфекцию пациентов [173]. На данный момент циркулирующие варианты VOC не выявляются, распространяющиеся в настоящее время варианты относятся либо к VUM, либо к VOI.

Геном вируса SARS-CoV-2 кодирует набор структурных белков (мембранный белок (M), нуклеокапсидный белок (N), белок оболочки (E) и шиповидный гликопротеин (S), неструктурных белков (большинство из которых составляют

комплекс репликации и транскрипции вируса) и вспомогательных белков. Вирион состоит из структурных белков, липидного бислоя, полученного от инфицированной клетки, и вирусной геномной РНК. Вспомогательные белки не нужны для репликации, но обладают иммуносупрессивной активностью [210; 259]. Основным фактором, определяющим тропизм коронавируса, является шиповидный гликопротеин (спайк белок, S белок), который образует тримеры на поверхности вирионов [48]. Спайк белок состоит из двух субъединиц: субъединицы S1, которая связывается с рецептором ACE2, и субъединицы S2, которая обеспечивает слияние мембран вириона и клетки. Для осуществления слияния мембран вируса и клетки-мишени необходимо расщепление S-белка по двум сайтам S1/S2 и S2'. Первый сайт (S1/S2) содержит мотив расщепления фурином, расщепление по этому сайту приводит к активации S-белка, в результате чего тетрамер спайк белка приобретает пре-фузионную конформацию необходимую для взаимодействия с ACE2 рецептором клеток мишеней [29]. После связывания с ACE2 в клетке-мишени S белок претерпевает второе расщепление трансмембранной сериновой протеазой TMPRSS2 в участке S2' [277]. Это расщепление активирует тримеры субъединицы S2, которые осуществляют слияние мембран вируса и клетки-хозяина, высвобождая в клетку вирусный РНК комплекс. Другим путём проникновения вируса может быть эндосома, в которой катепсины могут расщеплять спайк белок, но этот путь неэффективен в первичных эпителиальных клетках [277].

1.2. Особенности эпидемиологии

1.2.1. Источник, механизмы передачи

Источником инфекции гриппа является больной человек в остром периоде заболевания (5-й – 7-й дни болезни), в том числе с легкой или бессимптомной формой, реже – реконвалесцент, выделяющий вирус, в среднем, в течение двух недель от начала заболевания [4]. Механизмы и пути передачи вируса гриппа следующие. Аэрозольный механизм реализуется воздушно-капельным и воздушно-пылевым путями передачи. Возбудитель вируса гриппа распространяется при разговоре, кашле, чихании. Максимальное его количество содержится в

крупнокапельной фазе аэрозоля, выделяемого больным. Радиус рассеивания вируса составляет 2 – 3 м. Контактно-бытовой путь фекально-орального механизма передачи имеет значительно меньшее эпидемиологическое значение. Реализуется через предметы обихода, игрушки, белье, посуду [7].

Длительность сохранения инфекционности в окружающей среде зависит от условий внешней среды: для вирусов гриппа она варьирует от нескольких часов до 7 – 12 дней. Восприимчивость к вирусу гриппа практически всеобщая. В течение жизни человек многократно встречается с вирусами гриппа, что не исключает восприимчивость к появляющимся новым штаммам.

В случае новой коронавирусной инфекции ее источником является больной человек, в том числе находящийся в инкубационном периоде заболевания, и бессимптомный носитель SARS-CoV-2.

Главным путем передачи SARS-CoV-2 является воздушно-капельный, который реализуется при кашле, чихании и разговоре на близком (менее 2 метров) расстоянии [1]. Возможен контактно-бытовой путь передачи, который реализуется во время рукопожатий и при других видах непосредственного контакта с инфицированным человеком, а также через поверхности и предметы, контаминированные вирусом. РНК SARS-CoV-2 обнаруживалась в образцах фекалий больных COVID-19, однако риск инфицирования посредством фекально-орального механизма передачи является низким. Вирус SARS-CoV-2 может сохранять жизнеспособность на пластике до 84 часов при комнатной температуре и температуре «джунглей», но не обнаруживается через 96 часов, согласно исследованию Национального института здравоохранения (NIH) [161]. Время сохранения инфекционности вируса значительно уменьшается при более высоких температурах, при 70°C оно составляет всего 5 минут.

1.2.2. Сезонность

Сезонные эпидемии гриппа часто случаются зимой в умеренных регионах Северного и Южного полушарий [241]. В год происходит как правило два «сезона гриппа»: один в Северном полушарии и один в Южном полушарии. Сезонность гриппа в тропиках различается: в некоторых регионах эпидемии возникают в сезон

дождей, в то время как в других регионах вирусы гриппа циркулируют круглый год с несколькими пиками или без каких-либо четких сезонных пиков [183]. Климатические факторы, включая минимальную температуру, количество солнечных часов и максимальное количество осадков, по-видимому, являются наиболее сильными предикторами сезонности гриппа [285]. Сезонные вирусы гриппа В ко-циркулируют в организме человека с вирусами гриппа А и следуют тем же моделям передачи. Согласно исследованиям НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева путей распространения эпидемий гриппа по территории России за многолетний период (1968–2019 гг.) и влияния их на заболеваемость гриппом А(Н1N1), А(Н3N2) и В основные возбудители эпидемий поступали на территорию России чаще с запада или обоими путями: и с запада, и с востока [135]. Сезонность сопровождалась сменой основного возбудителя, при этом изменялся и путь распространения вируса, циркулировавшего в предыдущем сезоне.

Активность вируса SARS-CoV-2, как правило, меняется в зависимости от сезона, то есть имеет некоторые сезонные особенности. Данные за четыре года о случаях COVID-19, госпитализациях и смертях показывают, что у COVID-19 есть зимние пики (последний раз в конце декабря 2023 года и начале января 2024 года), но также есть и летние пики (последний раз в июле и августе 2023 года). Но всё же SARS-CoV-2 не имеет чёткой сезонности, такой как у гриппа и респираторно-синцитиального вируса (РСВ). При моделировании эпидемического процесса существует ряд препятствий для того, чтобы напрямую оценить будущие сезонные модели заражения на основе данных о COVID-19: глобальная изменчивость мер общественного здравоохранения, меняющаяся динамика распространения вируса и короткий период с момента появления SARS-CoV-2 [248]. Эти факторы препятствуют проведению информативных исследований, связывающих заражение с параметрами окружающей среды в разных местах, (ультра-фиолетовое (УФ) излучение, влажность, осадки и температура) [38; 131; 145; 154]. Без хорошо изученных корреляционных связей не хватает параметров для исследований в области эпидемиологического моделирования. На территории Российской Федерации за 2024 год динамика уровня заболеваемости COVID-19

характеризовалась неравномерностью, обусловленной периодами социальной активности населения, а также появлением новых сублиний геноварианта Омикрон SARS-CoV-2 [2] (рисунок 1).

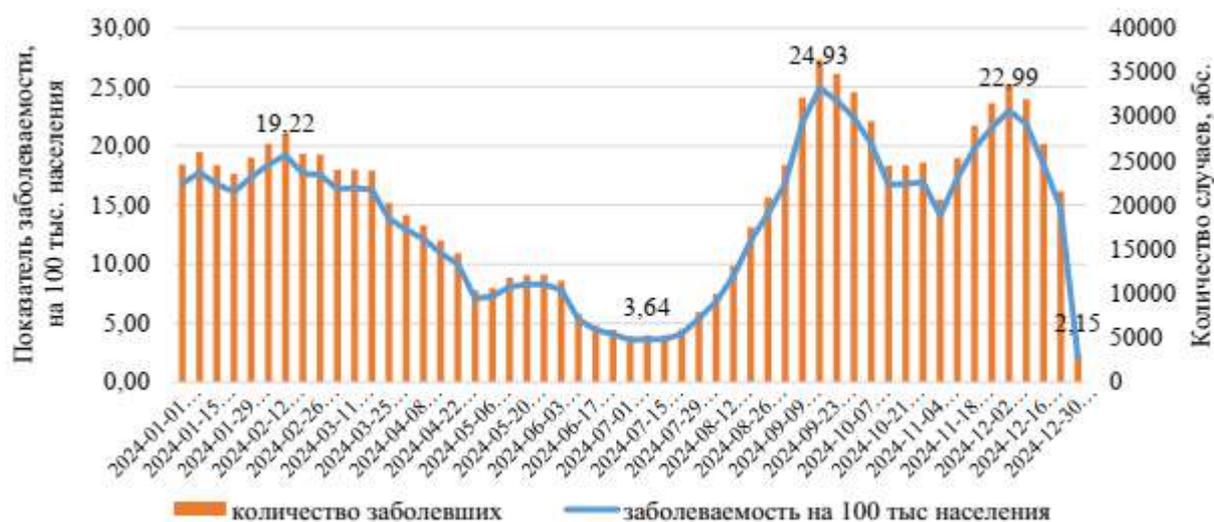


Рисунок 1 - Динамика заболеваемости COVID-19 (на 100 тыс. населения) и число заболевших (абс.) в 2024 г. в Российской Федерации. По [2] без изменений.

1.2.3. Инцидентность

По оценкам ВОЗ вирусы гриппа ежегодно вызывают около 1 млрд случаев заболевания (от 10 до 30% населения планеты), среди которых фиксируется 3-5 миллионов случаев тяжелого течения болезни и 290 – 650 тысяч смертельных исходов [119]. Во время эпидемий показатели инфицирования вирусом гриппа обычно самые высокие среди детей школьного возраста. Дети, вероятно, являются основными переносчиками вирусов гриппа у людей, в пользу чего говорят исследования, показывающие, что вакцинация детей снижает частоту тяжелых инфекций, вызванных вирусом гриппа, у пожилых людей [92].

С 2021 г. наблюдалась тенденция к росту заболеваемости гриппом на территории Российской Федерации, а в 2024 г. этот показатель снизился по сравнению с 2023 годом на 27,1 % и составил 121,67 на 100 тыс., оставаясь при этом выше среднемноголетних значений (38,93 на 100 тыс. населения) – в 3 раза (рисунок 2).



Рисунок 2 - Динамика заболеваемости гриппом в Российской Федерации в 2012–2024 гг. (на 100 тыс. населения). По [2] без изменений.

Пандемия COVID-19 оказала влияние на эпидемический процесс ОРВИ и гриппа. Так, согласно ретроспективному анализу динамики заболеваемости ОРВИ и гриппом (с 1999 по 2021 гг.) на территории РФ и в Москве в 2021 г. показатель заболеваемости гриппом снизился более чем в 2 раза во всех Федеральных округах страны за исключением столичного региона, где он стал максимальным – 65,9 на 100 тыс. населения в 2021 г. (против 14,1 в 2019 г.) [227]. По мере снижения частоты выявления SARS-CoV-2 до 15–19% возрастала активность вирусов гриппа и других возбудителей группы ОРВИ (с 0,7–3,0% в период развитой пандемии до 5,6–6,6% на этапе ее снижения), что свидетельствует о выраженной интерференции возбудителей, что выявлено и на общемировом уровне в системе Глобального госпитального надзора за гриппом [227].

Согласно данным Роспотребнадзора в Российской Федерации в 2024 г. зарегистрировано снижение уровня заболеваемости коронавирусной инфекцией (COVID-19) [2]. Всего в стране было выявлено 1 125 289 случаев COVID-19 (в 2023 г. – 2 072 203 случаев), показатель заболеваемости составил 769,17 на 100 тыс. населения. По сравнению с 2023 г. заболеваемость снизилась на 45,5 %, что

обусловлено эффективными санитарно-противоэпидемическими (профилактическими) мероприятиями, формированием и сохранением популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 у населения в период после пандемии, саморегуляцией эпидемического процесса новой коронавирусной инфекции [2].

По данным ВОЗ с середины февраля 2025 г. по 8 июня 2025 г. количество тест-положительных случаев SARS-CoV-2 до 11%, что не наблюдалось с июля 2024 года (рисунок 3). Наибольший вклад в рост числа случаев вносят страны Средиземноморья, Юго-Восточной Азии и Западной части Тихого океана. В целом, 53 страны Африки, Америки, Европы и Юго-Восточной Азии показали совокупный рост числа новых случаев более чем на 10% [89].

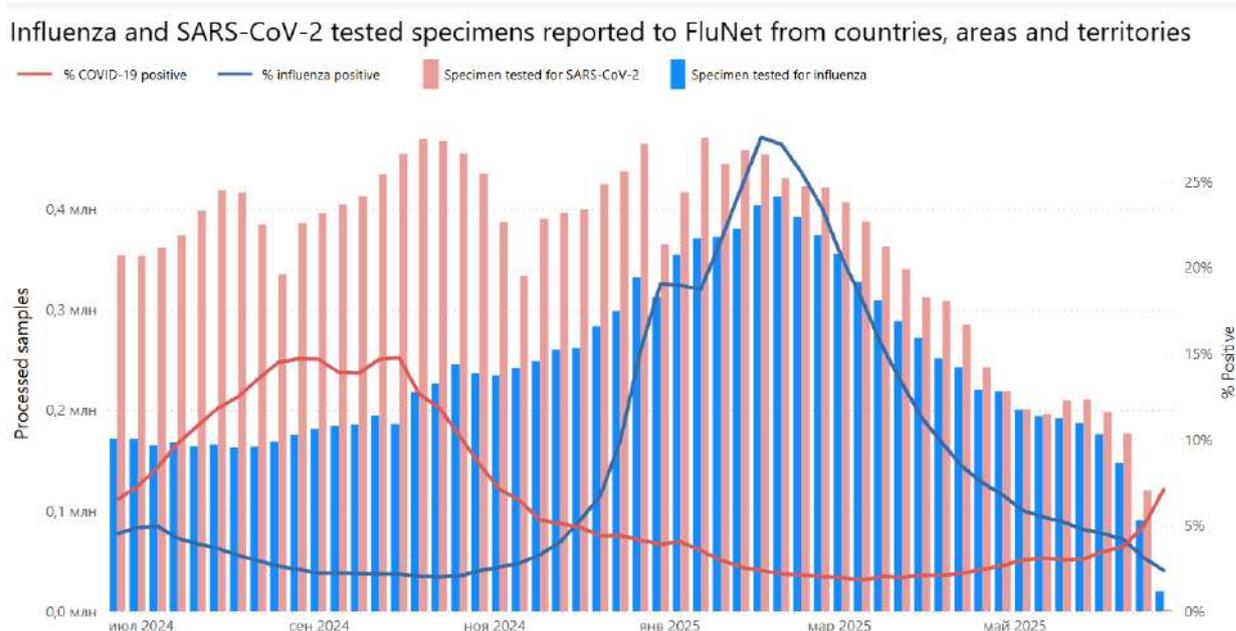


Рисунок 3 – Динамика количества положительных образцов, протестированных на грипп и коронавирус в период с 22.06.2024 по 22.06.2025 по данным ресурса FluNet. Столбчатые диаграммы отражают количество исследованных образцов на вирус SARS-CoV-2 (синие столбцы) и вирусы гриппа (красные столбцы), графики представляют долю положительных образцов, в которых были обнаружены вирус SARS-CoV-2 (синий график) и вирусы гриппа (красный график). По [75] без изменений.

1.2.4. Влияние на общественное здравоохранение

Оценка ущерба от заболеваемости гриппом является сложной задачей, поскольку симптомы неспецифичны, и лишь немногие пациенты с острым респираторным заболеванием регулярно обследуются для вирусологических подтверждений гриппозной инфекции. Однако благодаря подходу с использованием регрессионных моделей, учитывающих огромное разнообразие факторов стало возможным вычисление различных параметров, составляющих ущерб от заболеваемости сезонным гриппом. По данным крупного исследования, проведенного с использованием регрессионных моделей было показано, что уровень смертности от заболеваний, вызванных гриппом за период наблюдений 1990 - 2017 гг был самым высоким в возрастной категории людей старше 70 лет (16,4 случаев на 100 000 населения [95% UI 11,6–21,9]) [251]. Наибольшее количество эпизодов гриппа и госпитализаций случилось среди детей младше 10 лет. И это вполне согласуется с данными исследования ущерба от гриппа в Британии за 2000-2008 гг. У здоровых детей в возрасте до пяти лет был самый высокий уровень госпитализации с гриппом (1,9 на 1000 населения). Наличие сопутствующих заболеваний увеличивало частоту госпитализации в 5,7 раза у детей 5–14 лет (с 0,1 до 0,56 на 1000 населения), относительный риск госпитализации снижался до 1,8 раза у лиц 65 лет и старше (с 0,46 до 0,84 на 1000 населения). Большинство (72%) случаев смерти от гриппа в больнице произошло у лиц старше 65 лет с сопутствующими заболеваниями [56].

В списке экономической значимости некоторых инфекционных заболеваний в Российской Федерации в 2023 году (без учёта туберкулеза, ВИЧ-инфекции и хронических вирусных гепатитов) коронавирусная инфекция занимает второе место, принеся экономический ущерб размером 91,6 млрд руб. Грипп занимает седьмое место, вызвав экономический ущерб размером 7,8 млрд руб [2].

В США центры по контролю и профилактике заболеваний (далее CDC) оценивают ущерб от инфекций, вызванных вирусами гриппа, с 2010 года, используя математическую модель, основанную на данных, собранных через Сетевой надзор за госпитализацией больных гриппом (FluSurv-NET), который охватывает около 9%

населения США [213]. Так, на основе данных, полученных в период с 1 октября 2024 г по 26 апреля 2025 г, в США согласно оценкам данной модели 47-82 млн человек болели гриппом, 21-37 млн – обратились в медучреждения по поводу гриппа, 610 тыс – 1,3 млн – были госпитализированы с симптомами гриппа и 26-130 тыс. человек умерло от гриппа.

На размер ущерба от COVID-19 для общественного здравоохранения влияет множество факторов, в том числе: характеристики циркулирующих вариантов SARS-CoV-2, популяционный иммунитет к циркулирующим вариантам и доступ населения к медицинской помощи, включая профилактические вакцины и противовирусные препараты. Если рассматривать социально-экономический ущерб, нанесённый пандемией COVID-19, то он включает в себя различные негативные последствия, которые повлияли на темпы экономического роста и социальное развитие на региональном, государственном и мировом уровнях [90]. Сокращение экономической активности – одно из таких последствий. Пандемическое распространение SARS-CoV-2 детерминировало глубокую рецессию глобальной хозяйственной системы, выразившуюся в снижении темпов роста мирового ВВП на 4,3%, что сопоставимо с последствиями крупнейших системных кризисов прошлого столетия. В том же году экономика Великобритании пережила самую сильную рецессию за последние 300 лет, показав снижение темпов роста ВВП почти на 11% [195]. Кроме того, наблюдался активный рост безработицы. Международный валютный фонд (МВФ) оценивает потери от пандемии в 12,5 трлн долларов, что сопоставимо с 15% мирового ВВП. По данным ежегодного доклада Роспотребнадзора «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации в 2024 году», в 2024 году COVID-19 принёс экономике России ущерб в размере 91,6 млрд рублей. В 2023 году, ведомство заявляло, что в 2020–2022 годах суммарный экономический ущерб от пандемии коронавируса в России составил более 3,6 трлн рублей. В подсчётах учитывались прямые медицинские расходы и не прямые потери экономики.

Таким образом, можно заключить, что инфекции, вызываемые вирусами гриппа и коронавирусом SARS-CoV-2, наносят огромный урон социально-экономическому положению людей по всему миру, поэтому разработка новых эффективных средств лечения и профилактики данных инфекций является по-прежнему актуальной.

1.2.5. Факторы риска

Большинство людей, инфицированных сезонными вирусами гриппа, переносят заболевание в лёгкой или умеренной форме, не требующей специфического лечения. Однако, некоторые люди переносят это заболевание в тяжёлой форме, требующей специальной медицинской помощи [70]. У некоторых людей повышен риск развития серьезных осложнений после инфекций, вызванных вирусами гриппа. Для таких людей вакцинация от гриппа особенно важна. Согласно клиническим рекомендациям по лечению гриппа во многих странах необходимо незамедлительное лечение противовирусными препаратами людей с повышенным риском серьезных осложнений от гриппа, у которых диагностирован грипп или есть подозрение гриппозной инфекции [198]. Наиболее расширенный список групп людей, подверженных высокому риску тяжелого течения гриппа представлен в СанПиН 3.3686-21 [10]:

- ✓ беременные на любом сроке беременности и женщины в послеродовый период;
- ✓ лица с хроническими заболеваниями легких (бронхиальная астма, ХОБЛ и др.);
- ✓ лица с хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой системы (пороки сердца, ГБ, ИБС с признаками сердечной недостаточности и др.);
- ✓ лица с нарушениями обмена веществ (сахарный диабет, ожирение 2–3 степени и др.);
- ✓ лица с хронической болезнью почек;
- ✓ лица с хроническими заболеваниями печени;
- ✓ лица, с определенными неврологическими состояниями (включая нейромускульные, нейрокогнитивные нарушения, эпилепсию);

- ✓ лица с гемоглинопатиями;
- ✓ лица с первичными и вторичными иммунодефицитами (ВИЧ-инфекция, прием иммунодепрессантов и т.п.);
- ✓ лица со злокачественными новообразованиями;
- ✓ лица в возрасте 65 лет и старше.

CDC помимо вышеперечисленных к группам риска относит лиц, перенесших инсульт, лиц с индексом массы тела (ИМТ) 40 кг/м² или выше, лиц моложе 19 лет, которые длительно принимают препараты, содержащие аспирин или салицилат, и детей младше 2 лет [198].

Существуют категории лиц с наибольшим риском развития тяжёлого течения COVID-19. К ним относятся пожилые люди старше 65 лет, на их долю приходится более 81% смертей от COVID-19, что в 97 раз превышает таковой показатель для людей в возрасте 18–29 лет [199]. Также в группу риска развития тяжелой коронавирусной инфекции относят беременных женщин, людей, проживающих в домах престарелых и приютах, пациентов психиатрических учреждений. Риск тяжелого течения COVID-19 увеличивается по мере роста числа сопутствующих заболеваний, список которых многочисленный: хронические заболевания легких, включая астму, муковисцидоз, диабет, хронические болезни почек, требующие диализа, хронически заболевания печени, цирроз печени, гематологические заболевания (талассемия и серповидноклеточная анемия), злокачественные заболевания, цереброваскулярные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания (недостаточность, ишемическая болезнь сердца, кардиомиопатия), состояние иммунодефицита или ослабленная иммунная система, ожирение (ИМТ более 30), синдромом Дауна, ВИЧ, психические заболевания (шизофрения), хронические неврологическими заболеваниями, генетические или метаболические заболевания детей [212]. Кроме этого, некоторые люди подвержены повышенному риску тяжелого течения болезни или смерти от COVID-19 из-за условий проживания или работы, или из-за трудной доступности квалифицированной медицинской помощи.

1.2.6. Эпидемиологический надзор

В настоящее время Глобальная система эпиднадзора за гриппом и реагирования на него (Global Influenza Surveillance and Response System, далее GISRS) объединяет 144 национальных центра в 130 странах мира, 7 сотрудничающих центров и четыре регулирующих лаборатории [91]. Россия представлена в этой системе двумя национальными центрами, работающими на базе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» и ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России; а также референс-лаборатория по вирусу гриппа птиц А/Н5 на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзор. Также, за последнее десятилетие ВОЗ запускала ряд программ, направленных на противодействие ущербу, наносимому сезонными вирусами гриппа [11].

На территории Российской Федерации эпидемиологический надзор за гриппом и ОРВИ реализуется параллельно двумя методами: рутинным и сигнальным (дозорным) в соответствии с СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней". В систему рутинного эпидемиологического надзора включены 60 территориальных управлений Роспотребнадзора и базовых вирусологических лабораторий, закрепленных за ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава России (50 опорных баз) и Институтом вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (10 опорных баз), охватывающих практически всю территорию страны [13].

Дозорный эпидемиологический надзор за гриппом и ОРВИ введен с эпидсезона 2010–2011 гг. В РФ в дополнение к традиционной системе была введена новая стандартизованная система оперативного клинико-эпидемиологического сигнального надзора, который осуществляется в соответствии с методическими рекомендациями «3.1. Профилактика инфекционных болезней неспецифическая профилактика гриппа и других острых респираторных инфекций. Методические рекомендации МР 3.1.0140-18» [4]. Сбор данных и клинических образцов осуществляют по всем случаям тяжелой острой респираторной инфекции (ТОРИ) в выбранных лечебно-профилактических учреждениях. Цель сигнального надзора

– получить более полную информацию об этиологии и клинико-эпидемиологических особенностях острых респираторных вирусных инфекций, включая грипп. Также система призвана определить контингенты, подверженные высокой степени риска развития тяжёлых форм заболеваний и осложнений.

Глобальный эпидемиологический надзор за коронавирусной инфекцией COVID-19 устроен по принципу взаимодействия государственных систем здравоохранения и международных организаций. Основная ответственность за надзор лежит на ВОЗ, которая координирует работу государств-членов. Временные рекомендации ВОЗ от 7 августа 2020 г. предлагают государствам-членам различные подходы в комплексной организации эпиднадзора, которые включают следующие ключевые мероприятия [206]:

- раннее предупреждение об изменениях в эпидемиологических моделях
- мониторинг тенденций заболеваемости и смертности
- мониторинг нагрузки на систему здравоохранения (работники здравоохранения и ухода, госпитализации и поступления в отделения интенсивной терапии)
- включение стратегического и географически репрезентативного геномного надзора для мониторинга циркуляции известных вариантов, вызывающих беспокойство (VOCs) и обеспечения раннего выявления новых вариантов, вызывающих беспокойство, циркуляции SARSCoV-2 среди животных и изменений в вирусологических моделях.

В Российской Федерации санитарно-эпидемиологический надзор за коронавирусной инфекцией осуществляется в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами 3.1.3597-20 «Профилактика новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» и включает во многом перекликающиеся с глобальными ключевые мероприятия, направленные на предупреждение распространения COVID-19 [10]: мониторинг заболеваемости; слежение за циркуляцией и распространением возбудителя; мониторинг напряженности иммунитета среди переболевших лиц, среди групп риска и среди всего населения;

сбор и анализ полученной информации; эпидемиологическая диагностика; прогнозирование; оценка эффективности проводимых мероприятий; гигиеническое воспитание населения.

Сравнительный анализ эпидемиологических параметров гриппозной и SARS-CoV-2-инфекций свидетельствует о высокой степени генетической и антигенной изменчивости данных возбудителей. Способность вирусов к непрерывной эволюции детерминирует их эффективное уклонение от гуморального и клеточного иммунного ответа, что обуславливает сохранение пандемического потенциала и периодическое возникновение эпидемических вспышек. Регулярная смена доминирующих геновариантов предопределяет сезонный характер подъема заболеваемости. Учитывая риск развития тяжелых осложнений и высокие показатели летальности, данные нозологии наносят существенный социально-экономический ущерб мировому сообществу.

1.3. Диагностика и лечение

Согласно экспертным рекомендациям ВОЗ, диагностика гриппа в амбулаторном звене носит преимущественно презумптивный характер и основывается на анализе манифестных проявлений заболевания без обязательного лабораторного подтверждения этиологического агента, особенно во время повышенной активности гриппа, когда в локальном сообществе циркулируют сезонные вирусы гриппа А и В [119]. Но в периоды низкой активности гриппа или вне эпидемических ситуаций инфицирование другими респираторными вирусами также может проявляться в виде гриппоподобного заболевания (ГПЗ), что затрудняет клиническую дифференциацию гриппа от других заболеваний. Поэтому в таком случае для установления окончательного диагноза требуется применение лабораторного диагностического теста. Лабораторное подтверждение обычно выполняется с использованием прямого обнаружения антигена, изоляции вируса или обнаружения РНК, специфичной для вирусов гриппа, с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР). Быстрые диагностические тесты используются в клинических условиях, однако они обладают меньшей чувствительностью по сравнению с методами ОТ-ПЦР, а их

надежность во многом зависит от условий, в которых они используются [119]. Тем не менее оперативное применение таких тестов сразу после появления симптомов позволяет максимально быстро определить этиологический агент и при необходимости назначить этиотропные лекарственные средства.

Согласно клиническим рекомендациям РФ и недавно пересмотренным временным методическим рекомендациям по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции диагноз COVID-19 диагностика гриппа и новой коронавирусной инфекции COVID-19 у взрослых осуществляется на основании данных эпидемиологического и клинического анамнеза, клинического осмотра, лабораторных и специальных методов обследования и направлена на определение нозологии и клинической формы, тяжести состояния, выявление осложнений и показаний к терапии [1; 4].

Современные методы терапии гриппа, как и других ОРВИ, подразумевают использование как медикаментозных, так и немедикаментозных методов [8]. При неосложненном гриппе и COVID-19 в случаях с низким риском, как правило, предлагается симптоматическое и поддерживающее лечение. Рекомендуются гидратация, необходимая для восполнения потери жидкости организмом во время лихорадки. Нестероидные противовоспалительные препараты могут быть назначены для уменьшения симптомов, включая лихорадку, головную боль и боли в мышцах. Людям из групп высокого риска или с тяжелыми симптомами ВОЗ рекомендует как можно скорее начать лечение противовирусными препаратами.

CDC выделяет несколько групп препаратов для терапии гриппа у человека:

- *ингибиторы нейраминидазы* (это химически родственные противовирусные препараты, которые блокируют вирусный белок – нейраминидазу и обладают специфической активностью против вирусов гриппа как А, так и В, к ним относятся осельтамивир, занамивир и перамивир),
- *кэп-зависимые ингибиторы эндонуклеазы* (препятствуют транскрипции вирусной РНК и блокируют репликацию вирусов гриппа А и В, существует только один одобренный ингибитор эндонуклеазы – балоксавир марбоксил),

- *адамантаны* (воздействуют на белок ионного канала М2 вирусов гриппа А, но не В, в настоящее время адамантаны не рекомендуются для использования в США из-за широко распространенной противовирусной резистентности у циркулирующих сезонных вирусов гриппа А) [249]. За последнее десятилетие было описано несколько человеческих моноклональных антител, которые могут связываться с широким спектром вирусов гриппа А и В и нейтрализовать их. Большинство из этих моноклональных антител направлены против вирусного гемагглютинина (НА), и некоторые из них уже прошли раннюю и среднюю стадию клинических испытаний [169].

Лечение COVID-19 в РФ проводится в подтвержденных и вероятных случаях заболевания в соответствии с протоколами Временных Методических Рекомендаций [1]. Полный список возможных к назначению лекарственных препаратов для этиотропной терапии COVID-19 у взрослых приведен в ВМР, среди них *фавипиравир* (в частности, фиксированная комбинация с глюконатом цинка), *молнупиравир*, *нирматрелвир* в комбинации с *ритонавиром*, *ремдесивир*, синтетическая малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота (*миРНК*) двуцепочечная, *энисамия йодид*, *риамилловир*, *умифеновир* и *интерферон-альфа*. Также в ВМР прописаны алгоритмы этиотропного лечения гриппа в период совместной циркуляции вирусов гриппа и SARS-CoV-2.

Разработка терапевтических препаратов для лечения новой коронавирусной инфекции у людей проводилась в трёх основных направлениях [41]:

- перепрофилирование существующих препаратов – ремдесивир и молнупиравир [166];
- создание новых противовирусных препаратов – терапевтические антитела, пептиды, аптамеры и ингибиторы ферментов [46; 253; 189; 230; 261; 58];
- поиск иммуномодуляторов и мишеней для лекарственных препаратов, которые оказывают воздействие на организм хозяина [110; 112; 236; 243].

Однако эффективность противовирусных препаратов очень сильно зависит от изменчивости вируса в том числе появления устойчивых мутаций, особенно при их широком применении или при появлении новых вариантов SARS-CoV-2.

Большинство клинически одобренных моноклональных антител, изначально обладавших высокой эффективностью при лечении COVID-19, утратили свою актуальность после появления ускользающего от иммунного ответа штамма «Омикрон», у которого значительно снижена восприимчивость к антителам, выработанным к предыдущим штаммам SARS-CoV-2 [116].

Учитывая постоянную эволюцию вирусов и приобретение резистентности к существующим зарегистрированным специфическим противовирусным препаратам остается актуальной разработка новых препаратов, а также совершенствование стратегий вакцинопрофилактики гриппа и коронавируса.

1.4. Профилактика

Неспецифическая профилактика гриппа и новой коронавирусной инфекции представляет собой комплекс мероприятий, направленных на предотвращение распространения инфекции, перечень которых определяется текущей эпидемической ситуацией. К ним относятся: ранняя диагностика и активное выявление инфицированных лиц, в том числе с бессимптомными формами, соблюдение режима самоизоляции; своевременное обращение пациента в медицинские организации в случае появления симптомов ОРВИ; соблюдение правил личной гигиены, применение кожных спиртовых антисептиков, использование средств индивидуальной защиты органов дыхания, проведение дезинфекционных мероприятий и др. [1].

Специфическая профилактика гриппа и новой коронавирусной инфекции осуществляется с использованием зарегистрированных в стране вакцинных препаратов. Вакцинация является наиболее эффективной мерой профилактики вакциноуправляемых инфекций, и в последние годы вакцины против гриппа стали наиболее часто используемыми препаратами этой группы в мире. Вакцинация особенно важна для людей с высоким риском осложнений гриппа и лиц, осуществляющих уход за ними.

В 1947 году неудача вакцины против гриппа, которая была эффективна в 1943/44 и 1944/45 годах, привела к улучшению понимания антигенного дрейфа в циркулирующих вирусах гриппа и важности обновления штаммов вакцины [139].

ВОЗ создала систему GISRS в 1952 году для мониторинга активности гриппа и выявления циркулирующих штаммов [57]. Широкая сеть лабораторий и исследовательских центров играет решающую роль в ежегодном отборе штаммов вируса гриппа для рекомендации соответствующих антигенов в состав вакцины. Фактически всем производителям вакцин дается рекомендация о том, какой антигенный состав, включая два серологических варианта гриппа А и два серологических варианта гриппа В должен использоваться для производства трех- и четырехвалентных вакцин в следующем сезоне [209]. В России национальные центры по гриппу, входящие в сеть ВОЗ, ежегодно отбирают наиболее вероятные штаммы вируса гриппа для включения в вакцину. Выбираются штаммы типов А (H1N1 и H3N2) и штаммы типа В. Выбор основывается на анализе данных о распространении вируса гриппа в предыдущие годы, что позволяет сделать прогноз о том, какие штаммы будут преобладать в следующем сезоне. Отдельные штаммы вирусов, выделяемые региональными центрами, отправляются в Главный центр ВОЗ для проведения антигенного и генетического анализа высокого уровня, который помогает уточнить прогноз и выявить самые актуальные штаммы. Результаты анализа становятся основой рекомендаций ВОЗ о составе вакцины для профилактики гриппа в Северном и Южном полушариях на следующий год. Также в последнее время активно разрабатываются и тестируются статистические методы и техники машинного обучения для математического моделирования перекрёстного иммунитета, позволяющие оперативно выявлять новые антигенные варианты, но несмотря на прогрессивность данного подхода для обучения и тестирования подобных инструментов требуются большие объёмы эпидемиологических данных по гриппу [24; 245; 152; 279]. Возможно, в будущем данные инструменты станут неотъемлемой частью системы эпидемиологического надзора за гриппом. Такая организация всемирного эпидемиологического надзора за гриппом стала основой для эффективного предупреждения эпидемий и пандемий гриппа.

Вакцинопрофилактика сезонного гриппа, как неотъемлемая часть системы эпидемиологического надзора за вакциноуправляемыми инфекциями, осуществляется с использованием разных типов вакцин: живые аттенуированные,

инактивированные (цельновирионные, расщепленные (сплит), субъединичные) и рекомбинантные вакцины [226]. Эффективность вакцинопрофилактики гриппа (или способность вакцин защищать от развития тяжёлых клинических форм и летального исхода) может варьироваться от сезона к сезону. По крайней мере, два фактора играют важную роль в определении вероятности того, что вакцинация защитит человека от гриппа: 1) характеристики прививаемого человека (например, его возраст и состояние здоровья) и 2) насколько хорошо состав вакцин «соответствует» вирусам гриппа циркулирующим в данный сезон в популяции людей [242]. По данным CDC, в сезоны, когда антигенный состав вакцин соответствовал циркулирующим вирусам гриппа, применение вакцины против гриппа снижало риск обращения к врачу ввиду заболевания гриппом на 40–60% [121].

Исследование 2021 г. показало, что среди взрослых людей вакцинация приводит к снижению риска помещения в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) на 26% и снижению риска возникновения смерти от гриппа на 31% по сравнению с не вакцинированными лицами [74]. За период 2010-2012 гг. вакцинация привела к снижению риска помещения детей в отделения ОРИТ вследствие заболевания гриппом на 74% [73], а согласно исследованиям 2017 года вакцинация привела к снижению риска госпитализаций, связанных с гриппом, среди пожилых людей в среднем на 40% за период 2009-2016 [213]. На территории РФ реализуется широкий список вакцин против гриппа – среди отечественных Гриппол® Плюс, Гриппол® Квадривалент (ООО «НПО Петровакс Фарм»), Совигрипп®, Ультравак® (Микроген), Флю-М (ФГУП СПбНИИВС ФМБА), Ультрикс®, Ультрикс® Квадри (ООО «Форт»), среди зарубежных Vaxigrip® (Sanofi Pasteur (Франция) и Инфлювак (Abbott Biologicals B.V.). Они отличаются платформой (расщеплённые, инактивированные, субъединичные и живые), наличием или отсутствием адъювантов и валентностью (трёх- или четырёхвалентные).

По данным Роспотребнадзора в Российской Федерации с увеличением охватов вакцинации с 2004 г наблюдается снижение заболеваемости гриппом (рисунок 4).

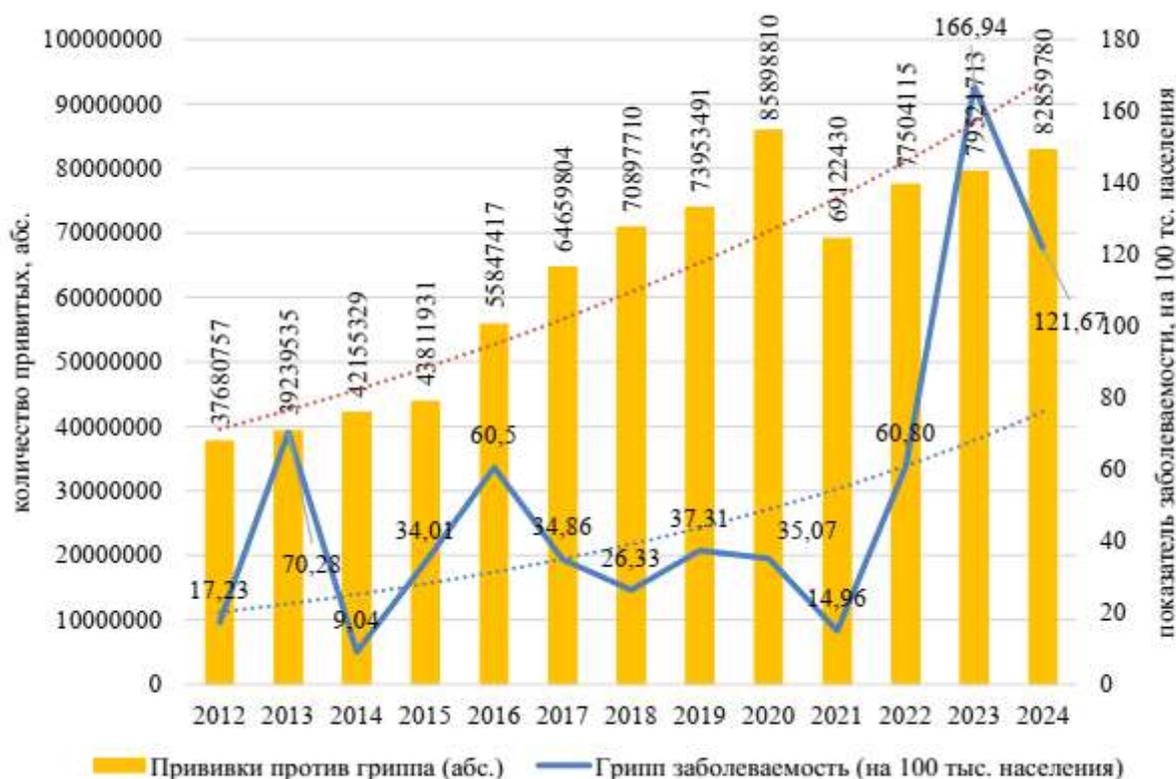


Рисунок 4 – Динамика охвата вакцинацией и заболеваемости гриппом в РФ в период 2012-2024 гг.). По [2] без изменений.

Таким образом, вакцинопрофилактика, вне всякого сомнения, оправдана. Однако важно разрабатывать вакцины с более высоким уровнем эффективности и исследовать новые платформы для увеличения эффективности вакцинопрофилактики гриппа [54]. В 2018 году Национальный институт аллергии и инфекционных заболеваний США (NIAID) предложил план разработки универсальной вакцины против гриппа [70]. Целью разработки вакцин нового поколения является достижение универсальной защиты всех возрастных групп с эффективностью от 75% и длительностью иммунного ответа более года. До сих пор ни одна кандидатная вакцина против гриппа не достигла хотя бы одной из этих заявленных целей.

Вакцинопрофилактика COVID-19 показала высокую эффективность. Так, по данным нового исследования, вакцинация против COVID-19 спасла более 1,4 миллиона человеческих жизней в Европейском регионе [113]. Большинство спасенных – это люди в возрасте 60 лет и старше, то есть представители той возрастной группы, которая подвержена наибольшему риску тяжелого течения заболевания и смерти от вируса SARS-CoV-2. Одни только первые бустерные дозы вакцины спасли 700 000 жизней. Исследование ВОЗ показало, что вакцинация против COVID-19 спасла больше всего жизней в период с декабря 2021 г. по апрель 2023 г., когда в странах преобладал вариант Омикрон. Для профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19 было разработано большое количество вакцин по всему миру на основе различных платформ. Приведённый ниже список включает в себя наиболее известные и широко используемые вакцины, разрешенные в различных странах [52].

Вакцины на основе мРНК:

- Comirnaty (Pfizer-BioNTech) – одна из первых вакцин на основе мРНК, разработана компаниями Pfizer и BioNTech. Широко используется в странах Европы, США и других регионах.
- Spikevax (Moderna) – вакцину разработала компания Moderna. Также основана на мРНК-технологии, используется в США, Европе и других странах.

Вакцины на основе вирусных векторов

- Vaxzevria (AstraZeneca) – разработана компанией AstraZeneca в сотрудничестве с Оксфордским университетом. Эта вакцина использует аденовирус, не вызывающий заболеваний у человека, как вектор.
- Janssen (Johnson & Johnson) – вакцина с однократной схемой вакцинации, основанная на аденовирусе, разработана компанией Johnson & Johnson.
- Спутник V (Гам-КОВИД-Вак)– вакцина, разработана в ФГБУ «НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Это векторная вакцина на основе двух аденовирусных векторов для первой и второй дозы [12].

- Covishield — индийская версия вакцины AstraZeneca, производимая Институтом сывороток Индии.

Вакцины на основе инаktivированных вирусов:

- Ковивак – классическая цельновирионная вакцина, основана на инаktivированном вирусе SARS-CoV-2, разработана в Федеральном научном центре исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова Российской академии наук [12].

- Sinovac (CoronaVac) — инаktivированная вакцина, разработанная китайской компанией Sinovac. Эта вакцина используется в различных странах, в том числе в Латинской Америке, Азии и Африке.

- Sinopharm — инаktivированная вакцина от китайской компании Sinopharm, широко применяется в разных странах.

- Covaxin — вакцина, разработанная индийской компанией Bharat Biotech, использующая инаktivированный вирус.

Другие вакцины

- NuvaXovid (Novavax) — белковая вакцина, разработанная компанией Novavax. Она использует рекомбинантный белок SARS-CoV-2 для стимуляции иммунного ответа.

- Конвасэл – рекомбинантная вакцина нового поколения, содержит другой антиген коронавируса – нуклеокапсидный (N-белок), который является высоко консервативным и остаётся идентичным для всех штаммов вируса.

- ЭпиВакКорона – пептидная вакцина, разработанная в ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Она включает синтезированные пептидные антигены и белок-носитель [12].

Несмотря на то, что созданные вакцины от новой коронавирусной инфекции вызывают сильный первоначальный иммунный ответ, было замечено, что уровень антител снижается в среднем через 73 дня (52–120 дней) [115], что ниже уровня защитного порога. Это важный факт, который учитывался во время волн пандемии, особенно в отношении уязвимых групп населения. Поэтому требуется вакцинация населения бустерными дозами для поддержания защитного иммунитета. Защитный

эффект вакцин для профилактики COVID-19 может снижаться за счёт мутаций в гене S-белка новых вариантов вируса, которые могут влиять на несколько ключевых характеристик вируса, таких как контагиозность и патогенность. Также мутации в антигене вируса могут препятствовать распознаванию его антителами и иммунными клетками, позволяя вирусу ускользать от иммунной системы. Эти мутации в основном возникают спонтанно и подвергаются селективному давлению со стороны иммунной системы хозяина или терапевтических вмешательств [171].

1.5. Особенности иммунитета, формируемые в ответ на перенесенную инфекцию и использование инактивированных и живых аттенуированных вакцин от гриппа

Адаптивный иммунный ответ на инфекцию вируса гриппа весьма сложный и включает реакции гуморального и клеточного иммунитета как на системном, так и на местном уровне. При естественной инфекции, вызванной вирусом гриппа, у человека формируется гетерологичный иммунитет, характеризующийся значительной продолжительностью и широтой спектра действия. Тем не менее, ввиду различных механизмов изменчивости, патоген демонстрирует высокую способность к иммунному ускользанию, что нивелирует эффективность ранее приобретенных защитных механизмов макроорганизма. Несмотря на то, что вакцинопрофилактика остается приоритетной стратегией снижения заболеваемости и предотвращения тяжелых осложнений гриппа, текущие препараты демонстрируют умеренную эффективность в сравнении с другими противовирусными вакцинами. Ограниченная иммуногенность и узкая специфичность формируемого ответа обуславливают его краткосрочный характер, что требует регулярной ревакцинации. Кроме того, по сравнению с естественной инфекцией, инактивированные гриппозные вакцины индуцируют преимущественно системный гуморальный ответ (преимущественно IgG), при этом не обеспечивают формирование эффективного мукозального иммунитета, характеризующегося накоплением специфических секреторных антител класса IgA на слизистых оболочках дыхательных путей [144].

Все белки вируса гриппа потенциально могут быть мишенями для формирования гуморального иммунного ответа, но каждый из них вызывает различные иммунные реакции. Принимая во внимание жизненный цикл вируса становится понятно, какие вирусные белки наиболее доступны для антител и рецепторов В-клеток. Так, не удивительно, что HA, и NA доступны на поверхности вирионов и инфицированных клеток (при этом по количественному присутствию на вирионах у тримеров HA явное преимущество над тетрамерами NA). Дополнительно следует отметить структурную гетерогенность антигена (наиболее изученную на примере гемагглютинина), в пределах которого выделяются домены с различной степенью консервативности. Дифференциация данных локусов позволяет определить наиболее перспективные мишени для разработки универсальных вакцин, способных индуцировать кросс-реактивный и пролонгированный иммунный ответ. Дистальный глобулярный головной домен HA содержит сайт связывания рецептора (RBS – receptor binding site,) вируса гриппа. Антитела к этому домену, как правило, обладают мощной вируснейтрализующей активностью, и эта часть вируса является основной целью гуморального иммунного ответа после вакцинации сезонными вакцинами против вируса гриппа [143]. Тем не менее, глобулярный домен характеризуется выраженной структурной пластичностью и выступает ключевым локусом антигенной эволюции, определяя основную долю вариабельности в рамках антигенного дрейфа патогена [100]. Проксимальный стеблевой домен HA содержит вирусный аппарат слияния. Он относительно консервативен, но является иммуносубдоминантным и поэтому редко формирует антительный ответ у человека [143]. Однако моноклональные антитела против этого домена были выделены у мышей и людей и, как было показано, обладают широким нейтрализующим действием [49; 187; 237; 244]. Эти антитела были способны нейтрализовать различные подтипы вирусов группы 1 (H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17, H18) или группы 2 (H3, H4, H7, H10, H14, H15), причем некоторые моноклональные антитела способны к нейтрализации вирусов обеих групп.

Части ионного канала M2 вируса гриппа А также доступны для взаимодействия с антителами, но в основном на поверхности инфицированных клеток. Также сообщалось об островках нуклеопротеина (NP) на поверхности инфицированных клеток. Кроме того, вероятно, что некоторые внутренние вирусные белки — матричный белок (M1), NP, полимеразы (PB1, PB2 и PA), неструктурный белок 1 (NS1) и ядерный экспортный белок (NEP) становятся доступными для обнаружения иммунной системой в клетках, погибших после заражения вирусом гриппа [143].

Таким образом, не все антигены вируса гриппа одинаково доступны для рецепторов В-клеток и антител. Эти различия существенно влияют на иммунный ответ на вирус. Учитывая определяющую роль антител к гемагглютнину (HA) в формировании протективного иммунитета, изучение поликлонального ответа на данный антиген традиционно проводилось с применением широкого спектра серологических методов. К ним относятся реакция торможения гемагглютинации (РТГА), а также различные модификации микронеutralизации для оценки вируснейтрализующей активности сывороточных антител [263]. Фактически, было показано, что естественная инфекция вызывает сероконверсию у большинства инфицированных людей, что оценивается с помощью РТГА, иммуноферментного анализа (ИФА) и анализа микронеutralизации [151]. Кроме того, очень важно отметить, что иммунные реакции на HA и NA вируса гриппа у людей очень сложны из-за влияния предшествующих воздействий исторически более ранних штаммов вируса гриппа посредством инфекции, либо вакцинации (этот феномен больше известен как антигенный импринтинг или первичный антигенный грех).

После начала заражения вирусом гриппа наивные В-клетки или уже существующие В-клетки памяти активируются путем распознавания вирусных антигенов и взаимодействия с хелперными CD4⁺ Т-клетками. Часть активированных В-клеток быстро дифференцируется в короткоживущие плазмобласты, которые продуцируют первую волну вирусоспецифических антител (сначала IgM, затем IgG или IgA), тогда как другие активированные В-клетки мигрируют в В-клеточные фолликулы вторичной лимфоидной ткани, где в

структурах зародышевого центра происходит созревание аффинитета. У людей первая волна сывороточных антител продуцируется плазмобластами, количество которых достигает пика в крови примерно на 7-й день после иммунизации, если они происходят из В-клеток памяти [276]. Роль плазмобластов заключается в быстром увеличении титров сывороточных антител до защитных уровней. Однако только небольшая часть активированных В-клеток станет долгоживущими плазматическими клетками. Долгоживущие плазматические клетки мигрируют и поселяются в костном мозге, где они вырабатывают антитела. Антитела, секретлируемые этими клетками, формируют и поддерживают в течение долгого времени уровень сывороточных антител, который коррелирует с защитой от инфекции и болезни. Другая часть изначально активированных становится В-клетками памяти [69; 149].

В-клетки памяти также являются долгоживущими, но они не секретлируют антитела и остаются на периферии для иммунного надзора. Как только они сталкиваются с антигеном, они быстро реактивируются и дифференцируются в плазмобласты, которые вырабатывают высокоаффинные антитела (пик приходится на 7-ой дней после иммунизации) [276]. Было показано, что компартмент В-клеток памяти (и плазмобласты, полученные из них) содержит более широкий репертуар антител, включая более высокую распространенность широконейтрализующих антител, чем состав циркулирующих сывороточных антител в межэпидемический период, который, по-видимому, является менее разнообразным [150]. Этот более широкий репертуар дает В-клеткам памяти уникальную способность быстро нацеливаться на штаммы, подвергшиеся дрейфу или шифту, распознавая консервативные эпитопы. Хотя такой иммунный ответ способствует защите от тяжелого течения болезни или смерти, он обычно недостаточно быстро развивается, чтобы предотвратить как заболевание, так и передачу возбудителя окружающим. По мнению некоторых учёных, повышение уровня сывороточных широконейтрализующих и перекрестно-реактивных антител, вырабатываемых долгоживущими плазматическими клетками, находящимися в костном мозге, таких

как те, которые нацелены на домен стебля HA, является конечной целью разработки универсальной вакцины против вируса гриппа [144].

Для вакцинопрофилактики гриппа используются различные типы вакцин, включая живые аттенуированные, инактивированные (цельновирионные, расщепленные, субъединичные), векторные, рекомбинантные и полученные с использованием клеточных культур вакцины [226]. Иммуитет, формируемый вследствие вакцинации, отличается от такового в результате перенесённой инфекции вируса гриппа, а также сильно зависит от типа вакцины [144]. Эти отличия будут рассмотрены далее для основных типов вакцин.

Инактивированные вакцины.

Инактивированные вакцины представляют собой препараты вирусов гриппа, инактивированные и очищенные разными методами. Существует 3 типа инактивированных вакцин – цельновирионные (представляют собой препараты вирусов, инактивированных с использованием формальдегида или β -пропиолактона [219], расщеплённые (представляют собой препараты инактивированных вирусов, дополнительно разрушенных с помощью детергентов или эфира [185], по сути состоят из частей вирусной мембраны, содержащих HA и NA) и субъединичные (представляют собой хроматографически очищенные гликопротеины вирусов гриппа из расщеплённых вирусных препаратов [43]. Цельновирионные инактивированные вакцины в зависимости от метода инактивации относительно хорошо представляют вирусные антигены, сохраняя способность к гемагглютинации, кроме того такие вакцины содержат вирусную РНК, которая может активировать сенсоры врождённого иммунного ответа, такие RIG-I, Toll-подобные рецепторы (TLR3, TLR7 и TLR8) [85], тем самым дополнительно придавая этим типам вакцин эффект адъювантов. При этом для цельновирионных вакцин был показан более высокий уровень реактогенности в сравнении с расщеплёнными и субъединичными вакцинами, в том числе и среди детей [148; 95; 125].

Расщеплённые и субъединичные вакцины показали сопоставимые уровни иммунного ответа (сероконверсия и средние геометрические показатели титров

РТГА) по сравнению с цельновирионными инактивированными [143] при более низкой реактогенности, с чем и связан отказ от цельновирионных инактивированных сезонных гриппозных вакцин в пользу расщеплённых и субъединичных [144]. Однако и у этих вакцин наряду со снижением реактогенности, может наблюдаться снижение иммуногенности ввиду потери адьювантных свойств, а сохранение иммуногенности на прежних уровнях требует увеличения дозы антигенов, что тоже может приводить к повышению рисков возникновения нежелательных явлений. Также, мало известно о структурной целостности антигенов HA и NA в расщеплённых и субъединичных вакцинах и сохранении в них важных иммуногенных эпитопов и конформационных доменов для формирования протективного антительного ответа. Все указанные вакцины могут вызывать образование кросс-реактивных антител к предшествующим (историческим) штаммам вируса у взрослых людей с предсуществующим иммунитетом [77], однако они обычно не вызывают значительных титров кроссреактивных антител, специфичных к стеблевому домену HA, а значит имеют низкий потенциал к формированию широкой нейтрализующей активности в отношении новых штаммов не циркулировавших ранее [163].

Таким образом различные типы инактивированных вакцин от гриппа отличаются особенностями формируемого ими иммунного ответа, снижение реактогенности приводит к снижению их иммуногенности, что требует применения дополнительных адьювантов повышающих реактогенность, их потенциал к формированию широко нейтрализующих антител ограничен.

Живые аттенуированные вакцины.

Сезонные живые аттенуированные вакцины против гриппа были разработаны в СССР (на основе штаммов вируса гриппа A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) и гриппа B/USSR/60/69) и США (на основе штаммов вируса гриппа A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) и вируса гриппа B/Ann Arbor/1/66), и использовались в нескольких странах [19; 159; 158; 232]. Данные вакцины обычно вводятся интраназально и представляют собой вирусы, холодоадаптированные, обладающие температурной чувствительностью (ts), фенотипом аттенуации (att) и генетической

стабильностью [86; 137; 159]. В таких вакцинных штаммах вируса гриппа (реассортантных вирусах) сегменты генов гемагглютинина и нейраминидазы получены из циркулирующих вирусов гриппа, а остальные шесть сегментов генов получены из штамма-донора вакцины, что придает реассортантным вирусам чувствительность к температуре, адаптацию к холоду и фенотип аттенуации. Вирусы живой вакцины реплицируются локально в верхних дыхательных путях, не вызывая клинически выраженного заболевания, и способствуют формированию защитного иммунитета против циркулирующего штамма вируса гриппа. Иммунный ответ, формируемый живой аттенуированной вакциной, многогранен и не всегда приводит к образованию детектируемого уровня сывороточных антител. Так, исследование уровней антител у взрослых людей, вакцинированных живой вакциной показало низкие уровни сероконверсии по РТГА 3-7% (у такой доли всех вакцинированных было отмечено повышение титра РТГА более чем в 4 раза после вакцинации над уровнем до вакцинации) [50]. Однако, живые вакцины были лицензированы на основе исследований эффективности, которые показали эпидемическую эффективность защиты, а не корреляты защиты. При этом у детей живые вакцины могут вызывать реакции сывороточных антител, включая относительно высокие титры РТГА, а также реакции IgA на слизистых дыхательных путей [21; 129;]. Если рассматривать продолжительность иммунного ответа после вакцинации, то в исследовании, в котором проводили прямое сравнение инактивированной живой аттенуированной вакцины от гриппа среди детей, было показано преимущество последней [129]. Через год после вакцинации у детей, вакцинированных живой интраназальной вакциной, наблюдалось значительно меньшее снижение сывороточных титров РТГА ($p = 0,025$) и антител IgG к HA и NA ($p = 0,01$), чем у вакцинированных инактивированными вакцинами.

Несмотря на потенциальную перспективность использования живых вакцин, следует учитывать существующий риск их рекомбинации или реассортации с циркулирующими в популяции вирусами гриппа, что может приводить к непредсказуемым последствиям.

Одним из чрезвычайно значимых феноменов в области вакцинологии гриппа, усложняющих путь учёных к созданию универсальной вакцины от гриппа, является «первичный антигенный грех» (original antigenic sin, OAS) или антигенный импринтинг. Данный феномен был впервые описан Томасом Фрэнсисом в 1960-х годах и относится к концепции, согласно которой первая встреча человека с вирусом гриппа приводит к иммунологическому импринтингу (отпечатку). В результате при встрече с эволюционно более поздним вирусом (новым вариантом антигена) иммунная система может ошибочно идентифицировать антигены нового вируса как антигены первого (старого варианта), что приводит к наработке антител специфических к старому антигену вируса. Проблема заключается в том, что нарабатываемые антитела в больших количествах при этом могут быть хотя и связывающими, но не обладать нейтрализующей активностью в отношении нового варианта вируса [59; 80; 126].

Согласно последним научным представлениям, во-первых, OAS — это универсальное явление, которое отражает базовую работу иммунной системы у мышей, кроликов, хорьков, людей и, вероятно, большинства, если не всех, челюстных позвоночных [284]. Интересно, что есть исследования на мышах и хорьках, показывающие, что антигенный импринтинг сильнее, когда первым воздействием является инфекция, а не вакцинация [31; 140]. Во-вторых, иммунологическая основа данного явления заключается в том, что В-клетки памяти активируются гораздо более низкими концентрациями антигена, чем наивные В-клетки, следовательно, В-клетки памяти активируются слабо перекрестно реагирующими иммуногенами для выработки OAS антител [61]. В-третьих, первичный антигенный грех усугубляется ещё и тем, что В-клетки памяти связывают и без того ограниченные количества иммуногенов, нарушая активацию наивных В-клеток, даже несмотря на то, что последние имеют более высокое сродство В-клеточных рецепторов к иммуногену.

Несмотря на низкую авидность к своему активирующему антигену, OAS-антитела все равно могут оказывать противовирусное действие, если присутствуют в достаточно высоких концентрациях [61]. Клинические последствия первичного

антигенного греха включают эпидемии гриппа, например, было замечено, что люди, родившиеся до 1956 года (перенесшие гриппозную инфекцию во время эпидемии 1956 года), имели худший исход во время эпидемии гриппа 1977 года, вызванной вирусом гриппа А (H1N1), чем молодые люди, впервые подвергшиеся воздействию вируса гриппа [22].

Таким образом, вакцинальная стратегия в идеале должна учитывать эффекты OAS. Новые вакцинные технологии должны быть способными преодолевать антигенный импринтинг, позволяя у иммунологически не наивного населения, множество раз сталкивавшегося с антигенами вируса гриппа в результате вакцинации и перенесенной инфекции, формировать преимущественно протективные антитела и клоны В-клеток, сохраняющие свой потенциал широкого ответа при будущих пандемиях. Одним из потенциальных путей обхода эффекта OAS является фокусирование иммунного ответа на консервативные участки вирусных белков с помощью вакцинации. Доступные животные модели для изучения данного эффекта ограничены. В литературе в основном имеются примеры исследования OAS на мышах, приматах (макаки) или хорьках [170]. Очевидным недостатком подобных исследований является тот факт, что количество последовательных воздействий (вакцинаций или инфекций) ограничено и не может точно воспроизвести ситуацию для взрослого человека, который с момента рождения многократно сталкивается как с вакцинацией, так и с заражением вирусами гриппа [102].

1.6. Доклинические исследования гриппозных вакцин – общепринятые корреляты протекции, оценка кросс-реактивности иммунного ответа на животных.

Несмотря на то, что ежегодная смена штаммового состава традиционных вакцин освобождена от расширенных клинических испытаний безопасности, использование животных моделей сохраняет критическую актуальность при поиске новых технологических платформ и оптимизации иммуногенности. Животные модели сыграли решающую роль в установлении коррелятов защиты для вакцин от гриппа [156]. Неоднократно было показано, что и вакцинация, и естественное

инфицирование вирусами гриппа приводят к сильному врожденному и адаптивному иммунному ответу у некоторых видов животных, включая индукцию интерферонов типа 1, активацию Т-клеток, созревание В-клеток и выработку антител [214]. Поскольку вакцины направлены на индукцию антител к НА, корреляты протективности у человека в первую очередь определялись путем измерения продукции сывороточных антител, специфичных к НА, которые предотвращают связывание с рецепторами сиаловой кислоты [186]. Обычно это измеряется с помощью РТГА. Титр РТГА, превышающий 1:40 рассматривается как коррелят протективности.

Релевантность животной модели может определяться различными факторами (наличие клинических признаков инфицирования, данные, которые можно собрать, затраты и требования к содержанию). В случае с гриппом немаловажным параметром является наличие $\alpha 2,3$ или $\alpha 2,6$ сиаловых кислот на поверхности эпителиальных клеток дыхательных путей животного, при взаимодействии с которыми гемагглютинин (НА) опосредует проникновение вируса в клетки. Вирусы гриппа, которые инфицируют людей, имеют высокое сродство к $\alpha 2,6$ сиаловым кислотам [256]. Сиаловые кислоты дыхательных путей у хорьков и свиней преимущественно являются $\alpha 2,6$, что имеет гомологию с человеческими. У мышей присутствует смесь как $\alpha 2,3$, так и $\alpha 2,6$ сиаловых кислот, причем первая встречается чаще [127]. Эпителиальные клетки верхних дыхательных путей морских свинок в основном содержат $\alpha 2,6$ сиаловые кислоты, а эпителий нижних дыхательных путей – преимущественно $\alpha 2,3$ сиаловые кислоты [238]. В исследованиях гриппа мыши являются наиболее широко используемой животной моделью, а среди инбредных мышей наиболее часто используются C57BL/6 и BALB/c. У инфицированных гриппом мышей развиваются клинические симптомы, такие как потеря веса, недомогание и цитокиновый шторм, в зависимости от линии мышей, штамма вируса и дозы заражения [164]. Потеря веса и выживаемость мышей являются хорошими маркерами тяжести заболевания гриппом. В отличие от людей, у мышей, инфицированных вирусом гриппа, не развивается лихорадка, вместо этого наблюдается гипотермия [282]. Несмотря на значительные

преимущества, встречаются научно-обоснованные сомнения по поводу релевантности использования мышинных моделей для биомедицинских исследований в целом. К ним относятся некоторые различия между иммунными системами мышей и человека, такие как количества лимфоцитов и нейтрофилов в периферической крови, различия в Toll-подобных рецепторах, дефензинах и классах IgG [172]. За исключением высокопатогенных штаммов, таких как пандемический H1N1 (1918 и 2009), H5N1, и нескольких штаммов H7, мыши не заражаются вирусами гриппа естественным образом [164]. Поэтому для моделирования инфекции используются предварительно адаптированные к мышам штаммы вирусов гриппа, которые получают путём множественных последовательных заражений мышей интересующим штаммом вируса [117; 246].

Согласно современным гармонизованным рекомендациям Европейского агентства лекарственных средств (EMA – European Medicines Agency) по доклиническим и клиническим исследованиям гриппозных вакцин иммуногенность должна быть исследована на мелких видах животных, таких как крысы, хомяки, морские свинки, мыши и хорьки [272]. Исследования иммуногенности должны включать оценку гуморальных, а также клеточных иммунных реакций (в зависимости от доступности реагентов) и тестирование диапазона доз антигена. Данные о кросс-реактивности антител рекомендуется получать из серологических исследований с использованием гетерологичных вирусов для пандемических, зоонозных или адъювантных сезонных вакцин. Что касается исследований протективности, то они проводятся для вакцин против гриппа с новыми механизмами действия. Хорьки при этом представляют собой предпочтительную, но не единственную модель для исследования защитного эффекта индуцируемого вакциной иммунитета в условиях заражения вирусом гриппа, поскольку патогенез заболевания, клинические признаки, включая лихорадку, и реакцию иммунитета очень похожи на таковые у человека. Однако и у этой модели есть свои недостатки – особые условия содержания (питомников, в которых проводят работы с хорьками, очень мало в РФ по сравнению с вивариями, работающими с мышами), в виду того, что хорёк более высокоорганизованное

животное согласно принципам гуманного обращения с животными, экспериментальные группы малочисленные (4 - 6 животных), исследования иммуногенности и эффективности требуют наивных животных (статуса SPF) по отношению к гриппу [120].

Таким образом, мышей можно считать вполне подходящей моделью для получения первичных доклинических данных о кандидатных вакцинных препаратах (иммуногенность, способ введения, доза-эффект, кросс-реактивность антител, протективность), однако обязательным этапом в рамках доклинических исследований, предвещающих клинические исследования, является исследование эффективности вакцинного препарата на хорьках в условиях аэрозольного заражения гомологичными вирусами гриппа.

Кросс-реактивность иммунного ответа, вызванного вакцинацией, является важной характеристикой разрабатываемых вакцинных препаратов от гриппа, этот параметр напрямую влияет на эффективность и продолжительность защиты от таких быстро меняющихся вирусов как вирусы гриппа. На данный момент существует несколько стратегий для достижения кросс-реактивности (и как следствие универсальности) иммунного ответа. Два подхода основаны на выработке антител к стеблевому домену НА. Одна из стратегий – вакцинация препаратами, содержащими химерные молекулы гемагглютинина (сНА), которые экспрессируют различные и экзотические домены головки как правило из различных подтипов вируса гриппа, часто из штаммов вируса птичьего гриппа в сочетании с консервативным стеблевым доменом [142; 143]. Повторное воздействие сНА с различными доменами головки может повысить интенсивность формирования антител в отношении консервативного стеблевого домена. Результаты клинических испытаний I фазы кандидатной вакцины на основе живого аттенуированного вируса гриппа, экспрессирующего химерные гемагглютинины, подтвердили её благоприятный профиль безопасности. Препарат продемонстрировал способность индуцировать интенсивный, пролонгированный и функционально активный иммунный ответ широкого спектра, направленный против консервативного иммуносубдоминантного стеблевого домена НА [182].

Другой подход основан на вакцинации препаратами гемагглютинаина НА, лишённого головного домена, которые вызывают специфические антитела против стеблевого домена. В частности, описана разработка на основе частиц вируса гриппа, в которых полноразмерный белок гемагглютинаина был заменен на закрепленный на мембране, вариант лишённый «головки», при этом сохранялся нормальный набор других вирусных структурных белков, таких как нейраминидаза, а также вирусные РНК [98]. Однократное введение такой вакцины вызывало высокие титры антител, которые распознавали более консервативные эпитопы в составе вирусных гликопротеинов. Механизм защиты этих вакцин против стебля НА основан на антителах, которые могут связывать и нейтрализовать вирусы и, в качестве второго уровня защиты, также могут помочь уничтожать инфицированные клетки с помощью эффекторных функций, например, антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) [65]. Стратегии вакцинации против M2e в значительной степени сосредоточены на том, чтобы вызвать мощный ответ путем представления эктодомена M2 как части вирусоподобных частиц или связанных с бактериальными флагеллинами [224], такие вакцины находятся на этапе I-II фаз клинических исследований [181]. Другой подход заключается в использовании векторных, ДНК и мРНК-препаратов, которые приводят к синтезу белкового антигена в больших количествах на поверхности клетки, обеспечивая хорошую цель для В-клеток. В некоторых работах приводятся примеры использования вирусных M1 и NP. Эти белки высоко консервативные, но расположены внутри вириона или внутри инфицированной клетки и не могут быть легко доступны для обнаружения антителами. Однако они содержат сильные эпитопы Т-клеток, а цитотоксические Т-клетки могут обеспечивать защитный иммунитет против заражения вирусом гриппа [20; 28]. Помимо этого, существуют различные исследования пептидных препаратов, которые включают Т-клеточные эпитопы различных белковых антигенов вируса гриппа. Данные препараты проходят апробацию как в качестве монотерапии, так и в комбинации со стандартными сезонными гриппозными вакцинами с целью индукции широкого спектра протективных Т-клеточных реакций [141; 280].

Таким образом, есть различные подходы в разработке вакцин, позволяющие увеличивать кросс-реактивность индуцируемого иммунного ответа, однако на данном этапе говорить об универсальных кандидатных препаратах хотя бы на уровне субтипов рано. Кроме того, разные исследования включают в панель тестируемых гетерологичных антигенов разный набор штаммов, иногда исходя из имеющихся в коллекции штаммов вирусов гриппа. И чаще всего для доказательства наличия перекрёстного иммунитета оценивается потенциал сыворотки нейтрализовать исторически более ранние штаммы по отношению к вакцинному. Это позволяет существенно экономить время и обеспечивать исследования широким спектром антигенных вариантов. Однако такой подход не лишен недостатков, так как, эволюция вируса идёт в «другом» направлении и вероятно более правильно было бы исследовать несколько сезонов «вперёд» созданная вакцина сможет сохранить эффективность от заражения или тяжёлого течения болезни.

1.7. Новые технологии для создания эффективных профилактических препаратов: опыт использования мРНК-вакцин

Традиционно разработки вакцин на основе нуклеиновых кислот опирались на использование плазмидной ДНК и вирусных векторов. Однако их широкое внедрение в клиническую практику ограничивалось рядом факторов: рисками геномной интеграции, неопределенностью периодов экспрессии антигена, вероятностью реверсии вирулентности векторных штаммов, а также развитием выраженного иммунитета к вектору, снижающего эффективность ревакцинации. Перечисленные ограничения обусловили смещение направления исследований в сторону мРНК-технологий. Поскольку платформы на основе мРНК лишены указанных недостатков и не несут риска модификации генома, FDA не классифицирует их как препараты генной терапии, что значительно упрощает их регуляторное одобрение для профилактики инфекционных заболеваний [208]. Помимо благоприятного профиля безопасности, транзиторный характер экспрессии антигена мРНК-платформами обеспечивает точное дозирование

антигенной нагрузки. Это минимизирует риск развития иммунологической толерантности, характерный для систем с длительной персистенцией антигена. Существенным технологическим преимуществом является отсутствие необходимости транспорта мРНК через ядерную оболочку: трансляция происходит непосредственно в цитозоле, что позволяет эффективно трансфицировать неделящиеся или медленно делящиеся клетки, включая профессиональные антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные (ДК) [203].

В настоящее время наибольшую популярность завоевали два основных типа конструкции вакцинных мРНК – не реплицирующаяся и самореплицирующаяся (self-amplifying mRNA – SAM). Обе по составу компонентов максимально близки к типовой мРНК эукариотической клетки и состоят из области открытой рамки считывания (open-reading frame - ORF), кодирующей последовательность целевого антигена, ограниченной 5'- и 3'- нетранслируемыми регионами (untranslated region - UTR), и дополнительно стабилизированной 7-метилгуанозиновым (m7G) 5'-кэпом и 3'-поли (А) трактом. Синтез мРНК осуществляется преимущественно путем транскрипции *in vitro* (IVT) с использованием высокопроцессивных РНК-полимераз (Т7, Т3 или SP6). В качестве матрицы для синтеза применяется линейаризованная ДНК, в структуру которой интегрирована последовательность, кодирующая специфический антиген [123]. После проникновения мРНК или SAM в цитозоль молекулы взаимодействуют с рибосомальным аппаратом, выполняя функцию матриц для трансляции. В ходе последующего биосинтеза целевой полипептид подвергается нативным посттрансляционным модификациям, что обеспечивает формирование функционально активного антигена с корректной третичной структурой (фолдингом). Со временем мРНК в клетках разрушается, под действием большого разнообразия РНКаз в процессе нормального физиологического процесса [193].

Доставка мРНК в клетки-мишени обеспечивает индукцию комплексного иммунного ответа. Гуморальное звено, ответственное за нейтрализацию патогена, активируется при секреции белкового продукта, тогда как клеточный ответ формируется в результате цитозольной трансляции антигена. Последующий

протеасомный протеолиз и транспорт пептидов в эндоплазматический ретикулум обеспечивают их презентацию в комплексе с молекулами МНС-I. Данный каскад завершается экспонированием комплекса на клеточной мембране, что ведет к активации антигенспецифических CD8⁺ Т-лимфоцитов (цитотоксических Т-клеток), способных элиминировать инфицированные клетки [123].

Высокая иммуногенность экзогенной мРНК детерминирована ее распознаванием рецепторами врожденного иммунитета различной локализации (поверхностными, эндосомальными и цитозольными), что инициирует неспецифический воспалительный ответ [17]. Свойство мРНК активировать врожденный иммунитет имеет двойные последствия: выступая в роли адъюванта, оно способствует созреванию дендритных клеток, однако одновременно с этим может подавлять экспрессию антигена, снижая терапевтический потенциал системы [132]. Снижение неспецифической реактогенности мРНК-платформ обеспечивается тремя ключевыми факторами: глубокой очисткой целевого продукта, интеграцией в структуру модифицированных нуклеозидов и подбором оптимальных носителей для формирования стабильных нуклеопротеиновых или липидных комплексов [78; 133; 134; 211].

Важное значение для повышения эффективности трансляции ORF с молекулы мРНК в вакцинируемом организме, а также снижения возможности стимуляции врожденной иммунной системы, играют различные модификации ее структуры, которые будут рассмотрены ниже.

5'кэп-модификация. В клетках эукариот транскрибируемая мРНК (пре-мРНК) подвергается двум значительным модификациям в дополнение к сплайсингу. Во время синтеза структура 7-метилгуанилата, также известная как «кэп», добавляется к 5' концу пре-мРНК через 5' → 5' трифосфатную связь. Этот кэп защищает зрелую мРНК от деградации, а также играет роль в ядерном экспорте и эффективной трансляции [207]. Синтетическая мРНК, имитирующая эукариотическую, может быть кэпирована несколькими способами – ферментативным (пост-транскрипционным) и химическим (ко-транскрипционным). Если предполагается стратегия с посттранскрипционной

модификацией, то для реакции кэпирования используются вирусные кэпирующие ферменты, например, из вируса осповакцины (*Vaccinia virus*) [180]. Кэпирование происходит в две последовательные ферментативные реакции, в ходе которых сначала образуется структура кэп-0, а потом кэп-1. Трансляционная активность РНК с кэп-1 выше, что предпочтительнее для конечного продукта. Однако, для крупномасштабного производства кэпированной мРНК такой способ подразумевает наличие дополнительных этапов в процессе и производство стабильных и охарактеризованных для этого ферментов.

Поэтому помимо ферментативного посттрансляционного метода кэпирования, были разработаны химические методы, добавляющие аналоги кэпа ко-транскрипционно, то есть одновременно с синтезом. Однако обычный кэп-аналог, добавленный во время IVT, может быть включен в последовательность мРНК как в функциональной, так и не функциональной ориентации (перевернутым). На последнее приходится до одной трети молекул мРНК, которые не будут метилированы должным образом, т.к. на 5'-конце будет находиться свободный фосфат. Это приведет к низкой эффективности последующей трансляции мРНК. Для предотвращения подобного сценария был разработан метод ARCA (*anti-reverse cap analogs*). Этот аналог метилируется в положении С3 (ближе к m⁷G), что обеспечивает добавление кэпа только в функциональной ориентации. Трансляция с мРНК, кэпированной ARCA, отличается более выраженной и более длительной экспрессией белка *in vitro* [217; 221]. Но и этот метод кэпирования имеет ряд ограничений: относительно низкая эффективность кэпирования (60-80%); после кэпирования образуется кэп-0; кэп содержит неестественную O'-метильную группу в положении С3, которая может быть распознана как экзогенный мотив; транскрипт мРНК должен начинаться с гуанина. В 2018 году для решения проблем, связанных с ARCA был разработан CleanCap™ - аналог для ко-транскрипционного кэпирования следующего поколения с повышением эффективности этого процесса почти до 90-99% [229].

Модифицированные нуклеозиды. Модификации в транскриптах РНК встречаются очень часто и необходимы для многих биологических процессов [105].

Было идентифицировано более 140 различных типов модификаций во всех видах РНК. При этом наибольшее количество и разнообразие нуклеотидных модификаций было обнаружено в транспортных РНК (тРНК), которые необходимы для эффективной и точной трансляции. Модификация синтетической мРНК альтернативными нуклеотидами, это еще один способ повышения стабильности мРНК и эффективности трансляции с нее. Было показано, что экзогенная синтетическая мРНК, как и в случае мРНК-вакцин, стимулирует врожденный иммунный ответ через различные PAMP рецепторы, такие как Toll-подобный рецептор (TLR)3, TLR7 и TLR8, RIG-I и MDA5 рецепторы, что приводит к индукции интерферона I типа, активации РНКазы L, ингибированию трансляции и воспалению [64; 107; 111; 136; 160]. Для ослабления этого эффекта обычно включают модифицированные нуклеозиды, такие как псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин и другие аналоги нуклеозидов, специфичные для эндогенных мРНК. Для таких синтетических мРНК с модифицированными нуклеотидами показано снижение сигналинга через рецепторы PKR и RIG-I врожденной иммунной системы, что может привести к увеличению количества транслируемого с мРНК белкового продукта [132; 133; 192].

Поли(А)-тракт. Поли(А)-тракты присутствуют почти во всех эукариотических мРНК, за исключением некоторых гистоновых транскриптов млекопитающих. Поли(А)-тракты добавляются в процессе транскрипции в ядре и необходимы для экспорта зрелых мРНК в цитоплазму. Эукариотические транскрипты имеют поли(А)-тракты средней длиной ~200 нт у млекопитающих и ~70 нт у дрожжей [196]. Цитоплазматический поли(А)-связывающий белок (РАВРС) связывает поли(А) и способствует трансляции на 80S рибосоме. Длина поли(А)-тракта влияет как на статус трансляции, так и на стабильность мРНК и функционирует как главный регулятор экспрессии генов в цитоплазме. Соответственно, транскрипт с коротким поли(А)-трактом имеет сниженную способность к трансляции, а также является субстратом для удаления 5'-кэпа (декэпирования). Таким образом, укорочение поли(А)-тракта (деаденилирование) в конечном итоге вызывает репрессию трансляции, а также последующий распад

мРНК. Таким образом, динамическая природа поли(А)-трактов имеет решающее значение для регуляции экспрессии генов [83]. Оптимизация длины поли(А)-тракта в контексте мРНК-препаратов имеет немалое значение. Судя по данным предшествующих исследований [196], для обеспечения стабильности обычно требуется длина примерно в 30 нуклеотидов. И эта минимальная длина соответствует области действия РАВРС. Однако некоторые мРНК стабильны и эффективно транслируются, несмотря на очень короткий (менее 20 нуклеотидов) или отсутствующий поли(А)-тракт, в том числе гистоновые мРНК, некоторые вирусные транскрипты и мРНК с консервативной последовательностью, которая имеет длину поли(А)-тракта 20 нуклеотидами [257; 109; 36]. В контексте синтетических вакцинных мРНК существует два подхода для получения полиаденилированной мРНК – ферментативная стадия полиаденилирования транскрипта посредством фермента полиаденилазы и кодирование поли(А)-тракта в ДНК-матрице (поли(Т)-тракт) [288]. Известно, что закодированные в плазмидной ДНК гомополимерные участки (например, poly(A) рекомбинируют во время репликации в составе клеток *E. coli*. Показано возникновение спонтанных делеционных мутантов во время репликации плазмид, содержащих около 100 пар оснований поли(dA:dT) [205]. Для более длинных поли(А), например 150А, нестабильность слишком высока, чтобы можно было выделить хотя бы один клон [94]. Несмотря на это ограничение, поли(А), кодируемый матрицей, имеет определённые преимущества перед ферментативным полиаденилированием мРНК, такие как определённая и воспроизводимая длина поли(А), что приводит к получению однородного продукта [106]. Хотя ферментативное полиаденилирование мРНК обеспечивает получение достаточно длинных поли(А)-хвостов [205; 37], состав конечного продукта из-за разной длины поли(А)-хвостов сложно контролировать, и поэтому он может не соответствовать нормативным требованиям [268]. Кроме того, используется ещё один способ увеличения стабильности поли(А)-тракта – использование сегментированного поли(А)-подхода, Trepotec et al. удалось значительно снизить рекомбинацию плазмид в *E. coli* без какого-либо негативного влияния на период полураспада мРНК и

экспрессию белка [250]. Один из первых зарегистрированных вакцинных препаратов мРНК для профилактики COVID-19 Pfizer BioNTech, согласно открытой информации, содержит кодируемый в ДНК-матрице сегментированный поли(А)-тракт – A30LA70, где L – это 10-нуклеотидный UGC линкер [278].

Инкапсуляция мРНК в липидные наночастицы. Решение проблемы быстрой деградации мРНК *in vivo* стало возможным благодаря внедрению инновационных систем доставки. Современные носители стабилизируют молекулу мРНК, обеспечивая её сохранность при системном введении, облегчают интернализацию клетками-мишенями и гарантируют высокую скорость высвобождения генетического материала для биосинтеза белка [96]. Наиболее эффективной платформой для инкапсуляции мРНК признаны многокомпонентные липидные композиции. Архитектура таких наночастиц включает основной липидный матрикс и ряд вспомогательных молекул (холестерин, ПЭГ-липиды, фосфолипиды), которые играют ключевую роль в обеспечении структурной целостности препарата, его защите в системном кровотоке и эффективном клеточном захвате (интернализации) [218].

ЛНЧ в основе лицензированных мРНК-вакцин состоят из ионизируемого липида, взаимодействующего с отрицательно заряженной молекулой мРНК, липидов-хелперов (дистеароил фосфатидилхолин (DSPC) и холестерол) и пегелированного липида (липид модифицирован ковалентным присоединением полиэтиленгликоля, ПЭГ-липид). ПЭГ-липид обеспечивает нейтральное гидрофильное покрытие на внешней стороне частицы, а также стабилизирует частицы и предотвращает быстрый системный клиренс [147; 240].

Сборка таких липидных наночастиц, содержащих мРНК, происходит за счет спонтанного их образования в результате быстрого смешивания водного раствора мРНК с низким рН и раствора липидов в этаноле. В кислых условиях молекула ионизированного липида способна связывать протоны, приобретая положительный заряд, что обеспечивает электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженной молекулой мРНК, образуя ядро частицы. DSPC и холестерин достраивают частицу, включая бислойную мембрану, а ПЭГ липид образует

поверхностный слой. Во время диализа удаляется этанол и происходит замена на буфер с нейтральным рН. Нейтральные условия стабилизируют частицы, ионизируемый липид теряет способность к присоединению протонов и поверхностный заряд (z-потенциал) ЛНЧ стремится к нулю (или становится слабо отрицательным) [240].

Механизм проникновения мРНК-ЛНЧ в клетку представляет собой многоступенчатый процесс, основанный на использовании путей эндоцитоза и последующего «эндосомального побега» [108]. После того, как частицы оказываются в системном кровотоке или межклеточном пространстве, они подвергаются воздействию белков плазмы. Ключевым этапом является адсорбция аполилопротеина Е (АроЕ) на поверхности частицы. АроЕ служит эндогенным лигандом, который обеспечивает распознавание наночастицы клетками-мишенями. Комплекс ЛНЧ-АроЕ связывается с рецепторами липопротеинов низкой плотности (LDLR) на поверхности клеточной мембраны. Это запускает механизм классического клатрин-зависимого или макропиноцитозного эндоцитоза, в результате которого наночастица оказывается внутри клетки в составе первичной эндосомы [16]. По мере созревания эндосомы (переход от ранней к поздней эндосоме) происходит снижение внутриполостного рН за счет работы протонных насосов. Это критический момент: ионизируемые катионные липиды в составе ЛНЧ, которые при нейтральном рН были электронейтральны, приобретают положительный заряд (протонируются). Протонированные липиды ЛНЧ вступают в электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженными анионными липидами мембраны эндосомы. Это приводит к формированию небислойных структур (инвертированных гексагональных фаз), дестабилизации и локальному разрушению эндосомальной мембраны и высвобождению мРНК непосредственно в цитозоль. В цитозоле происходит окончательное высвобождение мРНК из комплекса с липидами.

мРНК-платформа позволяет создавать комбинированные или мультивалентные препараты, для одновременной профилактики нескольких инфекций, и таких разработок становится всё больше, и они охватывают не только

вирусные инфекции, но и бактериальные [18; 153; 264; 274]. Комбинированные вакцинные мРНК-препараты фармацевтических компаний Пфайзер (Influenza and COVID-19 Combination) и Модерна (mRNA-1083) находятся на 3 фазе КИ.

Высокая эффективность и коммерческий успех первых лицензированных мРНК-вакцин привели к глобальной интенсификации биомедицинских исследований в данной области. Высокая востребованность технологии послужила катализатором для экспоненциального роста числа новых разработок на основе нуклеиновых кислот.

На текущий момент существует ряд исследований, в которых показана высокая иммуногенность кандидатных мРНК-вакцин от гриппа на животных и людях [23; 194]. Иммунизация мышей мРНК-кандидатной вакциной, содержащей мРНК двадцати гемагглютининов различных вирусов гриппа, привела к образованию продолжительного антительного ответа ко всем 20-ти НА [23]. Мультивалентный препарат показал высокую протективность в экспериментах с заражением вакцинированных животных (мыши, хорьки) штаммами вируса гриппа H1N1 разной степени гомологии с вакцинным, что выразилось в отсутствии гибели среди вакцинированных животных, снижении тяжести болезни и значимо меньшей потере веса по сравнению с контрольной группой. Так же было установлено, что антитела, индуцированные вакциной 20-НА мРНК-LNP, способствуют защите от антигенно-несовпадающих вирусных штаммов посредством ненейтрализующих механизмов, таких как ADCC [23].

Bahl и др. одни из первых показали иммуногенность мРНК, кодирующей гемагглютинины птичьих вирусов гриппа (H7 и H10), упакованной в липидные наночастицы, в рамках первой фазы клинических испытаний [26; 72]. Для данных препаратов на мышах показано 2-5 кратное увеличение титров РТГА на 21-й день после второй иммунизации и данный ответ сохранялся на том же уровне в течение года. Защитный эффект препарата H7-mRNA при заражении вирусом гриппа на мышах наблюдался даже в случае вакцинации животных минимальной дозой (0,4 мкг мРНК на мышь), но сильно зависел от времени заражения после второй дозы вакцины (чем меньше время с момента последней иммунизации, тем более

выраженной была потеря веса у вакцинированных животных и гибель). При оценке иммуногенности препаратов H10- и H7-mRNA на модели нечеловекообразных приматов после однократной инъекции (400 мкг) регистрировались титры антител в РТГА на уровне 1:100–1:1000, в то время как повторная вакцинация обеспечивала достижение пиковых значений 1:100 000. Данные результаты были транслированы в клиническую практику в рамках двух исследований I фазы (общее число участников N=366), где оба вакцинных кандидата продемонстрировали отсутствие значимых побочных эффектов при сохранении высокой антиген-специфической активности [72]. Двукратная внутримышечная вакцинация участников КИ 100 мкг H10-mRNA индуцировала иммунный ответ, уровнем сывороточными титрами в РТГА, превышающим коррелят протекции (1:40) у 100% добровольцев и в реакции микронейтрализации $\geq 1:20$ у 87% участников. Внутримышечное введение препарата H7-mRNA в дозировках 10, 25 и 50 мкг обеспечило достижение защитного титра антител в РТГА ($\geq 1:40$) у 36,0%, 96,3% и 89,7% добровольцев соответственно. Несмотря на выраженный гуморальный иммунный ответ, статистически значимого антиген-специфического клеточного ответа, оцениваемого по уровню продукции IFN- γ в тесте ELISPOT, выявлено не было [72]. Данный результат является несколько неожиданным, так как по другим препаратам хорошо известна способность мРНК индуцировать стойкий клеточный иммунитет [258].

30 июня 2025 г. компания Moderna, Inc. объявила о положительных результатах 3 фазы КИ, в ходе которого оценивалась относительная эффективность вакцины (ОЭВ) против гриппа мРНК-1010, кандидатной вакцины от сезонного гриппа, по сравнению с лицензированной стандартной дозой вакцины от сезонного гриппа для взрослых в возрасте 50 лет и старше [174; 233;]. Вакцина мРНК-1010 достигла самого строгого критерия превышения эффективности, предусмотренного в протоколе, с показателем ОЭВ 26,6% (95% ДИ; 16,7%, 35,4%) в общей исследуемой популяции. Кроме того, высокий показатель ОЭВ наблюдался для каждого штамма вируса гриппа, закодированного в вакцине, включая A/H1N1 (ОЭВ=29,6%), A/H3N2 (ОЭВ=22,2%) и штаммы B/Victoria (ОЭВ=29,1%). Анализ

подгрупп подтвердил стабильно высокую оценку ОЭВ в разных возрастных группах, с учётом факторов риска и статуса вакцинации против гриппа. У участников в возрасте 65 лет и старше показатель ОЭВ составил 27,4%. Таким образом, в рамках клинических исследований доказано преимущество мРНК-вакцины над лицензированной сезонной вакциной от гриппа по эффективности защиты от гриппа.

1.8. Комбинированные препараты для одновременной профилактики гриппа и коронавирусной инфекции

Повышение уровня заболеваемости коронавирусной инфекцией не так тесно связано с сезоном, хотя тенденция на переход к сезонности отмечается [97]. Рост заболеваемости ассоциирован с селекцией штаммов, обладающих способностью преодолевать сформированный ранее иммунный барьер. Наблюдаемая периодичность эпидемических подъемов, превышающая годовую цикличность, указывает на необходимость перехода к протоколам плановой ревакцинации. Данный подход согласуется с ранним опытом применения вакцин, когда практика введения бустерных доз использовалась в качестве основного инструмента поддержания напряженности специфического иммунитета [47; 176; 262]. Доказано, что ревакцинация исходным антигенным составом на основе антигена Ухань обеспечивала защиту от варианта Дельта и ранних вариантов Омикрон [84; 178; 190]. Спустя два года после начала массовой иммунизации препаратами, базирующимися на антигенном профиле исходного штамма (Wuhan-hu-1), возникла необходимость актуализации их состава. В связи с дрейфом вирусных антигенов в течение 2023 года в клинической практике стали применяться обновленные варианты вакцин, включающие антигенный компонент линии ХВВ [235]. В настоящий же момент ВОЗ рекомендует для моновалентных вакцин включать антиген варианта LP.8.1, при этом ранее рекомендованные антигены линии JN.1 (JN.1 или KP.2) остаются подходящими альтернативами, и вакцинацию не следует откладывать в ожидании доступа к вакцинам с составом LP.8.1 [235]. Проблема не регулярной и непонятной для широких слоев смены антигенного состава вакцин

для профилактики COVID-19 привела к резкому сокращению их использования [224].

В настоящее время ряд комбинированных мРНК-препаратов находится на этапе доклинических испытаний [264; 283], в ходе которых на моделях лабораторных мышей были продемонстрированы высокие показатели иммуногенности и протективной эффективности. Параллельно с этим ведущими разработчиками мРНК-платформ – компаниями Moderna и Pfizer-BioNTech – инициированы клинические исследования комбинированных вакцин, предназначенных для сочетанной профилактики гриппа и COVID-19 (в частности, протоколы NCT05375838, NCT06097273 и NCT05596734) [215]. Результаты доклинических исследований этих комбинированных препаратов пока не опубликованы. Разработку комбинированных препаратов проводят и на основе других платформ: субъединичные препараты рекомбинантных белков [110; 128], вирусные векторы [122]. Однако до сих пор нет разрешённого к использованию комбинированного препарата для одновременной профилактики гриппа и коронавирусной инфекции.

Анализ литературы указывает на назревшую необходимость модернизации арсенала средств специфической профилактики гриппа. Приоритетным направлением видится создание вакцин следующего поколения, сочетающих в себе расширенный спектр защитного действия и улучшенный профиль иммуногенности. Новые вакцины должны обладать рядом преимуществ:

- 1) отсутствие мутаций вакцинного антигена выбранного на предстоящий сезон штамма;
- 2) способность при приемлемой реактогенности стимулировать устойчивый иммунный ответ, обеспечивающий формирование антител к консервативным доменам HA;
- 3) способность преодолевать механизмы OAS на фоне преобладающего иммунитета;
- 4) стимулировать выработку долгосрочного широко-нейтрализующего ответа, способного обеспечить защиту в пределах субтипа;

5) используя базовую платформу, позволять создавать комбинированные препараты для одновременной профилактики нескольких инфекций.

Немалое количество работ в направлении изучения иммуногенности кандидатных мРНК-вакцин для профилактики гриппа не способно однозначно ответить на вопрос их соответствия требованиям, перечисленным выше. Выполнение исследований в рамках настоящей диссертации ставило перед собой задачу продвинуться в получении ответов по крайней мере на некоторые вопросы о способности мРНК-платформы обеспечить желательные свойства кандидатных вакцин для профилактики гриппа и коронавирусной инфекции.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Оборудование

В работе использовали следующее оборудование: наборы автоматических пипеток переменного объема фирм Thermo Scientific (Россия), Eppendorf, (Германия); аквадистиллятор (GFL, Германия); система очистки воды Milli-Q® Type 1 (Merck, Германия); боксы биологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С» (ЗАО "Ламинарные системы", Россия); амплификатор CFX96 (Bio-Rad Laboratories Inc., США); ПЦР-бокс (ДНК технология, Россия); термостат твердотельный "Гном" (ДНК-Технологи, Россия); спектрофотометр NanoDrop 2000 (Thermo, США); весы лабораторные Pioneer PA214C, PA2102C (Ohaus Corp., США); мешалка магнитная MR Hei-End (Heidolph, Германия), система флуоресцентной визуализации клеток ZOE™ (Bio-Rad Laboratories Inc., США); pH-метр Mettler Toledo Seven Compact Duo S213 (Mettler Toledo GmbH, Швейцария); система для содержания лабораторных животных IsoCage N (Techniplast, Италия); гомогенизатор Tissue Lyser II (Qiagen, Германия); счетчик клеток автоматический TC20 (Bio Rad Laboratories Inc., США); мультимодальный ридер Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific Inc., США), плащечный ридер Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific Inc., США), система сборки липидных наночастиц Nanoassembler Ignite (Precision NanoSystems, США), термостатируемый шейкер Biosan PST-60HL-4 (SIA BIOSAN, Латвия), флуориметр Qubit®4.0 (Invitrogen, США), генетический анализатор 3500 (Applied Biosystems, США), амплификаторы MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, США) и T100 (Bio Rad, США), прибор для измерения среднего размера наночастиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical), автоклав SANYO MLS-3020U (SANYO Electric Co., Ltd, Япония); центрифуга 5430R (Eppendorf, Германия); центрифуга Allegra X-30R (Beckman Coulter Life Sciences, США) CO₂ инкубатор SANYO MCO-19AIC(UV) (SANYO Electric Co., Ltd, Япония), термостат для пробирок Biosan Bio TDB-120 (SIA BIOSAN, Латвия); анализатор крови Smart V5 Vet ET-00156 (Corway, Китай), морозильники Premium U410-86 (New Brunswick,

Германия), холодильник SANYO Biomedical Freezer (SANYO Electric Co., Ltd, Япония), микропланшетный промыватель (вошер) 405TS (BioTek Instruments Inc., США), водяная баня Biosan WB-4MS (SIA BIOSAN, Латвия), льдогенератор PORKKA KF 45 (PORKKA, Финляндия).

2.1.2 Наборы

В исследованиях использовались следующие коммерческие наборы: набор для линейного клонирования BigEasy® v2.0 (Lucigen, США), набор Gibson Assembly® Ultra (Codex, США), набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing, набор для высокоточной амплификации нуклеиновых кислот 2X Platinum SuperFi Green MasterMix (Thermo Fisher Scientific, США), набор QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Германия), наборы для выделения плазмидной ДНК MiniPrep (Евроген, Россия) или Maxi (Biolabmix, Россия), набор для измерения концентрации ДНК Qubit® dsDNA High Sensitivity Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, США), набор для ПЦР ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген», Россия), набор для экстракции ДНК из агарозного геля QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Германия), набор для определения активности люциферазы светлячка Bright-Glo Luciferase Kit (Promega, США).

2.1.3 Линии клеток млекопитающих

Культуры клеток HEK293, Vero E6 и MDCK были получены из лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Поддержание клеточных культур проводили в полной ростовой среде на основе DMEM (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Индия) с добавлением 2мМ L-глутамина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, при 37°C, в увлажненной атмосфере инкубатора с 5% содержанием CO₂.

2.1.4 Вирусы и антигены

Проведение РТГА с вирусами гриппа осуществляли на базе лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа под руководством профессора, д.м.н. Бурцевой Е. И. (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России) с использованием следующих вирусов:

- H1N1 A/California/07/2019 pdm09,

- H1N1 A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019,
- H1N1 A/Moscow/52/2022,
- H3N2 A/Perth/165/2009,
- H3N2 A/Kansas/14/2017,
- B/Washington/02/2019,
- B/Colorado/06/2017,
- B/Brisben/60/2008

Вирус гриппа, адаптированный к мышам H1N1 A/Victoria/2570/2019 (m.a.) был получен из лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России.

Антигены вируса гриппа для теста РТГА (A/Darwin/9/2021, A/Victoria/2570/2019, A/Wisconsin/588/2019, B/Austria/1359417/2021, B/Phuket/3073/2013) были приобретены в ООО «Компания по производству диагностических препаратов» (Санкт-Петербург, Россия)

Вирусы SARS-CoV-2 использованные для определения титров ВНА в сыворотках мышей и для заражения мышей были получены в лаборатории механизмов популяционной изменчивости микроорганизмов ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России:

- SARS-CoV-2 EG.5.1.1 GISAID EPI_ISL_18543695
- SARS-CoV-2 XBB.1; GISAID EPI_ISL_16053000

2.1.5 Животные

В исследовании использовали конвенциональных животных – самок линии BALB/c (Филиал "Столбовая" ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) и трансгенных мышей F1, полученных от скрещивания трансгенных самцов B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J (Jackson Laboratory, <https://www.jax.org/strain/034860>, статус здоровья SOPF) и нетрансгенных самок C57BL/6 Jmrc (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, статус здоровья SPF). Все исследования на животных одобрены Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол №41 от 6 апреля 2023г.)

2.1.6 Иммунобиологические препараты

В качестве препаратов сравнения в некоторых экспериментах использовали зарегистрированные вакцины от гриппа сезона 2022-2023 (была приобретена в аптечной сети) и коронавируса Гам-КОВИД-Вак Омикрон, которая была получена из Филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Вакцина Ультрикс-Квадри это инактивированная и расщеплённая четырехвалентная вакцина против сезонного гриппа, содержащая антигены 4 штаммов вирусов гриппа (2 типа А и 2 типа В). Вакцина Гам-КОВИД-Вак Омикрон представляет собой векторную вакцину и состоит из двух компонентов: компонент 1 на основе рекомбинантного аденовируса человека 26 серотипа, несущего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 варианта Омикрон, компонент 2 на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа, несущего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 варианта Омикрон.

2.2 Методы

2.2.1 Сборка конструкции ДНК-матрицы для синтеза мРНК

Кодирующие области для люциферазы светлячка (из вектора pGL4.51[luc2/CMV/Neo] (Promega, США), гемагглютинирина вирусов гриппа, спайк белка коронавируса были клонированы в вектор для транскрипции *in vitro* (IVT) на основе линейной бактериальной плазмиды pJAZZ-OK. Для создания линейных конструкций, содержащих открытые рамки считывания целевых генов, был подготовлен универсальный вектор. Для этого точка начала репликации ColE1 была сначала амплифицирована из плазмиды pTZ57R (Thermo Fisher Scientific Inc., США), дополнена сайтом рестрикции SmaI на одном конце и вставлена в pJAZZ-OK с использованием набора для линейного клонирования BigEasy® v2.0 (Lucigen, США) для увеличения числа копий плазмиды. Полученную плазмиду затем расщепляли с помощью SmaI (Sibenzyme, НПО «СибЭнзим», Россия) и собирали с помощью продукта ПЦР, содержащего элементы конструкции мРНК (T7-промотор, 5' UTR НВА1, присоединенный с последовательностью Козака, 3' UTR НВА1 и 100-нуклеотидный сегментированный поли(А)-хвост, за которым следовал сайт BsmBI или BspQI) с использованием набора Gibson Assembly® Ultra (Codex, США). Для поддержания необходимой длины поли(А)-тракта при размножении вектора в

бактериальной культуре поли(А)-тракт был сегментирован: первые 30 аденинов были отделены от последующих 70 спейсером длиной в 10 нуклеотидов. Перед сборкой сайт *Sma*I был вставлен между 5' и 3' UTR с использованием ПЦР с перекрытием с удлинением из шаблона pT7-5'Luc3'-pA. Наконец, после обработки полученной плазмиды ферментом *Sma*I, либо *Fluc*, либо *HA CDS* были клонированы непосредственно между 5' и 3' UTR, также с использованием сборки Гибсона, с удалением сайта *Sma*I в ходе этого процесса. Этапы клонирования и производство плазмид были выполнены с использованием свежеприготовленных *E. coli* BigEasy™-TSA™ Electrocompetent Cells (Lucigen, США). Все процедуры клонирования были подтверждены секвенированием по Сэнгеру с использованием набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США).

Аmplификация нуклеиновых кислот проводилась на приборах MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, США) и T100 (Biorad, США). Высокоспецифичная амплификация фрагментов ДНК проводилась с помощью набора 2X Platinum SuperFi Green MasterMix (Thermo Fisher Scientific, США). Условия амплификации согласно рекомендации производителя. Очистка ПЦР-продуктов для клонирования из агарозного геля проводилась набором QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя.

2.2.2 Накопление и выделение плазмиды

Наращивание клеток *E. coli* проводилось как на жидкой среде 2xYT (Biologix, Китай), так и на твердой среде 2xYT + 2% агар. Для накопления плазмидной ДНК микробиологической петлёй отбирали биомассу штамма-производителя из криопробирки из мастер-банка, рассеивали на чашку Петри с агаризованной средой 2xYT с селективным антибиотиком методом истощающего штриха и инкубировали в течение 16 часов при температуре 37°C для получения отдельных колоний штамма-производителя. На следующий день отбирали единичную колонию штамма-производителя, инокулировали 5 мл жидкой среды 2xYT и инкубировали в течение 2-3 час при 270 об/мин и 37°C. После этого полученной культурой инокулировали 250 мл жидкой культуральной среды 2xYT, далее культивировали в термостатируемом

Полимеразную цепную реакцию проводили в автоматическом режиме на термоциклере T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Реакционная смесь объемом 200 мкл содержала: ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген», Россия), 10 пикомоль каждого праймера и ДНК-матрицу, кодирующую последовательность мРНК с геном репортерного белка люциферазы светлячка или гемагглютинирина вируса гриппа H1N1. До конечного объема смеси доводили стерильной деионизованной водой. Полученную смесь разносили по 20 мкл в 10 микропробирок. Перед запуском поверх ПЦР смеси наслаивали 25 мкл минерального масла. Для обеспечения «горячего старта» фермент Genta HS-UltraSP(U) фьюжн ДНК-полимераза (АО «ГенТерра», Россия) добавлялся под слой минерального масла после достижения в пробирках 95 °С.

Программа амплификации состояла из трех стадий:

1 этап. Получение ДНК из колоний, инактивация примесей – 95 °С - 5 мин (при проведении ПЦР с образцов очищенной ДНК – первый шаг пропускается).

2 этап. Непосредственно ПЦР, 25 циклов:

- денатурация ДНК – 95 °С - 30 сек,
- отжиг праймеров на матрице – 55-60 °С (зависит от праймеров)- 30 сек,
- элонгация – 72 °С - 30-90 сек (зависит от длины ПЦР продукта).

3 этап. Финальная элонгация – 72 °С - 5 мин.

ПЦР смесь собирали из всех пробирок в одну, смешивали и после этого проводили препаративный агарозный гель электрофорез, внося пул образцов в 3 лунки. После визуализации результатов гель электрофореза в УФ-трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Vilber, Франция) , вырезали участки с целевыми фрагментами. Очистка ПЦР-продуктов из агарозного геля проводилась набором QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. В результате данного этапа получили набор ДНК-матриц, готовых для синтеза мРНК с поли(А)-трактом разной длины.

2.2.4 Секвенирование по Сэнгеру

Правильность сборки финальных плазмид и верификация длины поли(Т) тракта подтверждалась секвенированием по Сэнгеру. Для этого использовали

коммерческий набор BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию секвенирования готовили в соответствии с инструкцией производителя. Для очистки продуктов секвенсовой реакции от низкомолекулярных компонентов использовали BigDye XTerminator™ (Applied Biosystems, США). В каждую реакцию добавляли по 45 мкл раствора SAM Solution и 10 мкл реагента XTerminator, помещали пробирки на вортекс 2200 об/мин в течение 30 мин. Затем центрифугировали пробирки 14 000 об/мин в течение 2 минут, вносили по 40 мкл образцов в лунку 96-луночного планшета для секвенирования и помещали её в секвенатор Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США) для проведения капиллярного электрофореза с использованием полимера POP-7™ Polymer (Applied Biosystems, США).

2.2.5 Рестрикция

Для линейаризации плазмидной ДНК использовали эндонуклеазу рестрикции BsmBI-v2 (NEB, США). Плазмидную ДНК подвергали рестрикции в соответствии с инструкцией производителя. Полноту линейаризации плазмиды оценивали методом электрофореза в 0,8-1% агарозном геле. Плазмидную ДНК очищали методом фенол/хлороформной экстракции. Очищенную ДНК ресуспендировали в объёме 30-100 мкл в буфере 10 mM Tris-Cl, pH 8,5, измеряли концентрацию ДНК спектрофотометрически на приборе Qubit®4.0 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием реагентов из коммерческого набора Qubit®dsDNA High Sensitivity Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.6 Получение синтетической мРНК в реакции *in vitro* транскрипции (IVT)

Для проведения реакции *in vitro* транскрипции использовали следующие компоненты:

- ✓ смесь нуклеотидов (Аденозин - 5'- трифосфат (АТР), Гуанозин - 5' - трифосфат (GTP), Цитидин - 5' - трифосфат (СТР) и N1-метилпсевдоуридин-5'-трифосфат (N1-Me-PseudoUTP)) (Биолабмикс, Россия);
- ✓ аналог структуры кэпа1 m7GmAmG (Биолабмикс, Россия);
- ✓ ингибитор РНКаз (Биолабмикс, Россия);

- ✓ пирофосфатаза;
- ✓ T7-РНК-полимераза (Биолабмикс);
- ✓ T7-буфер для IVT;
- ✓ добавочный буфер, содержащий Tween-20 и PEG8000

Реакционную смесь инкубировали при температуре +37°C в течение 120 минут, после чего к ней добавляли 1 мкл ДНКазы + 12 мкл буфера для ДНКазы I (10x) («Синтол», Россия) и смесь инкубировали еще 30 минут. Далее синтезированную мРНК осаждали с помощью хлорида лития. Полученный осадок РНК осадок растворяли в 50-100 мкл DEPC-воды и измеряли концентрацию. Небольшое количество раствора мРНК отбирали для проведения контроля качества методом электрофореза, остальное хранили при температуре -80°C.

2.2.7 Оценка целостности мРНК методом электрофореза в денатурирующем ПААГ 8%

Качество синтезированной в результате IVT мРНК проверяли методом электрофореза в денатурирующем ПААГ 8%. Вначале готовили стоковые растворы компонентов геля, который не полимеризуется при хранении в светонепроницаемой таре на комнатной температуре. Раствор геля состоит из следующих компонентов (на 500 мл): TBE буфер 10X (автоклавируемый), 50 мл; мочевины, 210 г; акриламид, 40 г; бис-акриламид, 2 г; деионизированная вода. Состав буфера TBE (10X), pH 8,3 (на 1 л раствора): трис основной, 108 г; борная кислота, 55 г; ЭДТА натриевая соль, 9,3 г; деионизированная вода. Компоненты смешивали до полного растворения. Раствор фильтровали через фильтр 0,2 мкм. Далее собирали камеру для вертикального электрофореза. Перед использованием тщательно обрабатывали все поверхности и оборудование раствором от РНКаз и 80% этанолом. Также промывали тщательно все камеры, гребенки, стекла и использовали чистые пипетки, обработанные от РНКаз и/или проавтоклавируемые. Буфер для каждого электрофореза готовили новый. Готовили гель: к 10 мл ПААГ 8% раствора добавляли 10 мкл ТЕМЕДа и 100 мкл 10%-ого персульфата аммония (АПС), тщательно смешивали на вортексе в течение 10 секунд и наносили пипеткой на стекло (быстро). Устанавливали гребенку и спустя 30 мин в камеру для

электрофореза вносили буфер 1xTBE, тщательно промывали лунки буфером. Ставили предфорез на 10-20 минут. Затем на льду смешивали 2 мкл MQ + 3 мкл буфера для внесения Фрик (с формамидом (Биолабмикс, Россия) + 1 мкл мРНК. Инкубировали 5 минут при температуре 70°C, после чего инкубировали на льду 3 минуты и вносили в лунки геля. Электрофорез проводили первые 10 минут на 20мА, затем 60 минут - 30 мА, 300 V. По окончании гель окрашивали на качалке с бромистым этидием в течение 10 минут и визуализировали в приборе GelDoc.

2.2.8 Упаковка мРНК в липидные наночастицы

Синтезированные *in vitro* мРНК инкапсулировали в ЛНЧ с использованием процесса быстрого микрофлюидного смешивания раствора мРНК с раствором липидов, растворенных в спирте. Растворы мРНК готовили в ламинарном боксе, предварительно обработав поверхности, перчатки, дозаторы реагентом RNase AWAY™. В процессе приготовления рабочих растворов РНК использовали расходные материалы (пробирки, наконечники) свободные от ДНКаз и РНКаз. Липиды растворяли в 96 % этаноле при молярных соотношениях 46,3:9:42,7:1,6 (ионизируемый липид: дистеароилфосфатидилхолин (DSPC): холестерин: пегилированный липид (ПЭГ-липид)): ионизируемый липид Acuitas (ALC-0315) и ПЭГ-липид (ALC-0159) (Cayman Chemical Company, США). Раствор мРНК в рабочей концентрации готовили смешением воды, свободной от РНКаз и ДНКаз, с удельным сопротивлением 18 МОм*см, 10x цитратного буфера и стокового раствора мРНК. Раствор мРНК смешивали с раствором липидов в объемном соотношении 3:1 (водный раствор: спиртовой раствор), используя микрожидкостное смешивание в системе Nanoassembler Ignite (Precision NanoSystems, США) с использованием картриджа NxGen.

Отношение ионизируемых атомов азота в ионизируемом липиде к количеству фосфатных групп в мРНК (соотношение N:P) равно 6 для каждой композиции. Полученные формуляции подвергали диализу против раствора PBS в диализных кассетах 20 kDa Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 8 часов при слабом перемешивании буферного раствора на магнитной мешалке в холодильной камере при +4°C. По завершению диализа отбирали суспензию

липидных наночастиц из диализной кассеты, фильтровали через 0,2 мкм фильтр Acrodisk (Pall Corporation, США) и хранили препараты ЛНЧ при +4°C до использования.

2.2.9 Оценка размера наночастиц методом динамического светорассеяния (DLS), измерение дзета-потенциала

Средний гидродинамический диаметр (*Z-average size*) липидных наночастиц и дзета-потенциал измеряли с помощью метода динамического светорассеяния с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, США). Готовый препарат разводили в PBS в соотношении 1:50 до финального объёма 1 мл. Переносили разбавленную суспензию частиц в кювету для Zetasizer Nano ZSP, выполняли анализ распределения полученных частиц по размерам методом динамического светорассеяния согласно руководству производителя прибора. По результатам трёх измерений определяли средний размер частиц (*d*), стандартное отклонение от среднего значения и средний индекс полидисперсности (*PDI*). Измерение дзета-потенциала проводили в капиллярной U-образной кювете (DTS1060), значение потенциала рассчитывали на основе трех измерений.

2.2.10 Анализ эффективности инкапсуляции мРНК и измерение концентрации мРНК в готовом препарате

Анализ упаковки мРНК в липидные частицы основан на измерении уровня флуоресценции в результате взаимодействия мРНК с реагентом SYBR Green I (Lumiprobe, Россия) в суспензии наночастиц до их разрушения и после. Для разрушения частиц использовали детергент Triton X-100. Для расчета концентрации мРНК использовали две калибровочные кривые, одна из которых построена на основании данных, полученных при измерении флуоресценции двукратных разведений известного количества контрольной мРНК в ТЕ-буфере, а другая - в Triton X-100/ТЕ-буфере. Каждую стандартную кривую использовали для расчета концентрации мРНК в образце частиц с добавлением Triton X-100 и без, соответственно.

Готовили следующие растворы:

- ✓ 4% раствор Triton X-100 в ТЕ-буфере;

- ✓ разведения суспензии частиц в ТЕ-буфере в объеме 500 мкл (1:80 дважды);
- ✓ 7 двукратных последовательных разведений мРНК с известной концентрацией в ТЕ-буфере, начиная с концентрации 4 нг/мкл. Объем каждого раствора должен быть не менее 250 мкл;

Внести в лунки черного 96-луночного планшета для ИФА (Kirgen, Китай) растворы известных концентраций для построения калибровочной кривой по 50 мкл в 4-х повторах. Схема нанесения образцов изображена на рисунке 5. Добавить в лунки двух первых столбцов 50 мкл ТЕ-буфера.

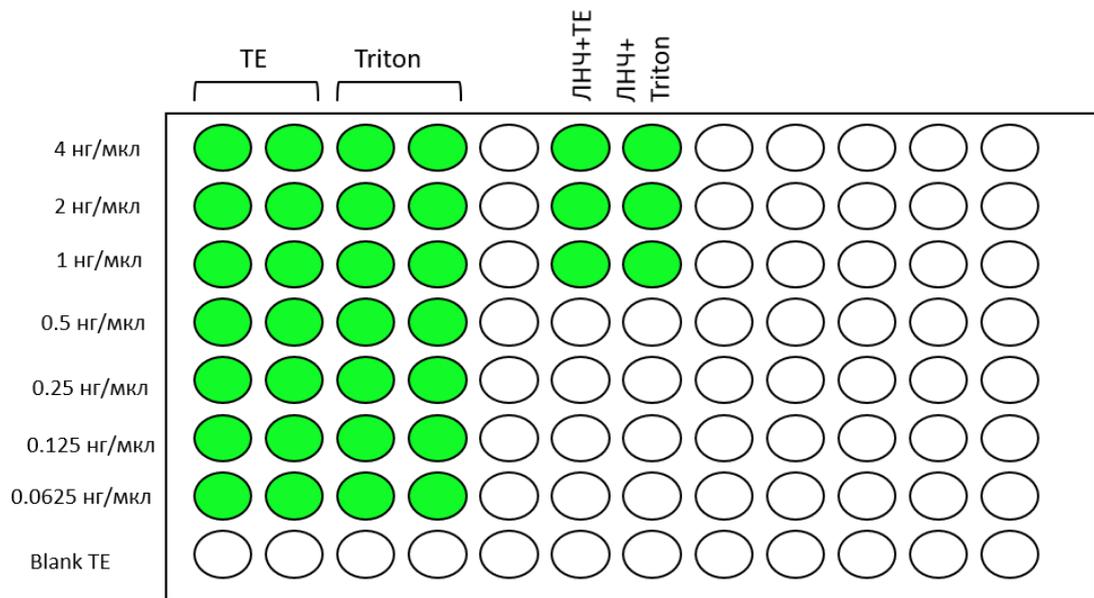


Рисунок 5 – Схема нанесения образцов для измерения эффективности инкапсуляции мРНК в липидные наночастицы.

В первых двух стрипах - точки калибровочной кривой для образцов до разрушения ЛНЧ в двух повторах. Добавили в лунки двух следующих столбцов 50 мкл 4% раствора Triton X-100 в ТЕ-буфере – так получили точки калибровочной кривой для образцов после разрушения ЛНЧ в двух повторах. Наносили на планшет 50 мкл разведения суспензии ЛНЧ в 6 повторах. К трем повторам добавляли 50 мкл ТЕ-буфера (3 повтора до разрушения ЛНЧ), к 3 другим повторам – 50 мкл 4% раствора Triton X-100 (3 повтора после разрушения LNP). Готовили рабочий раствор SYBR Green I 200-кратным разведением стокового раствора в ТЕ-буфере.

Добавляли по 100 мкл раствора SYBR Green I к каждой лунке с нанесенным образцом. Заклеивали планшет пленкой, инкубировали планшет в течение 3 минут с перемешиванием на шейкере на минимальных оборотах. Не допускали попадания раствора Triton X-100 в лунки с ТЕ-буфером. Измеряли флуоресценцию на ридере Varioscan (Thermo Scientific Inc., США) при длине волны возбуждения 490 нм и эмиссии 520 нм (498/522 нм для SYBR Green I). По результатам флуоресценции в программе Excel Office строили две калибровочные кривые для образцов до разрушения ЛНЧ и после разрушения. По калибровочным кривым определяли концентрации мРНК после разрушения ЛНЧ ($C_{\text{РНК}}(\text{Triton})$) и до разрушения ЛНЧ ($C_{\text{РНК}}(\text{TE})$). Концентрацию инкапсулированной в ЛНЧ мРНК определяли как разницу двух концентраций, умноженной на коэффициент разведения (R) исходной суспензии:

$$C_{\text{РНК}}(\text{ЛНЧ}) = (C_{\text{РНК}}(\text{Triton}) - C_{\text{РНК}}(\text{TE})) * R.$$

Эффективность инкапсуляции определяли по формуле:

$$E (\%) \text{ инкапсуляции} = (C_{\text{РНК}}(\text{Triton}) - C_{\text{РНК}}(\text{TE})) / C_{\text{РНК}}(\text{TE}) * 100\%.$$

Эффективность загрузки РНК в LNP рассчитывали по формуле:

$$E (\%) \text{ загрузки} = C_{\text{RNA}}(\text{ЛНЧ}) * V(\text{ЛНЧ}) / m_{\text{RNA}}(\text{исходная}) * 100\%$$

где $C_{\text{РНК}}(\text{ЛНЧ})$ - концентрация мРНК, загруженной в наночастицы, $V(\text{ЛНЧ})$ - финальный объем наночастиц, $m_{\text{RNA}}(\text{исходная})$ – масса мРНК, исходно взятая для формулирования.

2.2.11 Трансфекция клеток препаратами мРНК

Трансфекция мРНК, кодирующей люциферазу, проводилась, как описано ранее [191]. За день до трансфекции, $\sim 3 \times 10^4$ клеток на лунку переносили в белые 96-луночные планшеты FB/HB (Greiner, Австрия) в 100 мкл DMEM (Панеко, Россия) с добавлением 10% FBS (HyClone, США) в присутствии пенициллина и стрептомицина (Панеко, Россия). На следующий день культуру клеток при конфлюэнтности монослоя $\sim 70\%$ трансфицировали репортерной мРНК, предварительно заменив среду на свежую. Для этого 30 нг мРНК в 10 мкл Opti-MEM (Gibco, США) на лунку смешивали с раствором 0,06 мл GenJector™-U (Molcuta, Россия) в 10 мкл Opti-MEM (на лунку), инкубировали в течение 15 мин,

затем добавляли 0,4 мл 100 мМ D-люциферина (Molcuta, Россия) на лунку. Получившуюся смесь добавляли к клеткам по каплям. Измерения люминесценции в реальном времени проводились в течение 23-25 часов в планшет-ридере Varioscan (Thermo Scientific Inc., США), при температуре 37°C (время интегрирования сигнала – 1 ч). В экспериментах были предусмотрены технические повторы, по результатам которых рассчитывали средние значения со стандартным отклонением. Трансфекция клеток культуры НЕК293 препаратом мРНК, кодирующим гемагглютинин вируса гриппа А проводилась по вышеописанной методике, однако, после добавления трансфицирующей смеси клетки были помещены в инкубатор на 18 часов, после чего был проведён иммуоцитохимический анализ.

2.2.12 Иммуоцитохимический анализ клеток

Для анализа экспрессии НА в трансфицированных клетках НЕК293 их фиксировали в 4% PFA (параформальдегид) в течение 30 мин при 40°C, промывали PBS и пермеабелизировали в присутствии 0,1% раствора Triton X-100. Затем клетки инкубировали с первичными козьими антителами против гриппа А в разведении 1:500 (#AB1074 Chemicon®, Sigma-Aldrich, США) в PBS с 0,1%/0,02% BSA/Triton X-100 при 40°C в течение ночи. На следующий день клетки инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой (Donkey Anti-Goat IgG H&L Alexa Fluor® 488, ab150133; Abcam, Великобритания), в разведении 1:1000 в течение 1 ч при комнатной температуре. Ядра окрашивали 300 нМ раствором 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI), 300 нМ. Изображения были получены с помощью системы флуоресцентной визуализации клеток ZOE™ (Bio-Rad, США).

2.2.13 Работа с животными

Животных после поставки из питомника помещали в карантинные помещения для адаптации в лаборатории в течение 7-10 дней до начала экспериментов. При поступлении животных, так же, как и в период адаптации и в ходе эксперимента, проводился визуальный осмотр, который включал: оценку общего состояния животного (удовлетворительное, средней тяжести, тяжелое,

крайне тяжелое); осмотр видимых слизистых оболочек, кожи, шерстного покрова и наличие повреждений.

В исследование отбирали животных без признаков отклонений в состоянии здоровья (после клинического осмотра) с учетом массы тела: разброс массы тела между животными, отобранными в группы, не превышал 10%. При формировании групп животные были распределены в свободном порядке. После распределения по группам животных содержали в клетках по 6-10 особей в зависимости от размера клеток. Животные содержались в условиях, соответствующих СанПиН 3.3686-21 "Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней", и Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г по охране животных.

Для кормления и поения животных использовали: корм полнорационный, сухой гранулированный для лабораторных животных «Чара»- для мышей, крыс, хомяков (СПФ разведение (ООО «Фаворит», Россия), воду водопроводную фильтрованную (Аквафор, Россия). В качестве подстила использовали древесную стружку (ООО «Лабораторкорм»). Эксперименты по заражению вирусами гриппа и коронавируса проводились в помещениях для работы с ПБА 3-4 группы, в боксах 2 класса безопасности. Сразу после заражения животных содержали в условиях ИВК.

2.2.14 Методика прижизненной визуализации активности люциферазы в мышцах

Самки мышей BALB/c, 7 – 8 -недельного возраста, весом 18–20 г были случайным образом распределены по группам. Препараты мРНК-ЛНЧ вводили внутримышечно. Непосредственно перед прижизненной визуализацией биолюминесценции, мышам внутрибрюшинно вводили 2,5 мкг раствора D-люциферина в PBS. Затем, после 5-минутной экспозиции, мышей погружали в сон в камере в атмосфере смеси Изофлурана и кислорода. Запись данных люминесценции проводили с помощью прибора IVIS Lumina II (Life Sciences, США) при биннинге 4×4, и выдержке 30 сек. Для статистического сравнения полученных данных проводили дополнительную работу с файлами с

использованием программного обеспечения прибора. На полученном фото билюминесценции в мышцах, инструментом «Ellipse» для каждой мышцы обводили область билюминесценции (печень и место введения), после чего выгружали данные со значениями тотальной люминесценции, выраженными в фотонах в секунду.

2.2.15 Методика *in vitro* измерения люциферазной активности в гомогенатах органов мышей

Спустя 3 часа после введения исследуемых препаратов мышей подвергали эвтаназии в CO₂-камере и производили отбор органов. Органы помещали в пробирки с PBS и ингибитором клеточных протеаз Protease Inhibitor Cocktail, («Sigma-Aldrich», США), а затем гомогенизировали с использованием лизирующего матрикса 0,7 mm Garnet Bulk Media («Omni International», США). Активность люциферазы светлячков была исследована в гомогенатах органов путем измерения люминесценции с использованием гибридного ридера Synergy H4 (Bio-Tek, США) и набора Bright-Glo Luciferase Kit (Promega, США).

2.2.16 Иммуноферментный анализ сывороток животных

В планшетах для проведения ИФА (96-луночные; Servicebio, Китай) сорбировали антигены (стволовой домен гемагглютинина (miniHA#0049) или головной домен гемагглютинина HA1 или RBD-домен спайк-белка коронавируса штамма Omicron XBB.1 (EVV00331; AntibodySystem, Schiltigheim, Франция) в растворе PBS в концентрации 1 мг/мл (100 мкл/лунка) и инкубировали в течение ночи при 4°C. В день эксперимента в лунки планшета вносили по 110 мкл буфера S002X (Хема, Москва, Россия) и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Необходимые серийные разведения образцов в буфере ELISA S011 (Хема, Москва, Россия) вносили в планшеты в соответствии со схемой эксперимента и инкубировали в течение 1 ч при 37°C (начальное разведение образца 1:10). Затем планшеты инкубировали с раствором конъюгата козьих антител IgG с пероксидазой хрена (L20/01; HyTest, Россия; 1:25000), специфичных к IgG мыши, в течение 1 ч при 37°C. После завершающей отмывки планшета промывочным буфером в каждую лунку добавляли раствор субстрата хромогена R055 (Хема, Москва,

Россия), а затем реакцию останавливали добавлением 100 мМ раствора HCl. Оптическую плотность измеряли при длине волны равной 450 нм с помощью планшетного ридера (Multiscan FC, Thermo Scientific Inc., США). Планшеты промывали 3 раза после первой инкубации и 6 раз после второй инкубации промывочным буфером S008 (Хема, Москва, Россия). Модифицированный тримерный домен HA-стебля (miniHA#0049 вируса гриппа A/Brisbane/59/2007 H1N1) был любезно предоставлен заведующим лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России д.б.н. Д.В. Щербляковым. Данный тример был ранее описан в литературе [118]. Головной домен гемагглютинаина HA (субъединица HA1 вируса гриппа A H1N1 A/California/04/2009) был приобретен (кат. 11055-V08H4, Sino Biological, Китай).

2.2.17 Анализ реакции торможения гемагглютинации (РТГА)

Иммуногенность в экспериментах на животных оценивалась с помощью РТГА в соответствии с протоколом, рекомендованным ВОЗ [55] на базе лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа под руководством профессора, д.м.н. Е.И. Бурцевой (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России). Сыворотки мышей инкубировали с ферментом, разрушающим рецепторы (RDE, Denka Seiken Co., Ltd., Токио, Япония), затем в 96-луночных планшетах производили двукратные разведения обработанных сывороток для тестирования. В лунки добавляли вирусный антиген, после чего планшет инкубировался в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем добавлялись человеческие эритроциты (RBC) типа O, и планшет инкубировался еще 60 минут при комнатной температуре. Если в образце сыворотки присутствовали антитела специфичные к вирусному антигену, это предотвращало реакцию гемагглютинации эритроцитов вирусным антигеном.

После инкубации титр РТГА был определён как самое высокое разведение сыворотки, которое ингибировало гемагглютинацию.

2.2.18 Нарботка вирусов

Нарботку вируса гриппа в куриных эмбрионах или клетках MDCK осуществляли по общепринятой методике, описанной ранее [230]. В питомнике

“Подмоклово” (Россия) были закуплены оплодотворённые куриные яйца, не содержащие патогенов (SPF) возрастом 9-10 дней. Наличие эмбриона контролировалось с помощью яичного сканера. Заражение куриных эмбрионов осуществлялось путем введения вирусной суспензии в аллантоисную полость с помощью иглы. После 2 дней инкубации при температуре 34°C яйца охлаждали не менее 4 часов при температуре 4°C. Затем яичную скорлупу над воздушным мешком и хориоаллантоисную оболочку осторожно вскрывали и собирали аллантоисную жидкость, содержащую вирус. Жидкость очищали от остатков путем центрифугирования, аликвотировали и хранили при температуре -80°C. Титр вируса определяли методом конечного разведения на клетках MDCK.

Вирусы SARS-CoV-2 амплифицировали и титровали на клетках Vero E6, как описано в статье [230]. Образцы SARS-CoV-2, использованные в экспериментах, претерпели три пассажа. Титр вирусов определяли как TCID₅₀ в клетках Vero E6 в 96-луночных планшетах для микротитрования методом конечных разведений. Работа, связанная с вирусами, проводилась в помещениях с высокой степенью биобезопасности 3-го уровня (BSL-3).

2.2.19 Инфекционные модели гриппа и коронавируса на мышах

Постановку инфекционной модели вируса гриппа А на мышах производили путём интраназального заражения вирусом гриппа самок мышей линии BALB/c или B.6Cg-Tg(K18-ACE2) в возрасте 4–5 недель. Заражение мышей проводили интраназально посредством инокуляции 50 мкл вирусной суспензии (по 25 мкл в каждый носовой ход) под анестезией Золетил-Ксилазином. После заражения за животными ежедневно наблюдали в течение 10-15 дней на предмет клинических симптомов инфекции (потеря веса, выживаемость). Оценку клинических симптомов проводили по шкале: 0 баллов (симптомов нет), 1 балл (легкие симптомы), 2 балла (умеренные симптомы), 3 балла (тяжелые симптомы = гуманная конечная точка). Время смерти определялось как время, когда мышь была обнаружена мертвой или подвергнута эвтаназии посредством удушения углекислым газом с последующей дислокацией шейных позвонков в конечной точке.

Инфекцию COVID-19, вызванную SARS-CoV-2, моделировали на 4–5-недельных самках мышей B.6Cg-Tg(K18-ACE2), как описано в статье [35]. Мышей инфицировали интраназально 50 мкл вирусной суспензии (штамм вируса SARS-CoV-2 EG.5.1.1) под анестезией Золетил-Ксилазином. Конечные точки были на 4 и 7 день после заражения с последующей изоляцией легких и сбором крови.

2.2.20 Оценка вирус нейтрализующей активности (ВНА) сыворотки мышей

Титр вируса выражали как TCID₅₀/мл (50% инфекционной дозы в культуре ткани) и определяли по методу Рида и Мюнха. Для исследования ВНА сыворотки от иммунизированных животных последовательно разводили в полной ростовой среде на основе DMEM с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки и смешивали с 1000 TCID₅₀/мл соответствующего варианта SARS-CoV-2 и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После этого к монослою клеток Vero E6 добавляли смеси сыворотки и вируса и инкубировали в течение 96 ч. Цитопатический эффект (CPE) оценивали визуально. Титр нейтрализации определяли как наивысшее разведение сыворотки, ингибирующее развитие CPE по меньшей мере на 80%.

2.2.21 Детекция вирусной РНК в образцах лёгких мышей

Изоляцию лёгких у мышей проводили через 3 дня после заражения гриппом или через 4 и 7 дней после заражения SARS-CoV-2. После этого легкие взвешивали, а затем гомогенизировали в стерильной среде DMEM с добавлением гентамицина в соотношении 1:4. Общую РНК экстрагировали из гомогенатов легких с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Амплификацию и количественную оценку РНК вирусов гриппа А и SARS-CoV-2 проводили с использованием одношаговой методики ОТ-ПЦР, как описано ранее [138]. Праймеры и зонды были разработаны к гену, кодирующий М (матричный белок) вируса гриппа А и NSP1 (лидерный белок) SARS-CoV-2. Олигонуклеотиды были следующими:

для гриппа А:

✓ прямой праймер — 5'- ATG GAG TGG CTA AAG ACA AGA C -3',

- ✓ обратный праймер — 5'- GCA TTT TGG ACA AAG CGT CTA -3',
 - ✓ зонд 5'-FAM — TCC TCG CTC ACT GGG CAC GGT -BHQ1-3'
- для SARS-CoV-2
- ✓ прямой праймер — 5'- GTA CGT GGC TTT GGA GAC TC -3',
 - ✓ обратный праймер — 5'- ACT AAG CCA CAA GTG CCA TC -3',
 - ✓ зонд 5'-Cy5- AGG AGG TCT TAT CAG AGG CAC GTC A -BHQ2-3'.

Аmplификация проводилась с использованием прибора CFX96 Touch в реальном времени (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Условия одношаговой реакции ОТ-ПЦР были следующими: 50°C в течение 15 мин и 95°C в течение 5 мин, затем 45 циклов при 95°C в течение 10 с и 55°C в течение 1 мин. Количество копий вирусной РНК рассчитывалось с использованием стандартной кривой, полученной путем амплификации плазмидной клонированной ДНК-матрицы, содержащей амплифицированный фрагмент.

2.2.22 Гематологическое исследование крови мышей

Для гематологического исследования у мышей отбирали цельную кровь из камер сердца (не менее 0,5 мл) в пробирки с ЭДТА под анестезией. Проведение анализа осуществляли на автоматическом гематологическом анализаторе Smart V5 Vet (URIT Medical Electronic Group Co., Шэньчжэнь, Китай) в соответствии с протоколом производителя. Анализировались количества лейкоцитов (WBC), лимфоцитов (LYM), нейтрофилов (NEU), моноцитов (MON), эозинофилов (EOS), нормобластов (NRBC) и гемоглобина (HGB).

2.2.23 Обработка результатов

Учет и статистическую обработку результатов экспериментов проводили общепринятыми методами с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel, GraphPad Prism версии 9.5.0. Для статистического сравнения групп первоначально проводили оценку нормальности распределения значений с использованием теста Колмогорова-Смирнова. В случае ненормального распределения, несвязанные величины/выборки анализировали с использованием теста Краскела-Уоллиса для множественного непараметрического сравнения с критерием Данна, для сравнения двух выборок использовали t-тест с критерием

Манна-Уитни. В случае нормального распределения величин применяли критерии Тьюки или Шидака для множественного сравнения. Данные по выживаемости в экспериментах с заражением анализировали, применяя тест Мантеля-Кокса с тестом множественного сравнения Данна, а потеря веса сравнивалась с использованием критерия множественного сравнения Тьюки.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Разработка мРНК-платформы, обеспечивающей высокую экспрессию кодируемого белка

В данном разделе описывается решение задач, касаемых разработки мРНК-платформы, а именно исследование влияния компонентов конструкции мРНК на ее трансляционную активность *in vitro* и *in vivo* (кэп-структура, модификации нуклеотидов, длина поли(А)-тракта).

3.1.1. Создание конструкций ДНК-матрицы для синтеза препаратов мРНК

Эффективность экспрессии и стабильность мРНК, а также иммуногенность самой молекулы определяется следующими важными структурными элементами: структурой 5'-кэпа и эффективностью кэпирования, природой 5'- и 3'-нетранслируемых областей мРНК (НТО), оптимизацией кодонов белок кодирующей последовательности, длиной поли(А) тракта, наличием химически модифицированных нуклеотидов.

Дизайн конструкций мРНК, использованных в данной работе был единым за исключением кодирующей белок последовательности, и содержал 5'-кэп, 5'- НТО альфа субъединицы гемоглобина человека (НВА), 3'-НТО НВА, сегментированный поли(А)-тракт (0А – 110А) (рисунок 6).

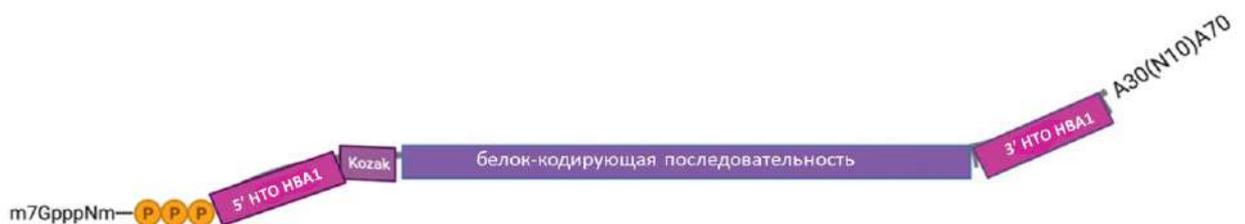


Рисунок 6 – Схематическое изображение дизайна конструкции мРНК

Для получения длинных синтетических мРНК используют *in vitro* транскрипцию с помощью T7 РНК-полимеразы. В качестве матрицы может выступать линеаризованная плаزمиды или ПЦР-продукт. Основную проблему при этом представляет введение поли(А)-хвоста чётко определённой длины, т.к.

наличие такого длинного гомополимерного тракта в составе плазмиды может провоцировать рекомбинацию, “проскальзывание” полимеразы и другие явления, которые приводят к нестабильности его длины при клонировании в клетках *E.coli*.

В ходе разработки платформы были сконструированы два вида ДНК-плазмид – кольцевая и линейная (рисунок 7), содержащие в своем составе все элементы для наработки мРНК со всеми необходимыми структурными элементами.

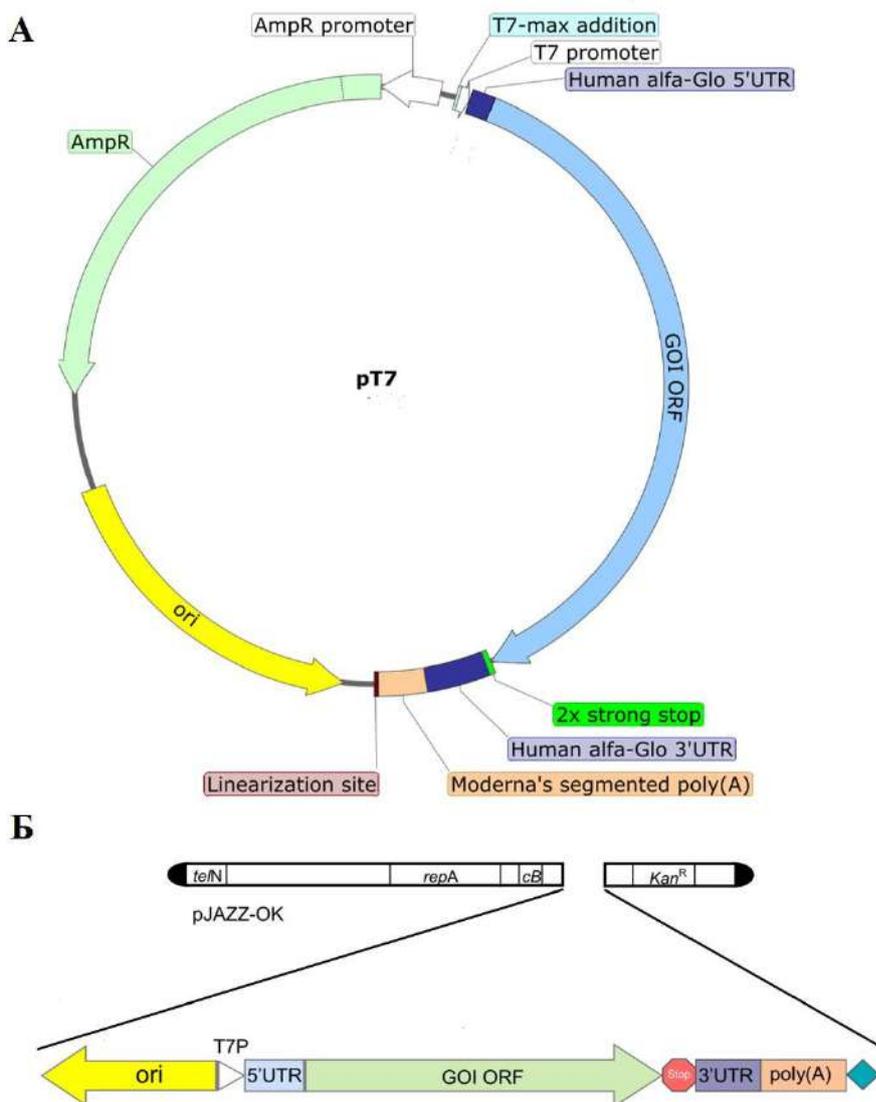


Рисунок 7 – Схемы использованных в работе плазмидных векторов. А – схема кольцевого вектора, Б – схема линейного вектора.

Примечание: Кольцевой вектор - Ori - ориджин репликации плазмиды; AmpR - ген устойчивости к ампициллину; T7 promoter - промотор T7 РНК-полимеразы; Linearisation site - сайт узнавания рестриктазы; Human alpha-Glo 5'-UTR и Human alpha-Glo 3'-UTR – 5' и 3'-некодирующие области мРНК альфа-субъединицы гемоглобина человека соответственно; 2x strong stop - два последовательных

стоп-кодона в конце открытой рамки считывания; *GOI ORF* – открытая рамка считывания гена интереса, *Moderna's segmented poly(A)* – сегментированный поли(А)-тракт.

Кольцевая плаزمида была создана на базе вектора pU6-pegRNA-GG-асцептор (Addgene #132777), линейная – на базе коммерческого линейного бактериального вектора pJAZZ-OK, основанного на геноме N15 бактериофага.

Вектор pJAZZ-OK представляет собой линейную плазмидную систему на основе генома бактериофага N15, созданную для клонирования геномов, для которых характерно большое число повторов. В ходе работы были определены основные преимущества и недостатки использования того или другого вектора (таблица 2).

Таблица 2 – Сравнение линейного и кольцевого плазмидных векторов

Показатель	Кольцевая плазмида	Линейная плазмида
Выход (до рестрикции)	2 мг с 1 л КЖ	1 мг с 1 л КЖ
Затраты эндонуклеазы рестрикции	2,5 U/10 мкг плазмиды	5 U/10 мкг плазмиды
Потери после фенол-хлороформной экстракции	до 50%	до 50%
Целевой продукт в плазмидной ДНК перед IVT	100%	100%
Длина поли(Т) тракта в плазмиде	от 30 до 109 нуклеотидов	110 нуклеотидов
Выход плазмиды на этапе перед IVT	1000 мкг с 1 л КЖ	250 мкг с 1 л КЖ

Примечание: КЖ – культуральная жидкость, IVT – *in vitro* транскрипция.

При работе с линейными плазмидами на этапе клонирования приходится использовать более дорогостоящие реагенты, включая наборы, использующие технологию сборки по «Гибсону» и кюветы для электропорации бактериальных клеток. В целом еще одним из недостатков использования в работе линейного вектора является сниженный выход плазмиды после лабораторной очистки по сравнению с кольцевой плазмидой, содержащей те же функциональные элементы для IVT. В среднем с 1000 мл культуры, выход кольцевой плазмиды составляет до

2 мг, линейной плазмиды – около 1 мг, что является преимуществом первого варианта над вторым. Для рестрикции линейной плазмиды требуется большее количество эндонуклеазы, нежели для кольцевой. Кроме того, молекулярная масса линейных плазмид в общем случае в 4 раза выше по сравнению с аналогичной кольцевой плазмидой, и она содержит в составе некоторых функциональных участков несколько сайтов для рестриктазы *Vsm-ВI*. Вследствие этого пострестрикционная ДНК представляет собой смесь нуклеотидных последовательностей, среди которых целевая только одна и ее не более 50% от общего количества. Учитывая также потери при фенол-хлороформной экстракции, оказалось, что получение ДНК-матрицы с использованием кольцевого вектора выгоднее в четыре раза по сравнению с линейным.

Однако главным преимуществом линейного вектора является способность обеспечивать стабильность и гомогенность поли(А)-тракта, его состав и предусмотренную дизайном длину в 110А, что позволяет отказаться от дополнительной ферментативной реакции полиаденилирования и получать препарат мРНК с постоянной и известной длиной поли(А)-тракта. Этот фактор является ключевым при выборе линейного вектора в качестве матрицы для синтеза некоторых мРНК, например кодирующей S-белок коронавируса SARS-CoV-2.

Последовательности генов, кодирующих антигены вирусов гриппа и коронавируса, а также люциферазу светлячка были клонированы в единый вектор pJAZZ-OK. Однако на этапе отбора клонов *E. coli* с необходимой длиной поли(А)-тракта в случае конструкций, кодирующих гемагглютинины вирусов гриппа, не удалось отобрать клоны *E. coli* с длиной поли(А) 110А, предусмотренной дизайном. Было принято решение отобрать клоны с максимальной длиной из всех изученных. В таблице 3 приведены характеристики плазмид отобранных для дальнейшего получения ДНК матрицы для синтеза мРНК.

Таблица 3 – Характеристика плазмид для синтеза мРНК

Белок	Плаزمида	Штамм <i>E. coli</i> , клон	Селективный антибиотик	Размер фрагмента, кодирующего мРНК, п.о.	Длина поли(А)- тракта
Люцифераза	pJAZZ- OK	TSA	канамицин	1949	110А
HA-H1N1	pJAZZ- OK	TSA	канамицин	1967	80А
HA-H3N2	pJAZZ- OK	TSA	канамицин	1967	80А
HA-B(V)	pJAZZ- OK	TSA	канамицин	2014	80А
HA-B(Y)	pJAZZ- OK	TSA	канамицин	2021	80А
Spike	pJAZZ- OK	TSA	канамицин	4106	110А

Все полученные клоны, прошедшие контроль секвенированием и содержащие все необходимые элементы, были депонированы в лабораторную коллекцию для хранения и дальнейшего использования. Каждый лот плазмиды проверяли в агарозном гель-электрофорезе на предмет а) целостности и соответствия размеру, предусмотренному дизайном конструкции, б) белкового загрязнения (A260/A280). Этап рестрикции целевого фрагмента контролировали электрофорезом в агарозном геле проб плазмиды до и после рестрикции.

3.1.2. Получение и характеристика мРНК-ЛНЧ препаратов

Все препараты мРНК были получены в процессе разработанного в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» лабораторного регламента, основные этапы которого описаны в разделах 2.2.6 - 2.2.10. После *in vitro* синтеза препарат мРНК проверяли на предмет целостности, используя метод электрофореза мРНК в

полиакриламидном геле (ПААГ), как описано в разделе 2.2.7. На рисунке 8 приведены результаты электрофореза в ПААГ мРНК-препаратов, кодирующих гемагглютинины вирусов гриппа.



Рисунок 8 – Пример результата ПААГЭ препаратов мРНК после синтеза *in vitro*. В лунках №1,2 – Н1-мРНК, 3,4 – Н3-мРНК, 5 – ВV-мРНК, 6 – ВУ-мРНК. Гель окрашен бромистым этидием, визуализация проводилась с помощью прибора Gel-Doc.

Для упаковки в ЛНЧ принимались пригодными только те препараты мРНК, которые по результатам ПААГЭ показали отсутствие деградации (визуальное отсутствие полос с меньшим молекулярным весом). Для всех препаратов мРНК-ЛНЧ, полученных в результате микрофлюидного смешивания были измерены физико-химические показатели частиц (размер, заряд, индекс полидисперсности (PDI), концентрация включённой в ЛНЧ мРНК, эффективность инкапсуляции). Согласно проведённому анализу всех препаратов составлена таблица с их характеристиками (таблица 4).

Таблица 4. Физико-химические характеристики препаратов мРНК-ЛНЧ

	Fluc- мРНК (n=8)	H1- мРНК (n=7)	H3- мРНК (n=7)	B(V)- мРНК (n=6)	B(Y)- мРНК (n=5)	Spike- мРНК (n=6)
Размер, нм	72,43 ± 1,9	70,96 ± 3,85	71,39 ± 2,56	70,73 ± 2,76	71,12 ± 2,34	74,85 ± 1,78
PDI	0,112 ± 0,025	0,113 ± 0,011	0,122 ± 0,016	0,114 ± 0,015	0,115 ± 0,015	0,115 ± 0,014
c(мРНК), мкг/мл	96,43 ± 8,9	89,57 ± 17,21	98,00 ± 9,06	89,17 ± 21,24	86,40 ± 9,45	90,33 ± 8,31
Дзета потенциал, мВ	-6,96 ± 2,13	-9,89 ± 2,59	-9,49 ± 2,62	-8,12 ± 1,69	-7,80 ± 1,68	-7,34 ± 1,93
Эффективность инкапсуляции, %	85,4 ± 4,51	84,71 ± 6,47	84,86 ± 4,45	84,83 ± 7,76	84,0 ± 6,04	86,33 ± 4,23
Эффективность упаковки, %	68,29 ± 14,21	53,83 ± 15,21	59,83 ± 6,85	52,40 ± 13,41	52,25 ± 10,01	53,6 ± 7,6

*Примечание: значения параметров в таблице представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение, n – размер выборки препаратов.

Размер частиц мРНК-ЛНЧ не превышал 100 нм. Данный параметр, согласно данным литературы, влияет на эффективность трансфекции клеток в макроорганизме [44; 99]. Кроме того, важно, что размер частиц оказался высоко воспроизводимый, величина стандартного отклонения от среднего не превышала 5,4%. Величина индекса полидисперсности (PDI) характеризует ширину профиля распределения размеров липидных наночастиц, чем ниже этот показатель, тем более однородные по размеру получились ЛНЧ. Считается, что допустимым диапазоном для величины данного показателя является 0,05-0,20. Как видно из таблицы 3, средняя величина PDI для всех препаратов была меньше 0,116, что

указывает на равномерное распределение ЛНЧ по размеру. Величина дзета-потенциала для исследованных препаратов находились в диапазоне от -10 до -4 мВ, что свидетельствует об их нейтральном поверхностном заряде. Концентрация включённой мРНК – параметр, на основе которого происходит расчёт объёма вводимой дозы препарата на животное. Соответственно, допускается, что от лота к лоту эта характеристика может меняться в случае лабораторных, исследовательских серий препарата.

Для полученных в рамках данной работы препаратов наибольшим разбросом обладали препараты В(V)-мРНК (таблица 4), стандартное отклонение для которых составило 21,24 мкг/мл (около 23% от средней концентрации данного препарата). Эффективность инкапсуляции отображает количество включённой в ЛНЧ мРНК по отношению к мРНК вне ЛНЧ в финальном препарате, для полученных препаратов наблюдались довольно высокие показатели эффективности инкапсуляции в среднем превышающие 84%.

Эффективность упаковки – параметр, который показывает, какое количество мРНК находится внутри ЛНЧ по отношению к общему количеству мРНК, взятому в упаковку. По данному параметру можно отметить, что лабораторные исследовательские серии препаратов характеризуются потерями мРНК в процессе изготовления препарата максимально до 60%, средняя эффективность упаковки по препаратам от 52,25% до 59,83% (таблица 4), согласно литературным данным полученные нами величины даже превосходят таковые, полученные в других исследованиях ($EE_{input}\%$ для мРНК длиной 1929 оснований составил 35-45%) [223]. При масштабировании производства препаратов мРНК-ЛНЧ важно учитывать это и производить ряд оптимизаций технологического процесса для снижения величины потерь.

3.1.3. Исследование влияния компонентов *in vitro* синтеза мРНК на экспрессию репортерного белка люциферазы светлячка

Выбор модифицированных нуклеотидов

Модифицированные нуклеотиды используются в изготовлении мРНК-препаратов как на лабораторном уровне в научных исследованиях, так и при

производстве мРНК-вакцин (наиболее известным является N1-метил-псевдоуридин с момента получения мРНК-вакцин от коронавируса). Модификации оказывают влияние как на выходы реакции транскрипции, так и на трансляцию белка с мРНК в условиях *in vitro* экспериментов на клетках, при этом препараты мРНК с некоторыми из них демонстрируют токсичность [234].

Для проведения нашего исследования из компонентов для мРНК синтеза нам были доступны несколько различных модификаций нуклеотидов, включая 3 модификации уридина (TPU – псевдоуридин, TNP – N1-метил-псевдоуридин, TMOU – 5-метоксиуридин), аденозина - N6-метиладенозин, и цитидина - 5-метилцитидин. Для оценки влияния модификаций нуклеотидов на выход IVT реакции, а также уровень трансляции закодированного в мРНК репортерного белка люциферазы светлячка, были синтезированы препараты мРНК с перечисленными модификациями и их сочетаниями, при этом модифицированным основанием заменялось 100% основания в IVT смеси. Для получения контрольного препарата использовали немодифицированные нуклеотиды (аденозин, уридин, цитидин и гуанозин). В результате получили отличия по количеству целевой мРНК по отношению к количеству затраченной на ее получение ДНК-матрицы (рисунок 9). Все протестированные варианты модификации демонстрируют снижение выхода мРНК по сравнению с немодифицированной мРНК (вариант U на рисунке 9).

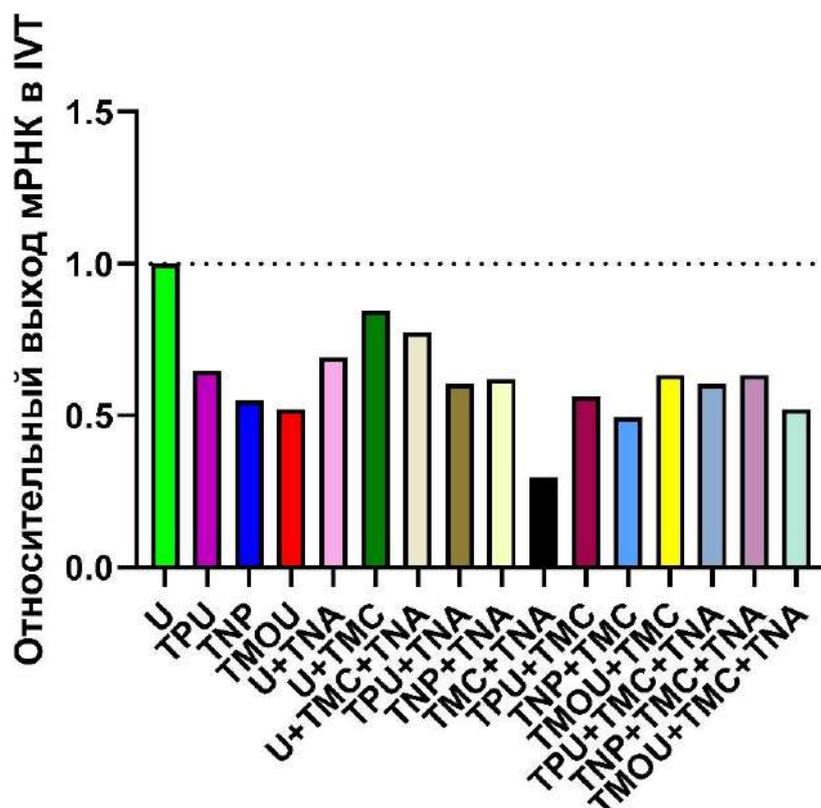


Рисунок 9 – Относительный выход мРНК, полученных в реакции *in vitro* транскрипции с различными вариантами модифицированных нуклеозидов и их сочетаний, к выходу немодифицированной мРНК, где U – уридин, TPU – псевдоуридин, TNP – N1-метил-псевдоуридин, TMOU – 5-метоксиуридин, TNA – N6-метиладенозин, TMC – 5-метилцитидин.

На рисунке 9 представлен относительный выход, нормированный по выходу немодифицированной мРНК (вариант U). Этот вариант показал наибольший выход по сравнению с остальными вариантами, что ожидаемо. В то время как вариант мРНК TNP (с заменой уридина на N1-метил-псевдоуридин) показал снижение выхода на 50% относительно варианта не модифицированной мРНК.

Клетки культуры НЕК293 были трансфицированы полученными препаратами мРНК. В результате трансфекции было показано, что не все модификации и их сочетания приводят к эффективной трансляции (рисунок 10).

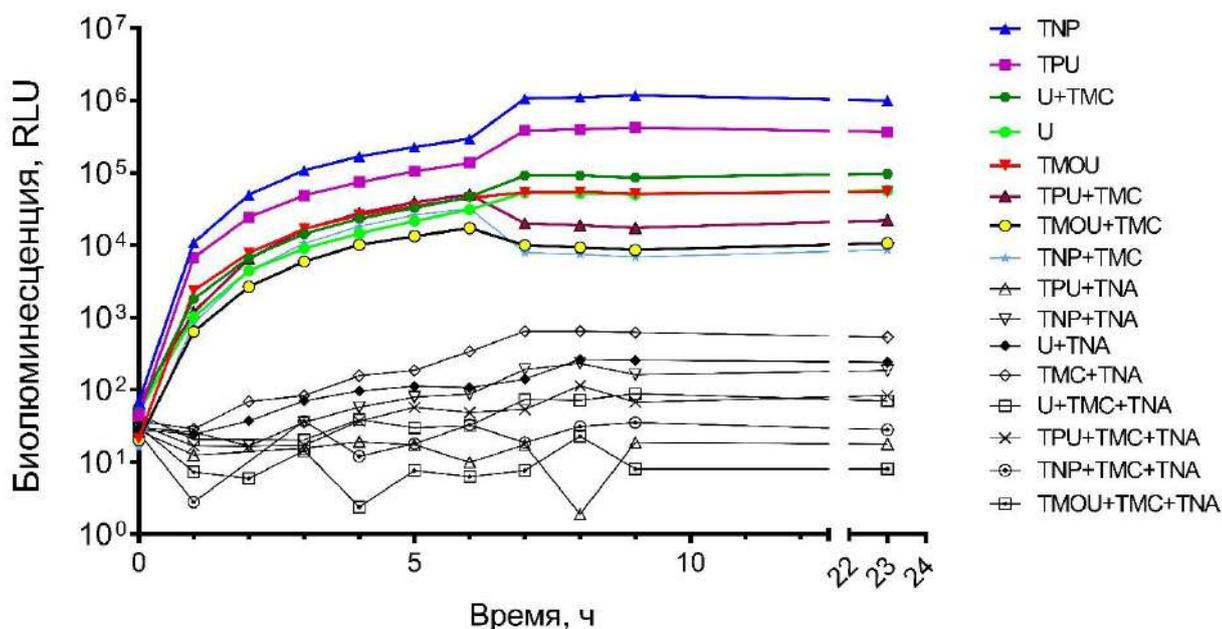


Рисунок 10 – Оценка трансляции репортерного белка с мРНК, синтезированной с различными модификациями. На графиках приведены значения среднего арифметического от трёх повторностей для каждого из препаратов.

*Примечание: обозначения нуклеотидов – U – уридин, TPU – псевдоуридин, TNP – N1-метил-псевдоуридин, TMOU – 5-метоксиуридин, TNA – N6-метиладенозин, TMC – 5-метилцитидин

Наибольший уровень трансляции люциферазы был получен для препарата мРНК, содержащего 100% замену уридина на N1-метил-псевдоуридин (кривая TNP, рисунок 10). Для вариантов препаратов мРНК со 100% заменой оснований уридином (U), псевдоуридином (TPU), 5-метилцитидином (TMC), 5-метоксиуридином (TMOU), с комбинацией псевдоуридина и 5-метилцитидина (TPU + TMC), 5-метоксиуридина и 5-метилцитидина (TMOU + TMC), N1-метил-псевдоуридин и 5-метилцитидина (TNP + TMC) показаны более низкие уровни трансляции люциферазы по сравнению с вариантом, полученным с N1-метил-псевдоуридином (TNP). Было замечено, что различные варианты замены аденозина на N6-метиладенозин привели к очень низкой активности люциферазы в клетках, трансфицированных данными препаратами. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что 100% замена уридина на N1-метил-псевдоуридин в

реакции транскрипции приводит к получению активной молекулы мРНК, с хорошим профилем трансляции. Для остальных модификаций, возможно, требуется ряд оптимизаций. Среди них поиск оптимальной концентрации модифицированного нуклеотида в реакционной смеси, подбор компонентов буфера для транскрипции, подбор доли замещающего модифицированного нуклеотида. Однако, это заслуживает отдельного углубленного исследования. Все последующие результаты были получены на препаратах мРНК, синтезированных со 100% заменой уридина на N1-метил-псевдоуридин.

Выбор кэпирующего агента

Котранскрипционное кэпирование является привлекательным способом кэпирования мРНК по сравнению с ферментативным, поскольку не требует дополнительного фермента. Ко-транскрипционное кэпирование достигается добавлением в IVT смесь кэп-аналогов одновременно со всеми компонентами ферментативной реакции транскрипции. Среди доступных в рамках нашего исследования кэп-аналогов на момент выполнения экспериментальных работ были аналог кэпа m⁷GmAmG (далее CleanCap) и аналог структуры кэпа – «anti-reverse cap analogs» (далее ARCA). Разница между этими структурами заключается в том, что с помощью первого молекула мРНК приобретает кэп1-структуру на 5'-конце, а в присутствии ARCA мРНК приобретает кэп0-структуру. У большинства низших эукариот, в том числе у дрожжей, грибов и амёб, на 5'-конце присутствует менее метилированная кэп0-структура; у высших эукариот, в том числе у человека, есть кэп1- и кэп2-структуры, в которых первый и второй нуклеотиды мРНК 2'-О-метилированы [82]. Согласно некоторым исследованиям, мРНК с кэп0-структурой хоть и более проста в получении, однако, она связывается с цитозольными паттерн-распознающими рецепторами класса RIG-I с такой же аффинностью, как и двуцепочечная РНК [63]. Кроме того, метод ARCA-кэпирования имеет ряд ограничений: относительно низкая эффективность кэпирования (60-80%); кэп содержит неестественную О'-метильную группу в положении С3, которая может быть распознана как экзогенный мотив; транскрипт мРНК должен начинаться с гуанина. Однако одно преимущество есть у ARCA по сравнению с CleanCap – он

дешевле, что важно учитывать для обеспечения приемлемой себестоимости будущего вакцинного препарата. Для начала было необходимо выяснить, как использование конкретного кЭП-аналога повлияет на трансляционную активность мРНК. Для этого в реакции IVT с одной ДНК-матрицы были получены два препарата мРНК, кодирующие люциферазу светлячка, кЭпированные двумя разными реагентами – CleanCap и ARCA. Клетки культуры HEK293 и первичная культура человеческих дендритных клеток, дифференцированных из моноцитов крови, были трансфицированы полученными препаратами, после чего в течение 20 часов регистрировали уровень билюминесценции. Результаты представлены на рисунке 11.

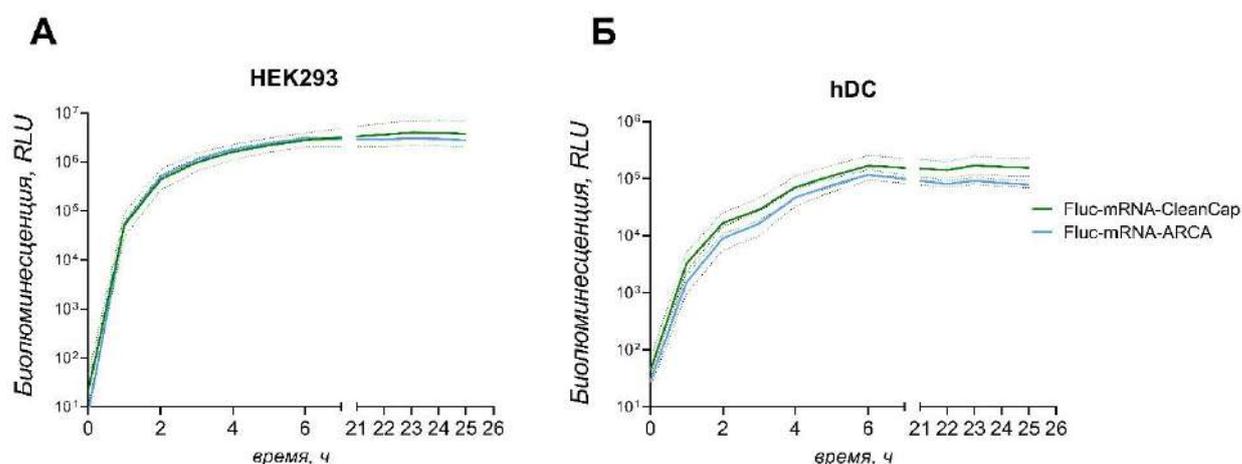


Рисунок 11 – Динамика билюминесценции культуры клеток HEK293 (А) и первичной культурой человеческих дендритных клеток (Б) после трансфекции препаратами мРНК с *cap1* и *cap0* (препараты *Fluc-mRNA-CleanCap* и *Fluc-mRNA-ARCA* соответственно). На графиках приведены значения среднего арифметического (сплошная линия) и стандартного отклонения (пунктирная линия) для трёх технических повторов.

По динамике активности люциферазы, можно было сделать вывод об отсутствии значимых отличий в активности мРНК, кЭпированной ARCA и CleanCap, в условиях эксперимента *in vitro*. Поэтому следующим этапом было необходимо проверить наличие разницы в уровне трансляции между полученными препаратами на животных *in vivo*, в виду того, что *in vitro* тесты измерения активности кодируемого в мРНК белка не могут моделировать влияние

врождённых иммунных реакций на эффективность трансляции. Для этого мРНК с разными кЭП-структурами были упакованы в ЛНЧ согласно стандартному протоколу (как описано в разделах **2.2.6 - 2.2.10**). Готовые препараты мРНК-ЛНЧ вводили внутримышечно мышам линии BALB/c в дозе 5 мкг/мышь и производили прижизненную *in vivo* визуализацию биolumинесценции спустя 30 мин, 3 и 24 часа после введения препаратов. Дополнительно были получены показатели активности люциферазы в органах мышей спустя 3 часа после введения. Результаты представлены на рисунках 11, 12.

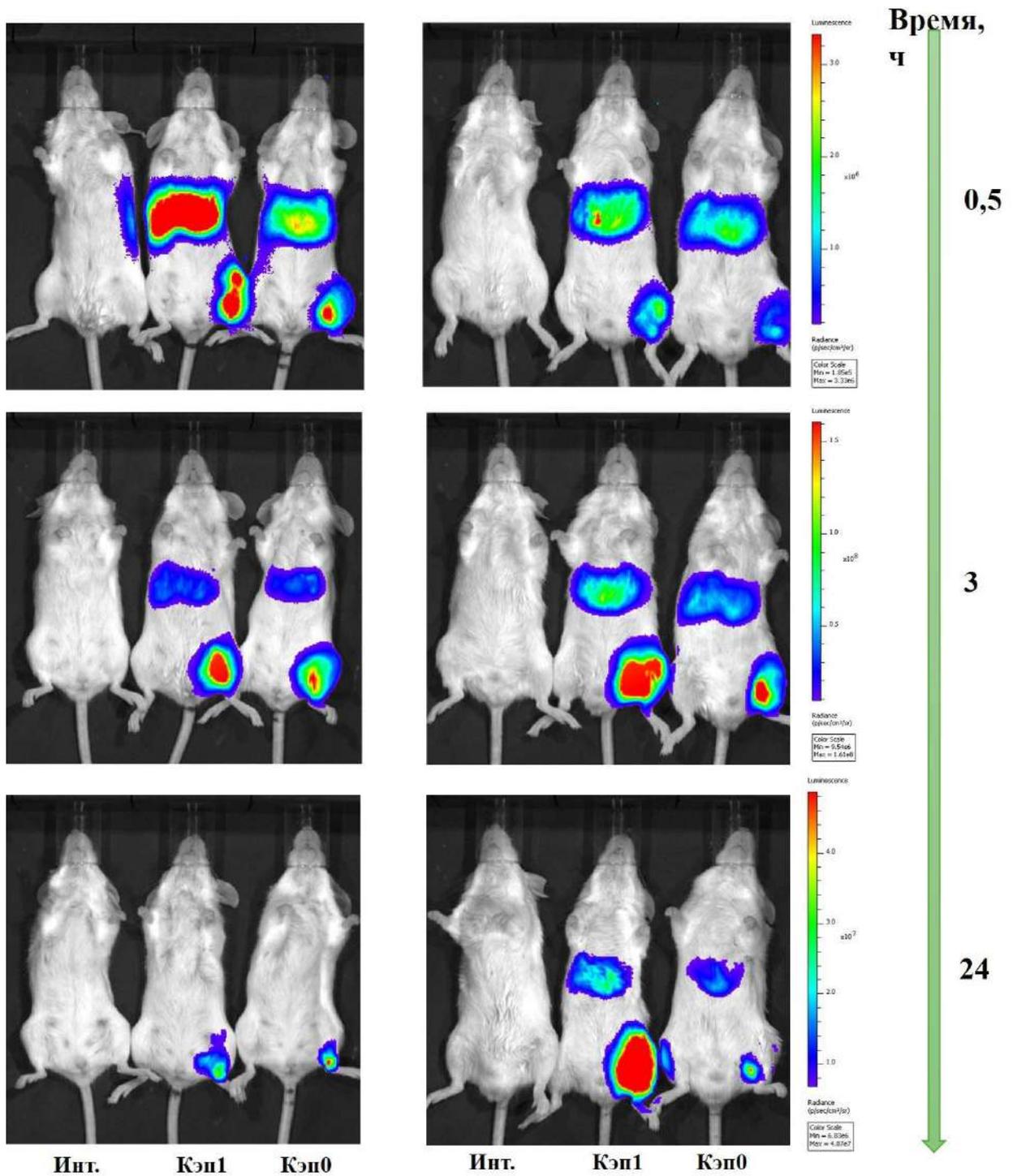


Рисунок 12 – Исследование активности мРНК с разными кэпирующими агентами (ARCA/CleanCap) методом прижизненной визуализации биолуминесценции в мышах линии BALB/c.

Уже через 30 минут после введения исследуемых препаратов наблюдается высокая активность люциферазы, закодированной в мРНК преимущественно в печени и месте введения (рисунок 12).

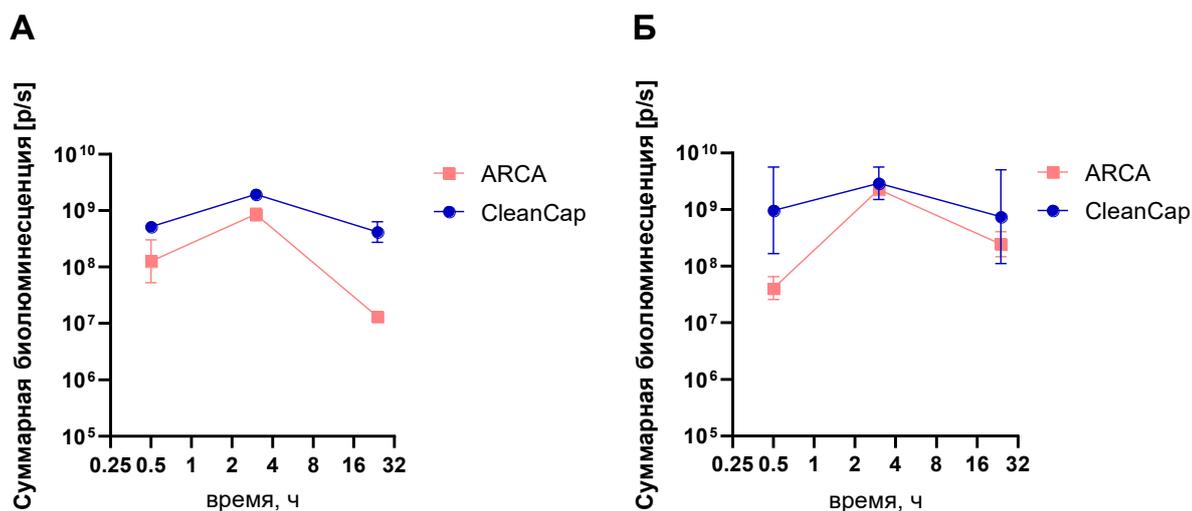


Рисунок 13 – Изменение суммарной люминесценции в мышцах при внутримышечном введении препаратов мРНК-ARCA и мРНК-CleanCap мышам в печени (А) и месте введения (Б). На графиках приведены значения геометрического среднего и стандартного отклонения для двух технических повторов.

Согласно данным суммарной биолуминесценции (рисунок 13) во всех временных точках преимуществом обладал препарат мРНК Fluc-CleanCap, демонстрируя максимальный уровень люминесценции в точке 3 часа. К 24 ч наблюдаются отличия, демонстрирующие 100-кратное превышение уровня люминесценции для препарата Fluc-CleanCap в печени по сравнению с Fluc-ARCA.

Кроме того, часть животных ($n=2$ в каждой группе) в точке 3 часа после введения препаратов мРНК были подвергнуты эвтаназии, у них были отобраны внутренние органы – печень, селезёнка, лёгкие, мышцы голени (место введения), паховый лимфатический узел, сердце. В гомогенатах перечисленных выше органов был измерен уровень активности люциферазы. Результаты сравнения уровня люминесценции в органах мышей приведены на рисунке 14.

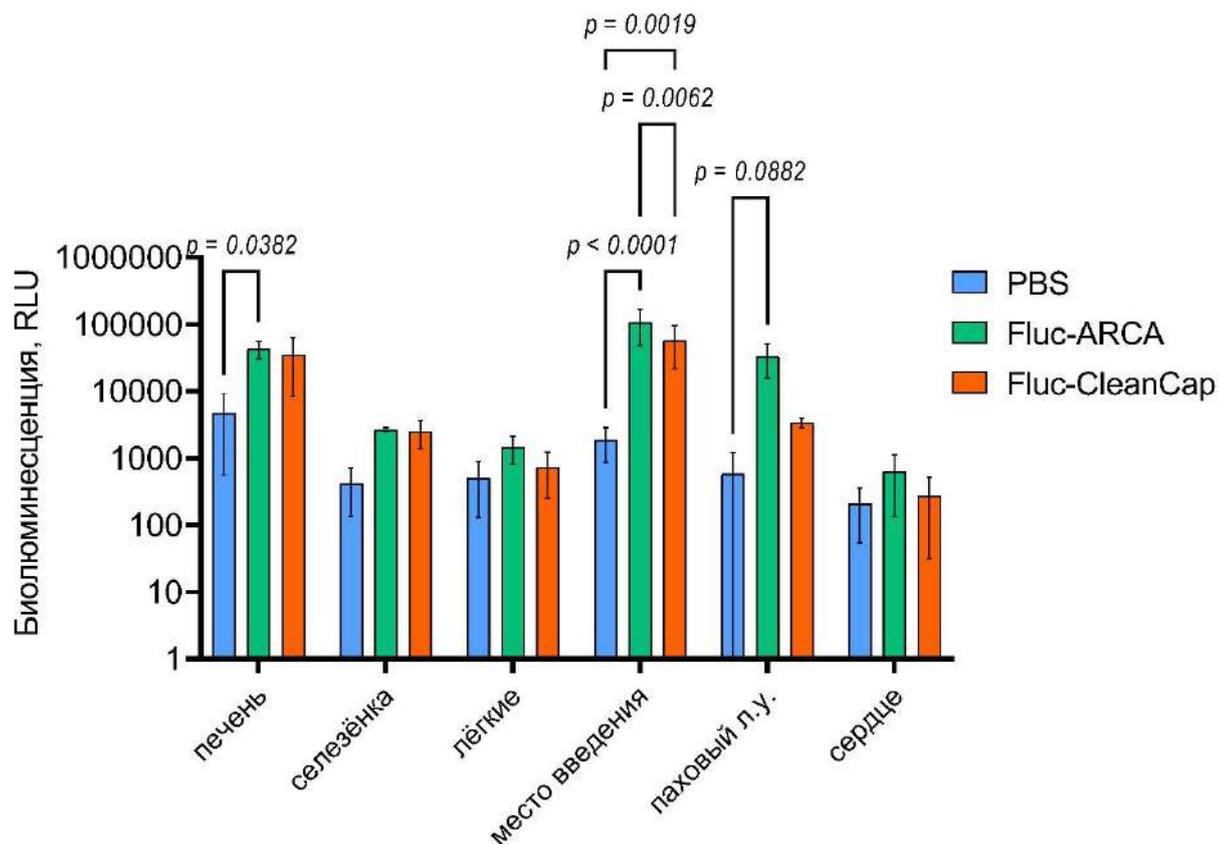


Рисунок 14 – Исследование активности мРНК с разными кодирующими структурами (ARCA/CleanCap) методом измерения люциферазной активности в органах мышей линии BALB/c через 3 часа после внутримышечного введения. Столбчатые диаграммы отображают значения среднего арифметического со стандартным отклонением (усы) для двух технических повторов. Оценка уровня значимости отличий проводилась с использованием множественного сравнительного критерия Тьюки.

Результаты двух исследований во временном промежутке 3 часов после введения препарата методом прижизненной визуализации активности люциферазы и методом измерения уровня люминесценции в гомогенатах органов *in vitro* хорошо согласуются между собой, демонстрируя значимые отличия обоих препаратов от контроля, но мало отличимых между собой. Только в гомогенатах мышц в месте введения был обнаружен значимо более высокий сигнал люминесценции в группе мышей, которым ввели препарат Fluc-ARCA (рисунок 14) по сравнению с Fluc-CleanCap ($p = 0.0062$). Можно сделать вывод о том, что мРНК, кэпированная ARCA обеспечивает более быструю экспрессию закодированного белка, но и быстрый

спад активности с пиком на 3 часа, и значимо низкую трансляцию репортерного белка на 24 ч по сравнению с Fluc-CleanCap, который, как показали наши исследования, приводит к трансляции люциферазы вплоть до 21 дня в мышцах [191].

3.1.4. Исследование распределения и длительности экспрессии репортерного белка после внутримышечного введения препарата мРНК

Для исследования распределения и длительности продукции белка, кодируемого в мРНК-препарате, был изготовлена и инкапсулирована в ЛНЧ мРНК, содержащая кэп1-структуру (с использованием аналога кэпа CleanCap), 100% замену уридина на N1-метил-псевдоуридин. Данный препараты был протестирован на мышцах при внутримышечном (внутренняя группа мышц бедра) введении. Через 30 мин после в/м введения биолюминесценция наблюдалась в основном в месте инъекции и в печени (подтверждая системное распределение мРНК-ЛНЧ, рисунок 15).

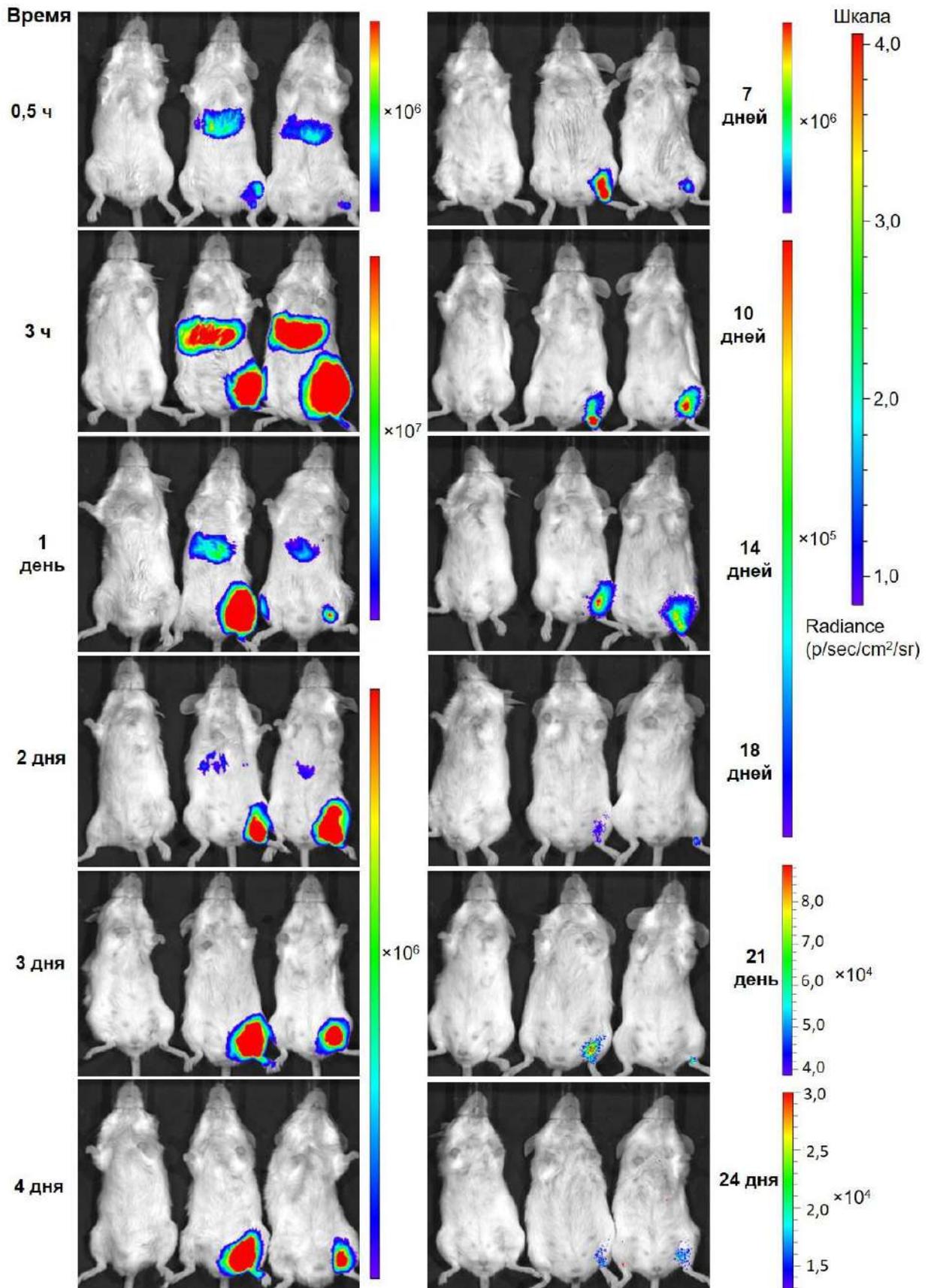


Рисунок 15 – Исследование распределения репортерного белка люциферазы светлячка в мышах линии BALB/c прижизненно после внутримышечного введения мРНК-препарата. Адаптировано из [191].

Прижизненное изучение активности люциферазы, закодированной в мРНК, при внутримышечном введении мРНК-препарата показало наличие биолюминесценции спустя полчаса после введения. Максимум значения общей биолюминесценции пришёлся на точку 3 часа и в печени, и в месте введения. Биолюминесценция в печени детектировалась вплоть до 2 дня после введения, в то время как в месте введения продолжали детектировать люминесценцию вплоть до 24 суток после введения (рисунок 15).

Изучение активности люциферазы в гомогенатах органов на 3 часа после введения позволили обнаружить экспрессию люциферазы в мышечной ткани мышей в месте введения и в печени, отличную от таковых в контрольной группе интактных мышей ($p < 0,001$, $p < 0,05$), для остальных изученных органов отличия от контрольной группы не были достоверны (рисунок 16).

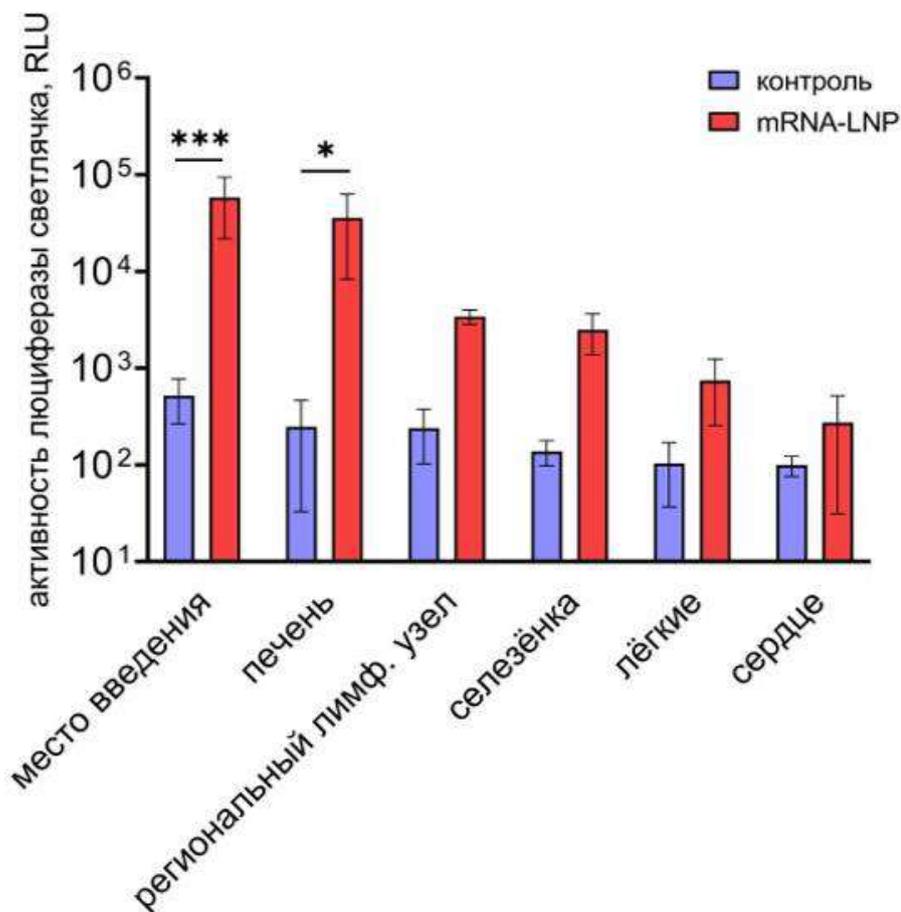


Рисунок 16 – Исследование биораспределения репортерного белка люциферазы в органах мыши спустя 3 часа после внутримышечного введения мРНК-препарата, * - значение критерия значимости p -value $< 0,05$, *** - $p < 0,001$.

Столбчатые диаграммы отображают значения среднего арифметического со стандартным отклонением (усы) для двух технических повторов. Оценка уровня значимости отличий проводилась методом множественных сравнений Шидака. Адаптировано из [191]

Таким образом, полученные данные по распределению репортерного белка, кодируемого в мРНК-препарате хорошо согласуются с описанными ранее в литературе для препаратов инкапсулированных в липидные наночастицы, полученные с использованием ионизируемого липида при внутримышечном способе введения [39; 26].

3.1.5. Изучение экспрессии гена гемагглютинина вируса гриппа H1N1 *in vitro*

Проверку функциональной активности мРНК, кодирующей вирусные антигены, проводят с использованием различных иммунологических методов, включая ИФА, проточную цитометрию, Western-Blot, Dot-Blot и иммуноцитохимический метод исследования клеток иммортализованных культур после трансфекции их исследуемыми препаратами мРНК. Главной целью всех этих методов было выявление антигена посредством взаимодействия его со специфическими антителами. В данной работе был использован метод иммуноцитохимического окрашивания трансфицированных клеток культуры НЕК293.

Для первичной оценки экспрессии целевого антигена посредством мРНК был выбран белок гемагглютинин вируса гриппа А H1N1 A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)pmd09. В качестве CDS была взята последовательность гена HA из базы GISAID (EPI_ISL_18991165), которая претерпела оптимизацию кодонов. Все части гена, кодирующие домены HA (сигнальный, HA1, HA2, трансмембранный), было решено сохранить в исходном виде для адекватного последующего сравнения с контрольными вакцинными препаратами. Активность синтетической мРНК, кодирующей ген гемагглютинина, была проверена *in vitro* путем трансфекции

клеток линии НЕК293 с последующей иммуноцитохимической визуализацией (рисунок 17).

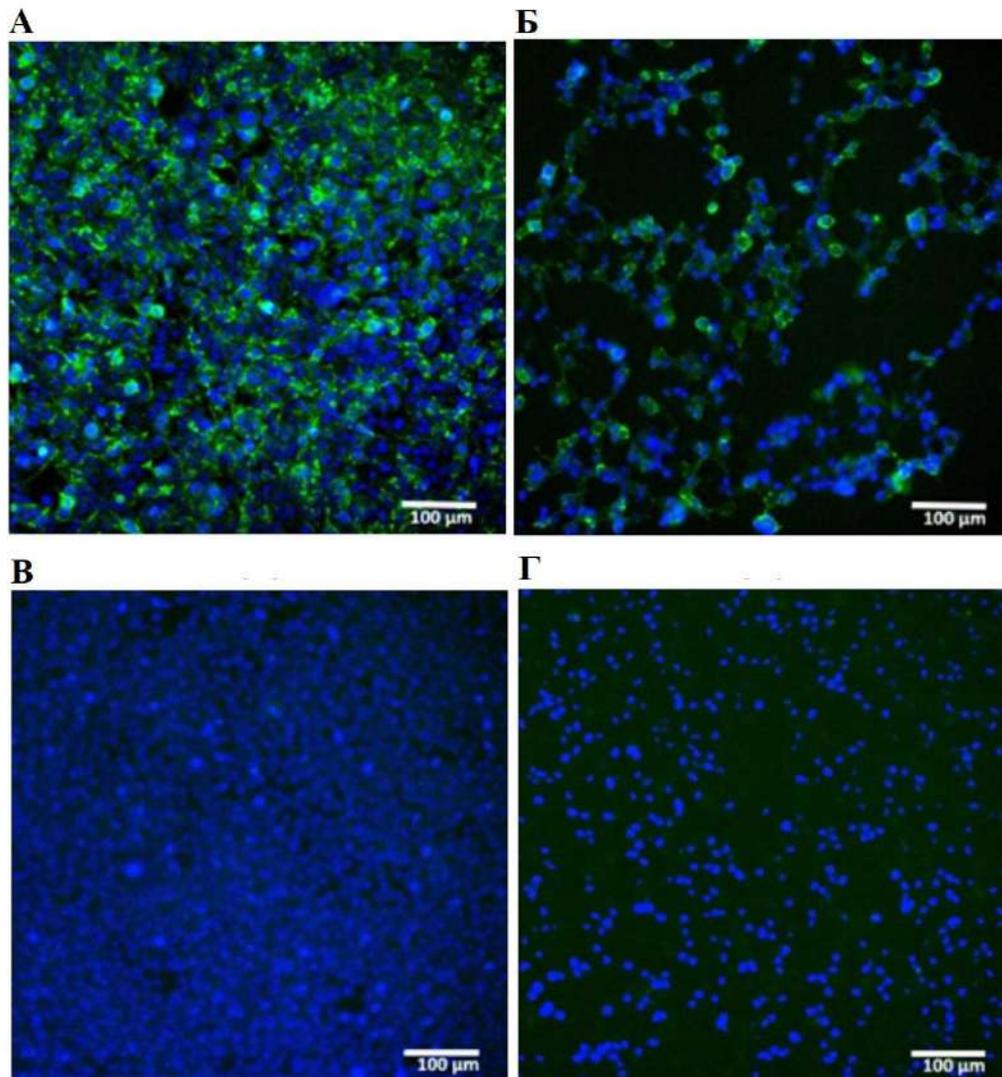


Рисунок 17 – *In vitro* экспрессия гемагглютинаина в клетках, трансфицированных мРНК. А – окрашивание клеток, трансфицированных мРНК, с пермеабиллизацией, Б – окрашивание клеток, трансфицированных мРНК, без пермеабиллизации; В – клетки, не трансфицированные мРНК, окрашенные с пермеабиллизацией; Г – клетки, не трансфицированные мРНК, окрашенные без пермеабиллизации. Адаптировано из [169].

Иммуноцитохимическое окрашивание продемонстрировало свою специфичность, поскольку в контрольных клетках, не трансфицированных мРНК, не обнаружено сигнала флуоресценции (рисунок 17 В, Г). Наличие в клетках НА (H1N1 A/Wisconsin/588/2019) было показано как при внутриклеточном, так и при поверхностном окрашивании (рисунок 17 А, Б соответственно). Эти результаты

подтвердили трансляционную активность синтетической мРНК в условиях *in vitro*. Присутствие антигена НА внутри клетки и на мембране подтверждает наличие трансляции, а значит адекватность базового дизайна кодирующей части мРНК, включающей все домены НА, включая трансмембранный домен, который обеспечивает закрепление антигена в мембране клетки-хозяина.

3.1.6. Исследование влияния длины поли(А)-тракта на экспрессию репортерного белка люциферазы и иммуногенность гемагглютинина гриппа H1N1

На стадии отбора клона *E.coli*, несущего плазмиду с конструкцией, содержащей ген гемагглютинина вируса гриппа А были отобраны клоны с максимальной длиной поли(А)-тракта 80А, вместо длины в 110А, предусмотренной дизайном конструкции. Поскольку в литературе встречаются противоречивые данные по поводу важности длины поли(А)-тракта, были запланированы эксперименты по проверке влияния длины поли(А)-тракта мРНК на иммуногенность препарата мРНК, кодирующего гемагглютинин вируса гриппа А H1N1. Для этого методом ПЦР были получены ДНК-матрицы для синтеза мРНК с поли(А)-трактом разной длины – 0А, 30А, 80А, 110А. Контроль полученной длины поли(Т)-тракта в ДНК-векторе проводили с помощью секвенирования по Сэнгеру. Все препараты были упакованы в ЛНЧ в соответствии со стандартным протоколом. Для исследования влияния длины поли(А)-тракта на иммуногенность конструкции, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа А H1N1, мыши линии BALB/c были иммунизированы полученными препаратами мРНК-ЛНЧ согласно двукратной схеме внутримышечного введения с интервалом в 14 дней, доза составляла 2,5 мкг инкапсулированной мРНК на мышь для всех препаратов. Дизайн экспериментов на животных представлен на рисунке 18.

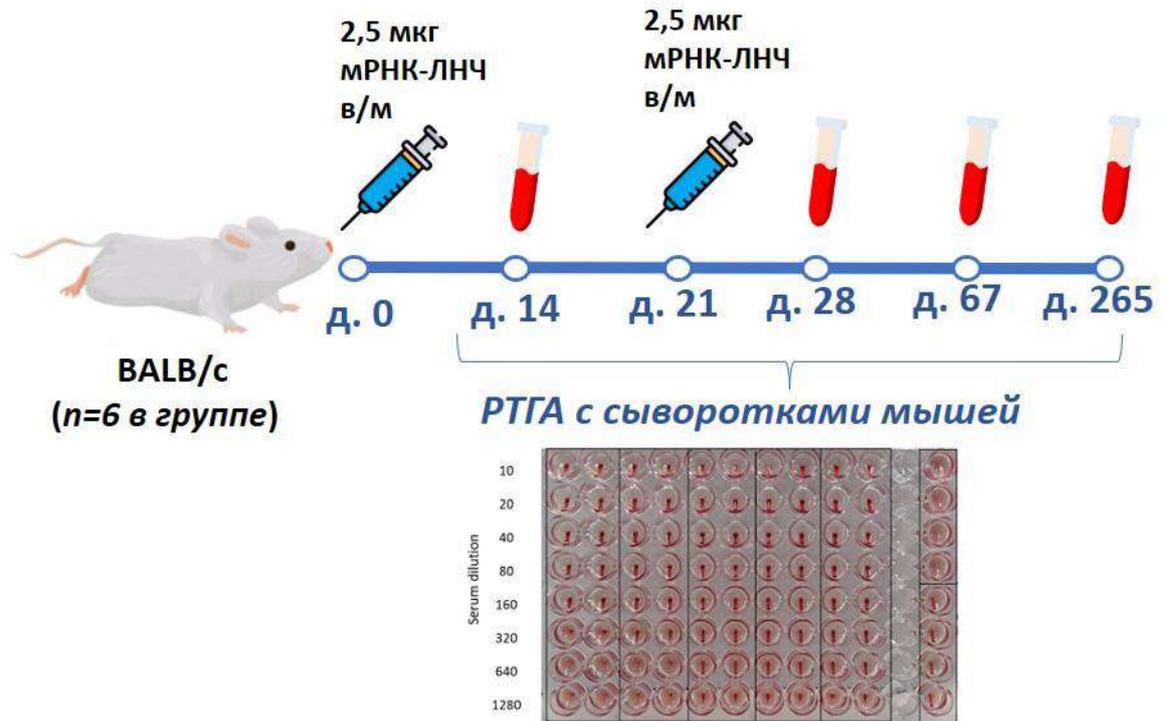


Рисунок 18 – Дизайн экспериментов по исследованию влияния поли(А)-тракта на уровень трансляции: А – репортерного белка люциферазы светлячка и Б – иммуногенности мРНК-препаратов.

Кровь у мышей отбирали на 14-й, 28-й, 67-й, 245-й дни эксперимента. Сыворотку крови мышей анализировали с помощью РТГА, результаты представлены на рисунке 19.

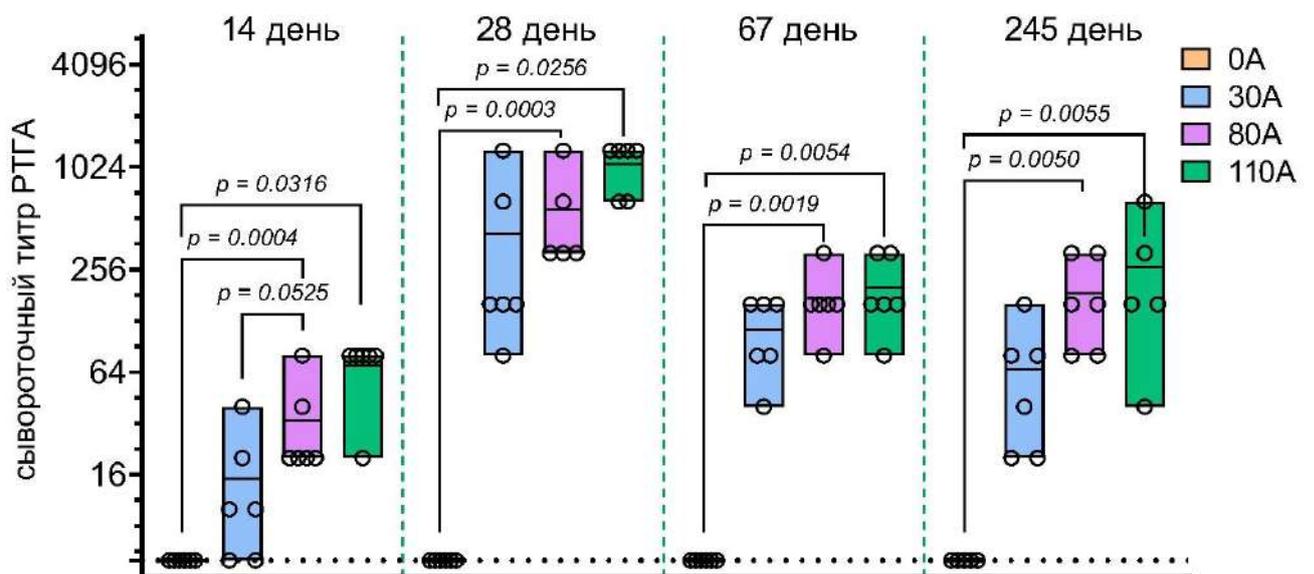


Рисунок 19 – Исследование влияния длины поли(А)-тракта мРНК на иммуногенность мРНК-ЛНЧ препарата на животных. Данные титров РТГА

представлены в виде флотирующих боксов (от минимального до максимального значения) линия внутри бокса демонстрирует среднее значение, круглые символы демонстрируют индивидуальные значения для каждой мыши в группе; горизонтальная пунктирная линия означает нижний предел чувствительности метода, значение титра РТГА равно 1:5. Статистическое сравнение проводилось с использованием критерия Краскела-Уоллиса с тестом Данна для множественного сравнения.

Эксперимент по влиянию поли(А)-тракта мРНК на иммуногенность кодируемого ею гемагглютинаина показал ожидаемые результаты, демонстрирующие важность наличия у мРНК молекулы поли(А)-тракта длиной 30А и более. Для препарата мРНК без поли(А)-тракта (0А) показано отсутствие антительного ответа в течение всего периода наблюдений (рисунок 19), что логично укладывается в современные представления о стабильности мРНК и влиянии поли(А)-тракта на стабильность. В группе мышей получивших препарат мРНК с длиной поли(А) хвоста в 30А отмечены детектируемые уровни антител во всех временных точках. Дальнейшее увеличение поли(А)-тракта приводит к увеличению уровня иммуногенности, поскольку средние значения РТГА для групп 110А и 80А значительно отличаются от таковых в группе 0А во всех временных точках, однако значимое отличие двух этих групп от группы 30А отмечено только на 14-й день после введения первой дозы препаратов. Возможно, отсутствие статистически значимой разницы в остальных временных точках можно объяснить типом данных, получаемых методом РТГА – дискретные значения разведений сыворотки и большими разбросами значений РТГА внутри групп (особенно характерное для группы 30А на 28-й, 245-й дни и 110А на 245-й день наблюдений). Наиболее важным в этом исследовании было сравнение двух групп 110А и 80А. Согласно критерию множественного сравнения Краскел-Уоллиса и критерия Манна-Уитни при непараметрическом сравнении отдельно этих двух групп, они статистически не отличались друг от друга по уровню иммуногенности, определённого методом РТГА (рисунок 19). Таким образом, можно заключить, что длина поли(А)-тракта в мРНК влияет на уровень синтеза кодируемого белка на мышях. Однако, выбор

конструкции с длиной поли(А)-тракта 80А является некоторой «золотой серединой» между технологически достижимой длиной поли(А)-тракта в ДНК-конструкциях, кодирующих гемагглютинин, и уровнем иммуногенности, превышающей пороговое значение, свидетельствующее о наличии защитной эффетктивности для вакцин от гриппа у человека (титр РТГА выше 1:40).

Дополнительным результатом данного эксперимента являются данные о продолжительности иммунного ответа на H1N1-мРНК. Уровень иммунного ответа на 245-й день после первой дозы кандидатной моновалентного мРНК-препарата во всех группах мышей, иммунизированных мРНК-ЛНЧ с наличием поли(А)-тракта (30А, 80А, 110А), оказался детектируемым при анализе сыворотки мышей в РТГА, однако статистически значимо отличались от группы 0А только группы 80А и 110А (рисунок 19). Ограничением примененного нами дизайна данного эксперимента в плане длительности иммунного ответа является отсутствие в группы мышей, вакцинированных препаратом сравнения (инактивированной расщеплённой вакциной).

В результате разработки вакцинной платформы на основе мРНК технологии нами были получены ценные данные о важности подбора ДНК вектора для конкретного кодируемого белка и необходимости контроля за целостностью структуры поли(Т) тракта в составе ДНК-матрицы. Модификации синтетической мРНК путём использования кэпирующего агента по технологии CleanCap и полной замены уридина на N1-метилпсевдоуридин приводят к увеличению уровня и продолжительности трансляции кодируемого в мРНК белка, что даёт возможность снижения эффективной дозы мРНК-препарата. Описанный подход получения мРНК-ЛНЧ препаратов в лабораторных условиях приводит к получению детектируемых количеств кодируемых белков *in vitro* и высокой экспрессии этих белков на модельных животных, обеспечивая высокие уровни биолюминесценции репортерного белка и иммуногенности вирусного антигена. Выявленные оптимальные условия получения препаратов были использованы для создания кандидатных препаратов для профилактики инфекционных заболеваний, вызванных сезонными вирусами гриппа (А и В) и коронавируса SARS-CoV-2.

3.2. Иммуногенность кандидатных мРНК-вакцинных препаратов на животных

В данном разделе приведены результаты по изучению иммуногенности кандидатных мРНК-препаратов на животных.

3.2.1. Исследование иммуногенности моновалентных препаратов мРНК на мышах

Вначале были получены моновалентные препараты, которые содержали мРНК, кодирующие гемагглютинины вирусов гриппа A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)pmd09, A/Darwin/9/2021 (H3N2), B/Austria/1359417/2021 (В/линия Виктория), B/Massachusetts/02/12 (В/линия Ямагата). Эти штаммы вируса гриппа были включены в рекомендации ВОЗ по сезонной вакцине против гриппа 2022-2023 годов в Северном полушарии [209]. Кодон-оптимизированные ДНК последовательности генов гемагглютининов были синтезированы и клонированы в линейную бактериальную плазмиду pJAZZ-OK (методика описана в разделе 2.2.1). Препараты мРНК были синтезированы по отдельности в соответствии с лабораторным регламентом (методика описана в разделах 2.2.6 – 2.2.10). Каждый из препаратов мРНК был упакован индивидуально в липидные наночастицы. Для оценки иммуногенности самки мышей линии BALB/c возрастом 5-7 недель, были распределены по 8 группам. Вакцинацию проводили в соответствии с двукратной схемой внутримышечной иммунизации с промежутком в 21 день. (рисунок 20).

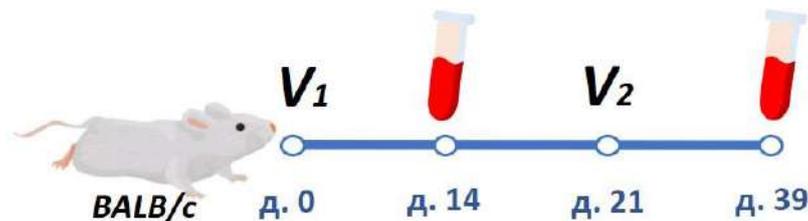


Рисунок 20 – Схема эксперимента по изучению иммуногенности моновалентных кандидатных мРНК-препаратов.

Каждый из препаратов, кодирующих отдельный антиген гриппа, был введен в двух дозах – 2,5 и 5 мкг на мышь. Выбор доз основан на результатах, полученных в ходе выполнения предыдущих работ на спайк-белке коронавируса [35], и результатах исследования доза-эффекта на животной модели мРНК-препарата от

коронавируса производства компании Пфайзер [260]. Кровь отбирали спустя 14 дней после первой инъекции и спустя 18 дней после второй. Иммуногенность препаратов оценивали методом РТГА согласно ранее описанному стандартному протоколу [157]. Результаты приведены на рисунке 21.

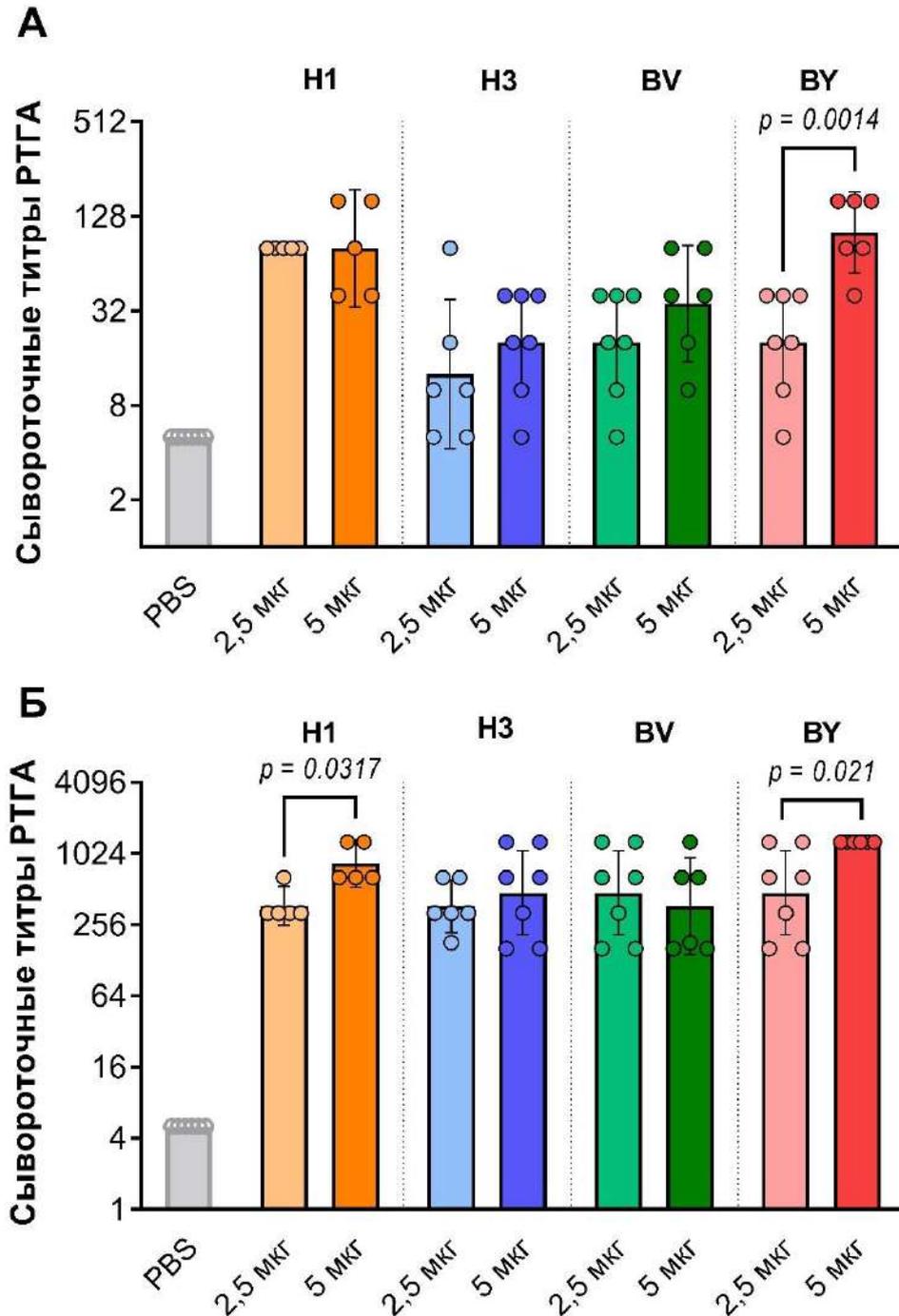


Рисунок 21 – Результаты исследования иммуногенности моновалентных мРНК-препаратов на мышах. А – сывороточные титры РТГА спустя 14 дней после первой дозы; Б – сывороточные титры РТГА спустя 18 дней после второй

дозы моновалентных препаратов. Столбцы на графике отображают геометрическое среднее, а усы – 95% доверительный интервал, точки соответствуют индивидуальным значениям титра РТГА. Статистическое сравнение проведено с использованием непараметрического теста Манна-Уитни, p – значение p -value.

Уровень иммунного ответа после первой иммунизации мышей для всех четырёх моновалентных препаратов в двух разных дозировках оказался выше нижнего предела детекции (выше 1:10), за исключением дозы 2,5 мкг НЗ-мРНК (среднее геометрическое составило 1:7). Значимые отличия между двумя дозами моновалентных препаратов были выявлены для препарата ВУ-мРНК, доза 5 мкг приводит к значимому увеличению титра РТГА по сравнению с дозой 2,5 мкг ($p = 0.014$, рисунок 21 А). Для трёх других препаратов можно отметить следующие тенденции, при отсутствии статистической значимости: для Н1-мРНК среднее геометрическое титров РТГА составило 1:80 и 1:80 для доз 2,5 и 5 мкг соответственно; для НЗ-мРНК – 1:7 и 1:15 для доз 2,5 и 5 мкг соответственно; для ВV-мРНК – 1:15 и 1:35 для доз 2,5 и 5 мкг соответственно (рисунок 21 А). После второй иммунизации мышей титры РТГА для всех препаратов превысили 1:40. Значимые отличия между дозами (2,5 и 5 мкг/мышь) были обнаружены при сравнении титров РТГА для препаратов Н1-мРНК ($p = 0.0317$) и ВУ-мРНК ($p = 0.021$), демонстрирующие преимущества дозы 5 мкг/мышь (рисунок 21 Б). Для остальных двух препаратов увеличение дозы не приводит к значимому увеличению титров РТГА. По результатам данного эксперимента для дальнейших исследований была выбрана доза 5 мкг/мышь.

3.2.2. Иммуногенность трёхвалентного мРНК-препарата на мышах

Для моделирования трёхвалентной вакцины от гриппа сезона 2022-2023 годов в Северном полушарии монопрепараты Н1-мРНК, НЗ-мРНК и ВV-мРНК (Н1N1 А/Wisconsin/588/2019, Н3N2 А/Darwin/9/2021, В/Austria/1359417/2021) были смешаны в эквимольном соотношении в соответствии с концентрацией включённой в ЛНЧ мРНК. Иммуногенность данного комбинированного препарата была изучена на мышах линии BALB/с при двукратной схеме внутримышечного

введения 5 мкг/мышь каждой мРНК (общее содержание мРНК в одной дозе составило 15 мкг) в соответствии со схемой (рисунок 22 А). Эта доза была выбрана как потенциальная 1/10 дозы человека мРНК по аналогии с вакцинами для профилактики COVID-19.

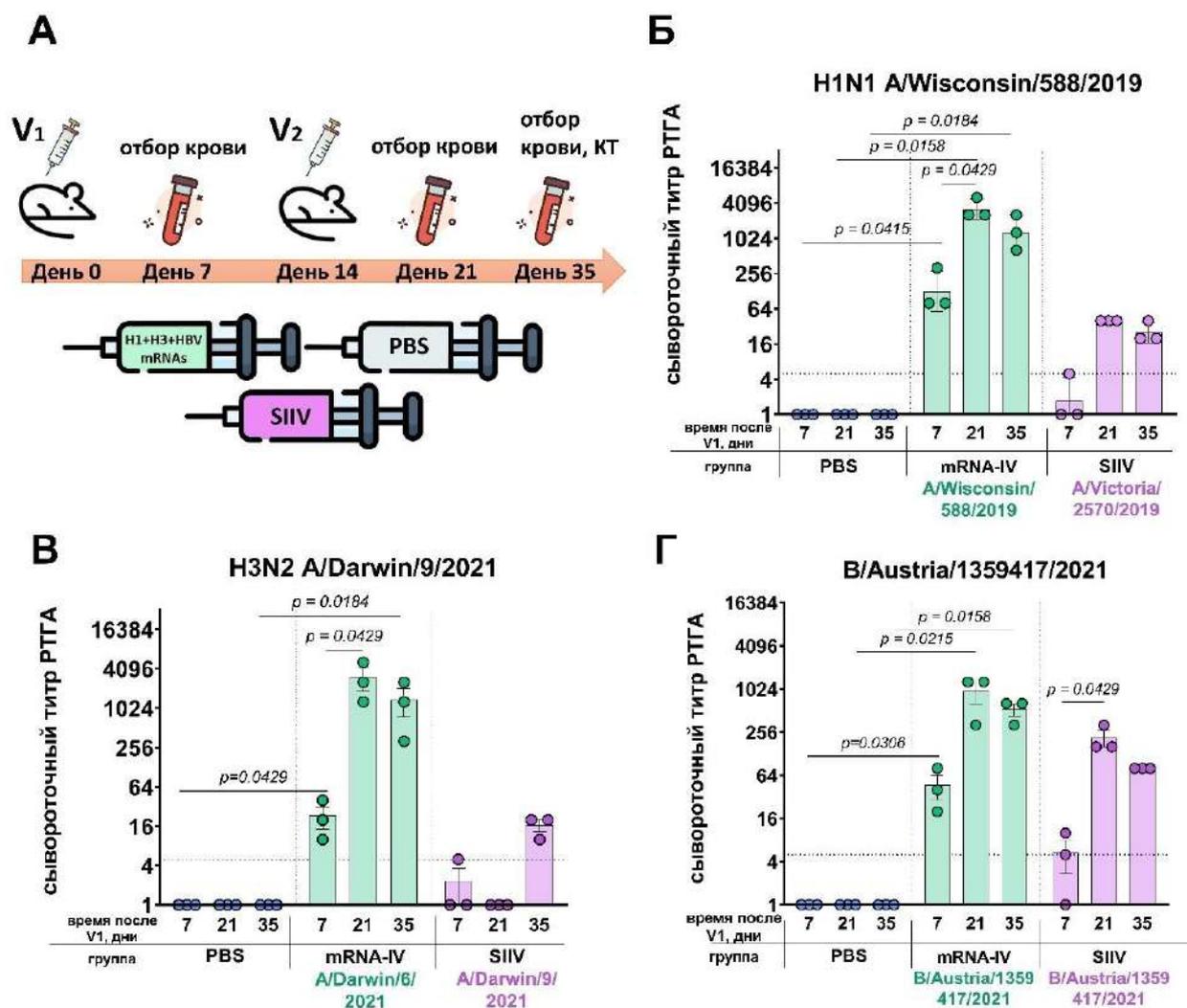


Рисунок 22 - Иммуногенность комбинированного мРНК-препарата на мышах. А – дизайн эксперимента; титры РТГА в сыворотке определяли через 7, 21 и 35 дней после первичной дозы (V1) с антигенами вакцинных штаммов: Б – H1N1 A/Wisconsin/588/2019, В – H3N2 A/Darwin/9/2021, Г – B/Austria/1359417/2021. Группа мРНК-IV показана зеленым цветом, SIIV – фиолетовым, а PBS – синим. Данные репрезентативны для одного эксперимента и представлены как среднее геометрическое \pm SD. Данные сравнивали с использованием критерия Краскела-Уоллиса с тестом множественного сравнения Данна для межгруппового анализа и

критерия Фридмана с тестом сравнения Данна для внутригруппового анализа титров РТГА в динамике. Адаптировано из [168].

В качестве групп негативного и позитивного контроля использовали лабораторных мышей, распределенных по следующим выборкам: первой группе (n=3) однократно вводили стерильный PBS в эквивалентном объеме; вторую группу (n=3) иммунизировали инактивированной сплит-вакциной против гриппа (SIV). Дозировка SIV составляла 6 мкг на животное, что эквивалентно 1/10 человеческой дозы. Антигенный состав SIV соответствовал рекомендациям ВОЗ для четырехвалентных сезонных вакцин Северного полушария на период 2022–2023 гг. Схема иммунизации предусматривала двукратное внутримышечное введение препаратов с интервалом в 14 суток. Кроме того, в данном эксперименте было решено использовать более быструю схему двукратной вакцинации (через 14 дней), отличную от таковой в предыдущем эксперименте по изучению иммуногенности моновалентных препаратов в двух дозах. Была предусмотрена дополнительная точка для исследования иммуногенности после полной вакцинации.

Иммуногенность H1-мРНК

Оценка гуморального ответа показала превосходство трехвалентной мРНК-вакцины над коммерческим аналогом (SIV). Уже через неделю после первой инъекции титры РТГА к гомологичному штамму A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)pdm09 в группе мРНК достигли 1:126, в то время как в группе SIV они оставались ниже предела обнаружения (LOD).

После ревакцинации разрыв стал критическим: среднее геометрическое титра в группе мРНК составило 1:3413 (индивидуальные значения до 1:3225), что в 80 раз превысило показатель группы SIV (1:40). Несмотря на статистически значимые отличия мРНК-препарата от контроля (PBS) во всех точках, ранговый тест Вилкоксона не выявил достоверных различий между двумя типами вакцин на раннем этапе, что может быть связано с объемом выборки.

Анализ динамики гуморального ответа в группе мРНК-вакцины выявил достоверный рост титров РТГА к штамму H1N1 после введения второй дозы:

показатели на 21-е сутки значимо превосходили значения 7-го дня ($p = 0.0429$, критерий Фридмана). К 35-м суткам наблюдалось снижение среднего титра в 2,2 раза относительно пиковых значений, однако данная динамика была статистически незначимой (тест Вилкоксона, $p = 0.25$). Подобное различие сопоставимо с погрешностью метода РТГА при используемом шаге разведения сыворотки (2,2 раза). В группе активного контроля (SIV) динамика титров между 21-ми и 35-ми сутками также характеризовалась отсутствием статистически значимых различий ($p = 0.75$).

Иммуногенность НЗ-мРНК

Анализ иммуногенности компонента НЗ-мРНК выявил еще более выраженное превосходство над инактивированной сплит-вакциной (SIV) (рис. 22 В). Ввиду отсутствия штамма A/Darwin/9/2021 титры РТГА определяли с использованием серологически близкого антигена A/Darwin/6/2021 (замены G69D, D202N в HA).

Уже на 7-е сутки после первой дозы в группе мРНК регистрировался детектируемый уровень антител (средний титр 1:23), тогда как в группе SIV показатели не достигали предела обнаружения (LOD). После ревакцинации (21-е сутки) в группе мРНК наблюдался статистически значимый прирост титров до 1:2987 ($p=0,0429$, критерий Фридмана), в то время как в группе SIV ответ по-прежнему оставался ниже LOD. К 35-м суткам в группе SIV зафиксирована слабая сероконверсия, однако средний титр мРНК-вакцины (1:1387) превосходил этот показатель в 86 раз. Отсутствие значимого снижения антител между 21-ми и 35-ми сутками в группе мРНК ($p=0,66$) может быть обусловлено не достаточной временной дистанцией между этими точками.

Иммуногенность BV-мРНК

Иммуногенность компонента BV-мРНК (линия Victoria) в составе трехвалентного препарата была менее выраженной в сравнении с субтипами Н1 и НЗ. Пиковый средний титр РТГА к штамму B/Austria/1359417/2021 на 21-е сутки составил 1:960 (рис. 22 Г).

Несмотря на более умеренные показатели, уже после первой дозы (7-е сутки) в группе мРНК регистрировался детектируемый уровень антител (1:45), в то время как в группе SIV значения находились на уровне предела обнаружения (1:5, ниже LOD). В целом, разрыв в титрах между мРНК-препаратом и коммерческим аналогом для компонента BV был менее значительным, чем для компонента вируса гриппа А. Динамика снижения антительного ответа к 35-м суткам также не достигла статистической значимости ($p = 0.25$, тест Вилкоксона).

3.2.3. Иммуногенность комбинированного мРНК-препарата для профилактики гриппа и коронавируса на мышах

Комбинированные вакцинные препараты представляют особый интерес в области вакцинопрофилактики, поскольку обладают явными преимуществами над моновакцинами. В мире уже проходят клинические испытания комбинированных вакцин для одновременной профилактики гриппа и коронавируса. Нами также был получен в рамках лабораторного регламента комбинированный препарат мРНК-ЛНЧ путём смешивания монопрепаратов после инкапсуляции в соотношении 1:1:1:1:1. Для изучения иммуногенности такого препарата самки мышей линии BALB/c были иммунизированы внутримышечно двукратно с промежутком в 21 день (рисунок 23 А). Одна доза комбинированного мРНК-препарата содержала суммарно 25 мкг – по 5 мкг каждой из мРНК, кодирующих гемагглютинины вирусов гриппа A/Wisconsin/588/2019 (H1N1), A/Darwin/9/2021 (H3N2), B (Victoria lineage) B/Austria/1359417/2021, B (Yamagata lineage) B/Massachusetts/02/12 и спайк SARS-CoV-2 ХВВ.1. В качестве контрольных препаратов использовали зарегистрированную инактивированную сплит-вакцину (SIV, в дозировке 1/5 человеческой дозы на мыш, что соответствует дозе 3 мкг каждого из 4-х антигенов), препарат мРНК, кодирующей белок спайка вируса SARS-CoV-2 ХВВ.1 (5 мкг/мыш), четырёх-валентный мРНК-препарат, кодирующий те же НА, что и комбинированная (по 5 мкг каждой мРНК/мыш), векторную вакцину от COVID-19 Спутник V ХВВ.1.15 (1/5 человеческой дозы) и стерильный фосфатный буфер (PBS). Обоснование дозового режима комбинированного препарата базируется на результатах предшествующих исследований, в которых была установлена

корреляция между дозировкой, иммуногенностью и протективной эффективностью мРНК-платформ [35; 169]. Выбор дозового режима SIV в размере 1/5 от человеческой дозы был обусловлен данными предшествующих испытаний, в которых дозировка 1/10 продемонстрировала субоптимальную иммуногенность по всем антигенным компонентам. Аналогично, использование препарата «Спутник V-XBV» в дозе 1/5 от стандартной для человека (2×10^{10} вирусных частиц) базировалось на результатах ранних доклинических исследований аденовирусной платформы «Спутник V», подтвердивших эффективность данного количественного состава [252]. Кровь у мышей отбирали дважды - спустя 14 и 39 дней после первой вакцинации.

Иммуногенность гриппозных компонентов

Оценку иммуногенности проводили с помощью РТГА с различными антигенами, входящими в состав мРНК-препаратов и/или инактивированной сплит-вакцины (H1N1 A/Wisconsin/588/2019, H3N2 A/Darwin/9/221, B/Austria/1359417/2021, B/Massachusetts/2/2012). Данный анализ проводили для сывороток мышей из групп mRNA-5, mRNA-4, SIV и PBS, для остальных групп данный анализ не проводили. Результаты межгруппового сравнения приведены на рисунке 23.

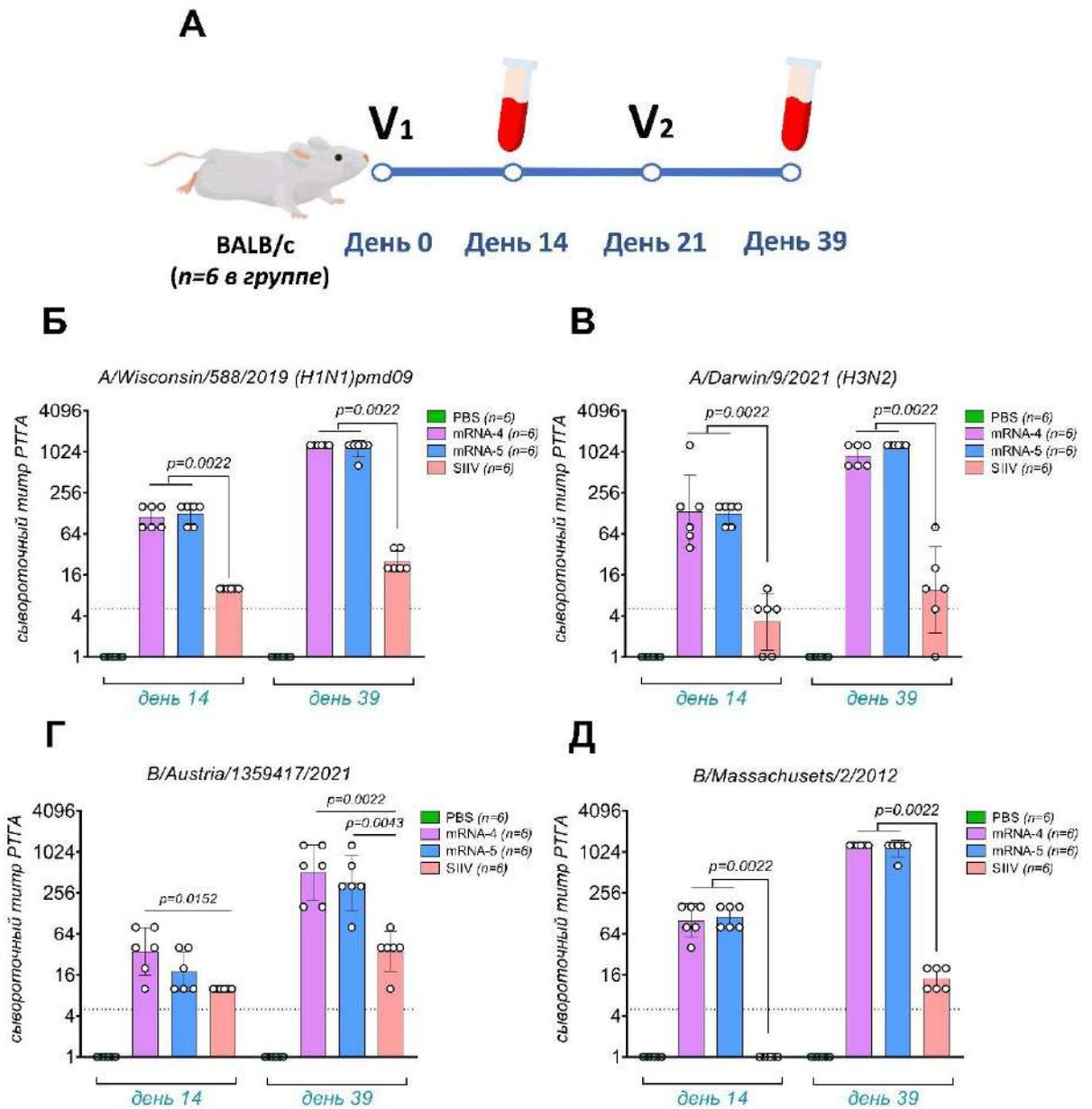


Рисунок 23 – Исследование иммуногенности гриппозных компонентов комбинированного мРНК-препарата на мышах. А - дизайн эксперимента по определению уровня иммуногенности исследуемых вакцинных препаратов. Определение титров РТГА в сыворотке крови проводилось на 14-е сутки после первичной иммунизации (V1) и на 18-е сутки после ревакцинации (V2). В качестве антигенов использовали штаммы вируса гриппа, гомологичные вакцинным компонентам: Б – H1N1 *A/Wisconsin/588/2019*; В – H3N2 *A/Darwin/9/2021*; Г – *B/Austria/1359417/2021*; Д – *B/Massachusetts/02/2012*. Данные являются репрезентативными для одного эксперимента и представлены в виде средних геометрических со стандартным отклонением от геом. среднего.

Статистическое сравнение проводили с использованием теста Манна-Уитни. Адаптировано из [168].

При изучении иммуногенности комбинированного препарата mRNA-5 установлено, что включение мРНК, кодирующей S-белок SARS-CoV-2, не вызывает антигенной интерференции и не снижает эффективность гриппозных компонентов по сравнению с препаратом mRNA-4 [168]. Полученные результаты верифицируют данные предшествующих исследований [169] и демонстрируют выраженную реакцию на ревакцинацию. Динамика антительного ответа на 18-й день после введения бустерной дозы mRNA-5 характеризовалась десятикратным (и более) увеличением средних геометрических титров РТГА в отношении всего спектра использованных антигенов (рисунок 23 Б-Д).

Как было описано выше в эксперименте по исследованию трёх-валентного препарата [169], иммунный ответ, индуцируемый инактивированной сплит-вакциной, по отношению к вирусу гриппа А H3N2 имел большой разброс. Большая часть мышей ответила на уровне нижнего предела детекции, на 39 день наблюдается слабая бустеризация иммунного ответа и как результат статистически не значимые отличия среднего титра РТГА после первой и второй дозы вакцины (рисунок 23 В).

Низкий уровень гуморального ответа в группе контроля (SIIV) на штамм В/Massachusetts/02/2012 предположительно связан с его гетерологичностью относительно вакцинного штамма В/Phuket/3073/2013. Проведенный сравнительный тест с гомологичным антигеном подтвердил превосходство мРНК-содержащих конструкций (mRNA-5 и mRNA-4), титры которых превосходили показатели SIIV в 25 и 20 раз соответственно. Полученные данные верифицируют гипотезу об ограниченной способности инактивированных препаратов к индукции перекрестного иммунитета внутри субтипов при использовании стандартных моделей дозирования (1/5 и 1/10 человеческой дозы), подчеркивая высокую иммуногенность мРНК-вакцин в дозе 5 мкг/мышь.

Иммуногенность S-гликопротеина SARS-CoV-2

Иммуногенность пятивалентной вакцины в отношении коронавируса определяли по уровню связывающих антител (после первой и повторной иммунизации) и вируснейтрализующей активности (ВНА) сыворотки крови иммунизированных мышей, взятой на 39-й день исследования (18-й день после повторной вакцинации). При анализе ВНА были выбраны два варианта SARS-CoV-2 – ХВВ.1 (гомологичный закодированому в мРНК) и EG.5.1 (актуальный на момент исследования вариант коронавируса). Для оценки уровня связывающих антител, образующихся в ответ на вакцинацию исследуемой комбинированным препаратом мРНК-5 и контрольными препаратами, сыворотки крови иммунизированных животных были проанализированы методом ИФА с RBD-доменом гомологичного антигена S-гликопротеина SARS-CoV-2 ХВВ.1. Полученные результаты отображены в виде кривых титрования сывороток и сравнения площади под этими кривыми (AUC) (рисунок 24 А-Д).

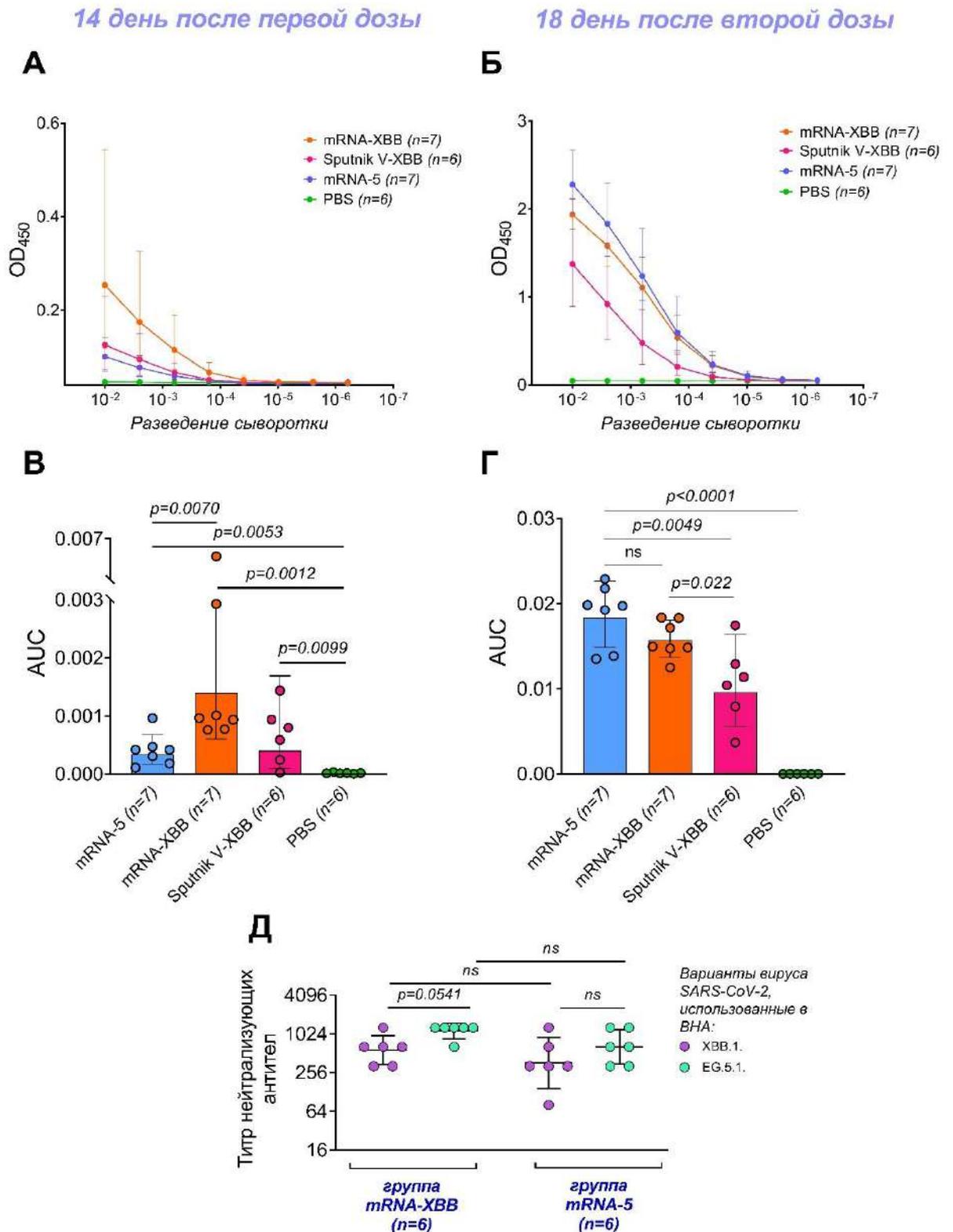


Рисунок 24 – Сравнительный анализ иммуногенности S-белка SARS-CoV-2 в составе различных вакцинных препаратов. (А, Б) — Динамика накопления специфических антител (ИФА): представлены средние геометрические значения оптической плотности (ОП₄₅₀) в зависимости от разведения сывороток после первичной и бустерной иммунизации соответственно; (В, Г) — Сравнительный

анализ расчетных значений площади под кривой (AUC) на основе данных ИФА после первой и второй доз препаратов; (Д) — Вируснейтрализующая активность (ВНА) сывороток крови на 39-е сутки эксперимента (18-й день после ревакцинации); mRNA-5 — пентавалентный кандидатный препарат (мРНК-ЛНЧ), включающий мРНК гемагглютининов четырех штаммов гриппа и S-белка SARS-CoV-2; мРНК-ХВВ — моновалентный контроль. Статистический анализ: межгрупповые сравнения — критерий Манна-Уитни; сопоставление титров к различным штаммам коронавируса — критерий Вилкоксона. Адаптировано из [168].

Оценку титров ВНА сыворотки вакцинированных мышей после второй иммунизации проводили по отношению к двум штаммам коронавируса SARS-CoV-2 – ХВВ.1 и EG.5.1.1., результаты представлены на рисунке 24 Д. Данные штаммы были выбраны, учитывая что в исследуемых мРНК-препаратах был закодирован спайк-белок варианта ХВВ.1, а на момент проверки ВНА максимальное распространение получил вариант EG.5.1.1. Статистическое сравнение титров ВНА между моновалентным и комбинированным препаратами не обнаружило значимых отличий, что указывает на отсутствие влияния мРНК молекул, кодирующих антигены вирусов гриппа, в препарате на иммуногенность коронавирусного компонента. Отличий в титрах ВНА к двум штаммам коронавируса также не обнаружено, что может свидетельствовать об отсутствии снижения нейтрализующей активности антител, вызываемых мРНК-препаратом по отношению к более позднему варианту сублинии Омикрон коронавируса EG.5.1.

Статистическое сравнение значений AUC после первой иммунизации показало достоверные отличия уровня иммуногенности исследуемого и контрольных вакцинных препаратов от PBS. Также было обнаружено значимое отличие между группами мРНК-ХВВ и мРНК-5 ($p = 0,007$) после первой иммунизации при сравнении t-тестом. В то время как при анализе AUC после второй иммунизации достоверной разницы между группами мРНК-ХВВ и мРНК-5 не было обнаружено, заметны лишь тенденции к тому, что уровень иммунного

ответа на комбинированный препарат выше (рисунок 24 Г). Кроме того, были обнаружены достоверные отличия мРНК-препаратов (мРНК-5 и мРНК-ХВВ) от Спутник V (ХВВ), мРНК-4 и PBS [168]. Поскольку повторная иммунизация приводит к значимому увеличению титра антител и для дальнейших доклинических и клинических исследований будущего кандидатного вакцинного мРНК-препарата предполагается именно такая схема вакцинации (прайм-буст), наиболее репрезентативными являются результаты об отсутствии различий в титрах антител у мышей получивших моновалентный препарат мРНК-ХВВ и мРНК-5 после второй дозы препаратов.

Таким образом, благодаря изучению иммуногенности комбинированного препарата на животных в сравнении с моновалентными мы показали отсутствие взаимного влияния мРНК компонентов на уровень иммуногенности после двукратной иммунизации по отношению к антигенам вируса гриппа и коронавируса.

3.2.4. Изучение показателей поствакцинального иммунного ответа в отношении гетерологичных штаммов вируса гриппа методами РТГА и ИФА

На 35-й день после начала эксперимента по изучению иммуногенности трёхвалентного мРНК-препарата у мышей была собрана цельная кровь для более углубленного исследования. Это позволило изучить перекрестную активность иммунного ответа после иммунизации к различным штаммам вирусов гриппа через 21 день после второй дозы (рисунок 25).

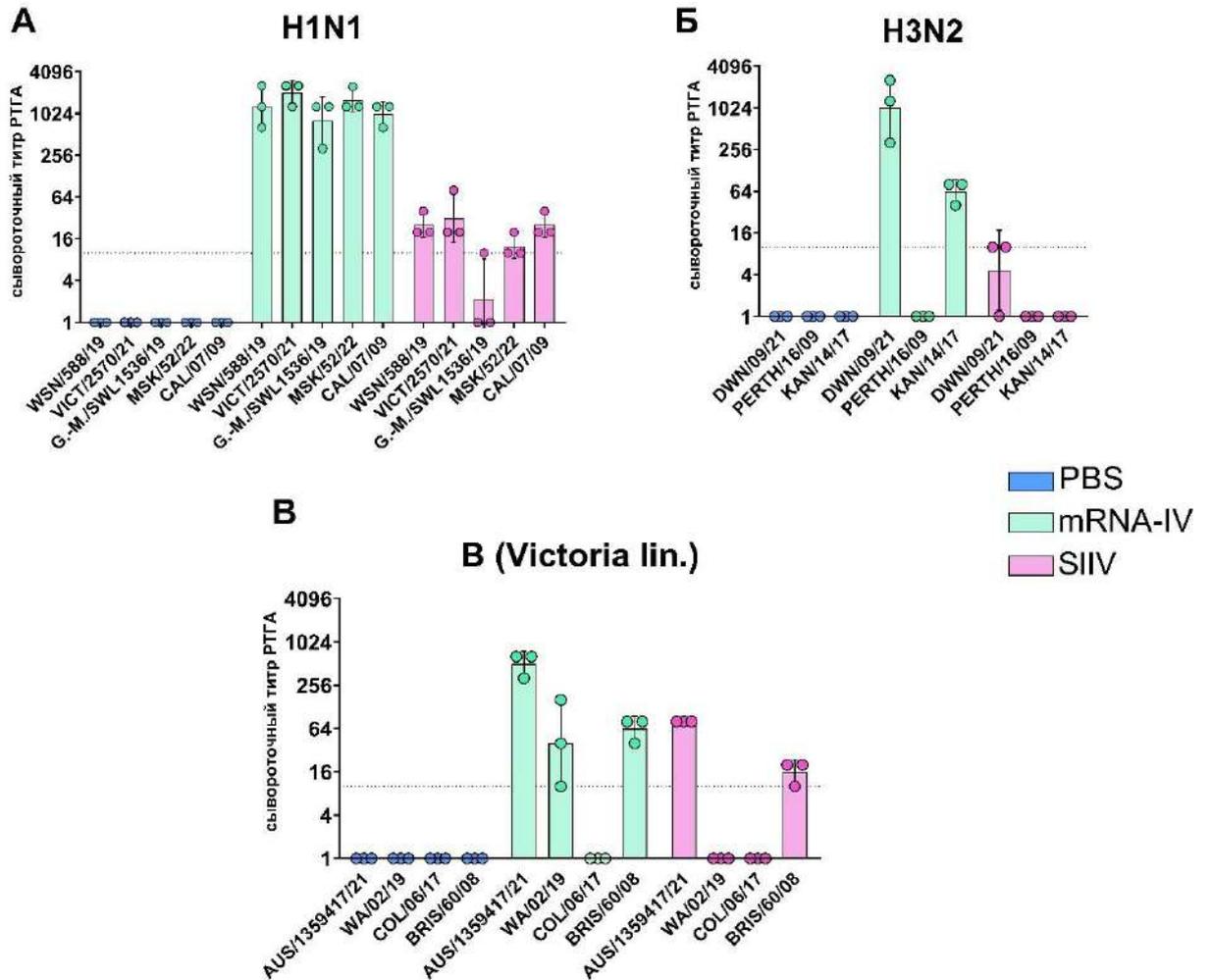


Рисунок 25 – Оценка кроссреактивности иммунного ответа методом РТГА. А – результаты РТГА с штаммами группы А подтипа H1N1 (*Wisconsin/588/2019*, *Guangdon-Maonan/SWL1536/2019*, *Moscow/52/2022*, *California/07/2009*), Б – результаты РТГА с штаммами группы А подтипа H3N2 (*A/Darwin/6/2021*, *A/Perth/165/2009*, *A/Kansas/14/2017*), В – результаты РТГА с штаммами группы В (линия Виктория – *Austria/1359417/2021*, *Washington/02/2019*, *B/Colorado/06/2017*, *B/Brisbane/60/2008*), где mRNA-IV – трехвалентный мРНК-препарат, SIIV – расщеплённая инактивированная вакцина от гриппа, PBS – фосфатно-солевой буферный раствор. Данные являются репрезентативными для одного эксперимента и выражены как геометрические средние значения со стандартным отклонением. Адаптировано из [169].

Для штаммов вируса гриппа А H1N1, которые мы использовали (Wisconsin/588/2019, Victoria/2570/2021, Guangdong-Maonan/SWL1536/2019, Moscow/52/2022, California/07/2009), иммунный ответ показал широкую перекрёстную активность в группе животных, иммунизированных мРНК. Средние геометрические титры РТГА к штаммам H1N1 составили от 1:806 (против антигена Guangdong-Maonan/SWL1536/2019) до 1:2032 (рисунок 25 А). Значимого снижения титров РТГА не отмечалось даже в отношении филогенетически отдаленного пандемического штамма A/California/07/2009, где среднее значение составило 1:1015 (рис. 25 А). Иммуногенность препарата SIV существенно уступала показателям mRNA-IV: средний титр к антигену Victoria/2570/2021 в группе контроля не превышал 1:31, что более чем в 60 раз ниже аналогичного показателя в группе мРНК-препарата.

Для моновалентного препарата H1-мРНК исследование перекрестной реактивности иммунного ответа показало схожие результаты (рисунок 26).

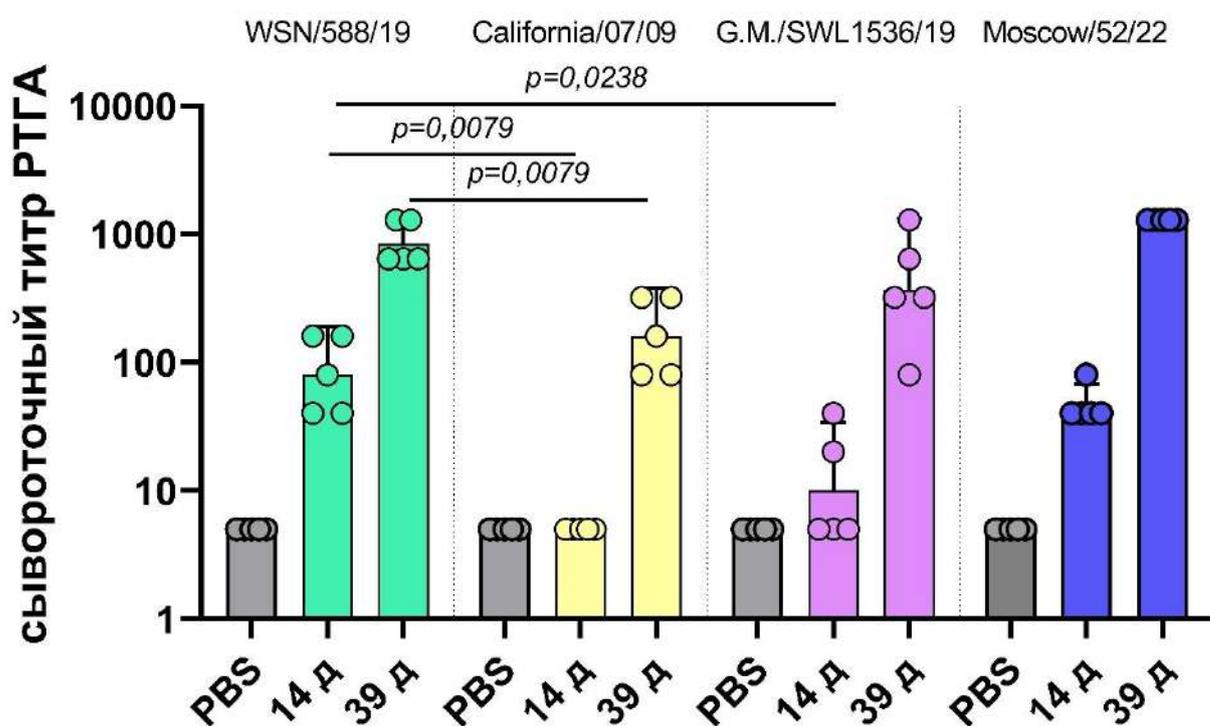


Рисунок 26 – Иммуногенность препарата H1-мРНК (доза 2,5 мкг на мышь) по отношению к гетерологичным штаммам вируса гриппа А H1N1 на мышях. Титры РТГА определяли в сыворотке мышей, иммунизированных H1-мРНК (n=5), с использованием антигенов гриппа четырех различных штаммов вируса гриппа А

H1N1 (A/Wisconsin/588/2019 (100% гомологии аминокислотных последовательностей HA), A/California/07/2009 pdm (95,2% идентичности HA), A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (98,6% идентичности HA), A/Moscow/52/2022 (98,4% идентичности HA) на 14 и 39 день после первой дозы. Данные являются репрезентативными для одного эксперимента и показаны как геометрические средние значения \pm SD. Данные сравнивали с использованием критерия Манна-Уитни.

Анализ антигенных свойств компонента НЗ выявил закономерное снижение титров к штамму A/Kansas/14/2017 (средний геометрический титр — 1:63) и отсутствие сероконверсии к A/Perth/165/2009. При этом сохранялась высокая активность в отношении серологически близкого штамма A/Darwin/6/2021 (1:1015, рис. 26 Б). В тестах с гетерологичными штаммами вируса гриппа В (B/Washington/02/2019, B/Colorado/06/2017, B/Brisbane/60/2008) наблюдалось снижение титров антител в обеих группах (мРНК и SIV) относительно гомологичных значений (рисунок 26 В). В группе мРНК-препарата титры к антигенам Washington/02/2019 и B/Brisbane/60/2008 снизились в 12 и 8 раз соответственно, в то время как в группе SIV титры к B/Brisbane/60/2008 упали более чем в 30 раз, а ответ к Washington/02/2019 не достигал предела обнаружения. К антигену B/Colorado/06/2017 специфические антитела отсутствовали в обеих группах.

Для верификации гипотезы о вкладе антител к консервативным доменам гемагглютинаина (НА) в формирование широкого спектра перекрестной защиты был проведен ИФА-анализ сывороток (n=6, 35-е сутки после вакцинации). В качестве мишеней использовали модифицированный тримеризованный стволовой домен НА (A/Brisbane/59/2007) и головной домен HA1 (A/California/04/2009). Результаты подтвердили статистически значимое превосходство мРНК-платформы над SIV по уровню антител к обеим субъединицам НА (рисунок 27), что указывает на способность мРНК-вакцин индуцировать более выраженный ответ к консервативным эпитопам. вируса.

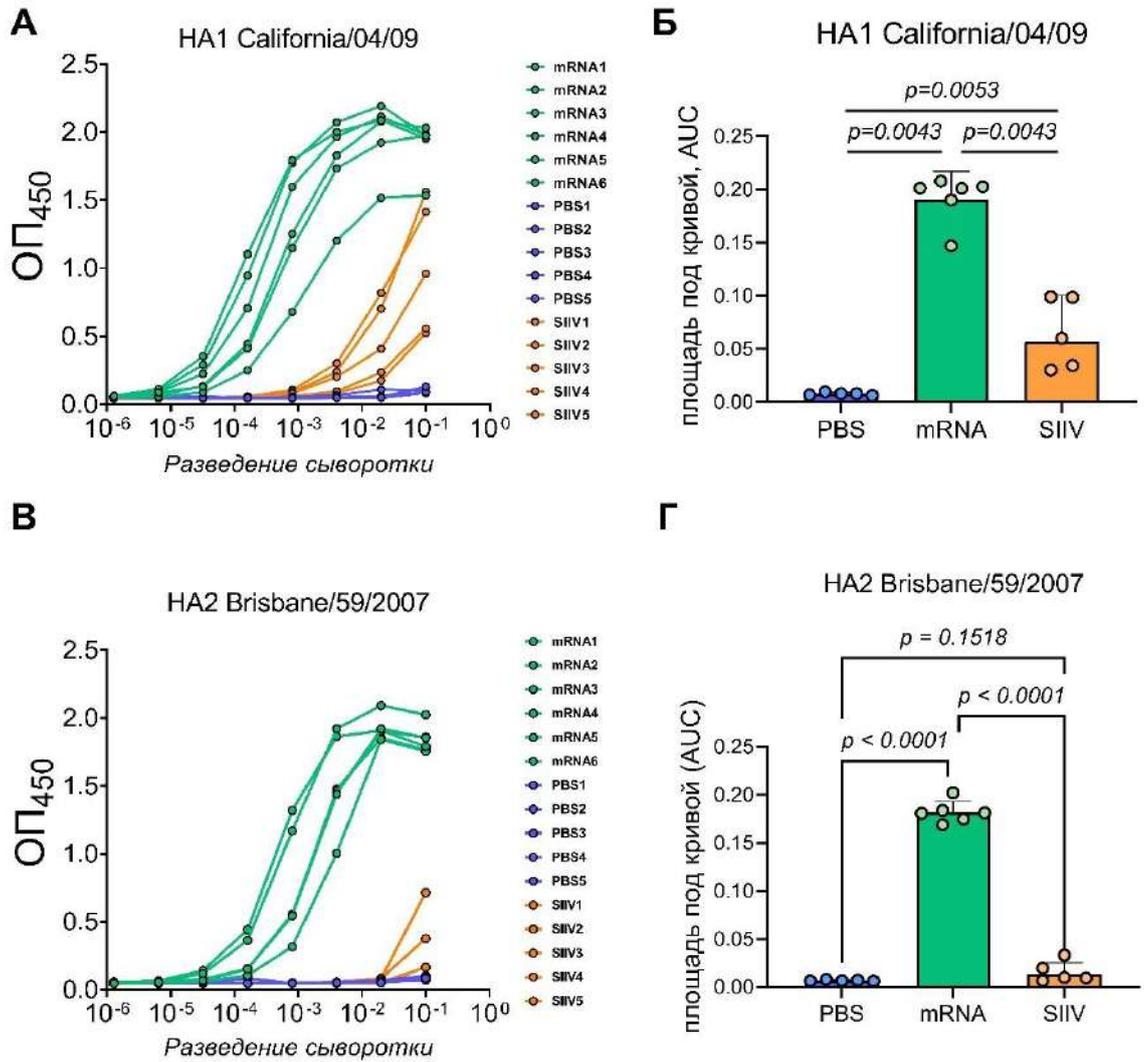


Рисунок 27 - Уровни связывающих антител IgG к головному и стеблевому доменам гемагглютинаина вируса гриппа А, после иммунизации мышей линии BALB/c трёхвалентным мРНК-препаратом в дозе 5 мкг на мыш. А и В - репрезентативные кривые ИФА уровней антител к головному (субъединица HA1 вируса гриппа А H1N1 A/California/04/2009) и стеблевому (модифицированный тримерный HA2 вируса гриппа А H1N1 A/Brisbane/59/2007) доменам HA соответственно. Б и Г - те же данные представлены как геометрические средние площади под кривыми ИФА и сравнены с помощью критерия Манна-Уитни. Адаптировано из [169].

Анализ средних геометрических значений площади под кривой титрования (AUC) выявил статистически значимые различия между группой мРНК-

вакцинации и контрольными группами (PBS и SIV) в ИФА с обоими антигенными детерминантами НА (рис. 27 Б, Г). Сравнительная оценка конечных титров специфических антител продемонстрировала выраженное преимущество мРНК-платформы над инактивированной сплит-вакциной: уровень антител к головному домену (НА1) был выше в 100 раз ($p=0,0043$), а к консервативному стволочному домену – в 1000 раз ($p<0,0001$ согласно критерию Манна-Уитни).

Таким образом, углубленный анализ иммунного ответа на мРНК-препарат в сравнении с расщеплённой инактивированной вакциной показал в целом более выраженный иммунный ответ как на иммунодоминантный вариабельный головной домен НА, так и на консервативный стволочной домен НА. При одинаковом количестве сорбируемого на плашке антигена для проведения ИФА, в сыворотках мышей, иммунизированных мРНК-препаратом антительный ответ на оба домена НА в среднем одинаковый, несмотря на различную гомологию антигенов, использованных в ИФА по отношению к закодированным в мРНК. В то время как для расщеплённой инактивированной вакцины замечен явный перевес антительного ответа в сторону иммунодоминантного головного домена, и маловыраженный ответ на консервативный стволочной домен. В рамках разработки универсальных противогриппозных вакцин индукция иммунного ответа к консервативным эпитопам гемагглютинина приобретает критическое значение, позволяя преодолеть проблему постоянного антигенного дрейфа вируса. Способность мРНК-платформы эффективно стимулировать выработку антител к стабильным участкам НА (в частности, к стволочному домену) является ее существенным преимуществом перед традиционными методами иммунопрофилактики.

3.3. Оценка эффективности мРНК композиций на животных моделях гриппозной и коронавирусной инфекции

В данном разделе описаны результаты изучения эффективности разработанных препаратов в двух комбинациях на животной модели гриппозной и коронавирусной инфекций.

3.3.1. Эффективность трехвалентного мРНК-препарата, на модели гриппозной инфекции у мышей

Для оценки протективности иммунного ответа, вызванного вакцинацией трёхвалентным препаратом мРНК-ЛНЧ (H1N1 A/Wisconsin/588/2019, H3N2 A/Darwin/9/2021, B/Austria/1359417/2021), был проведён эксперимент с использованием модели летальной гриппозной инфекции на животных. Эта модель включала заражение мышей BALB/c, вакцинированных по выбранной схеме адаптированным к мышам вирусом гриппа А H1N1 A/Victoria/2570/2019. Дизайн эксперимента представлен на рисунке 28 А.

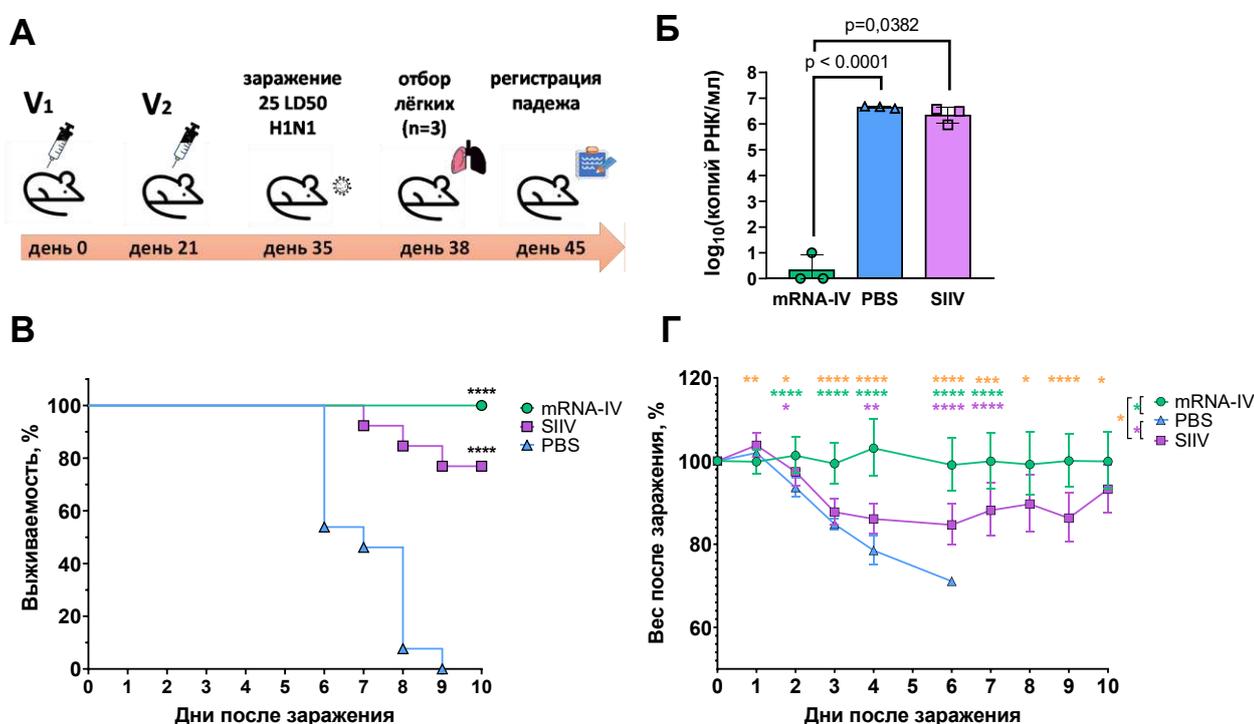


Рисунок 28 – Оценка протективной активности трехвалентного мРНК-препарата от заражения антигенно близким штаммом вируса гриппа А H1N1 у мышей. А - схема эксперимента по заражению. Б – результаты определения вирусной нагрузки, В – результаты наблюдений за выживаемостью, Г – результаты наблюдений за динамикой веса животных. Данные являются репрезентативными для одного эксперимента и показаны как геометрические средние значения \pm SD. Сравнения производились с использованием теста Мантеля-Кокса с тестом множественного сравнения Данна для анализа выживаемости и тестом множественного сравнения Тьюки для анализа различий

потери веса между группами. Данные по вирусной нагрузке сравнивались с использованием теста Манна-Уитни. Критерий значимости отличий p показан звездочками, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$, **** - $p < 0,0001$. Адаптировано из [169].

В эксперименте были предусмотрены группы сравнения: отрицательный контроль (введение PBS) и активный контроль (иммунизация SIV в дозе 1/10 от человеческой). Согласно дизайну эксперимента (рисунок 28 А), через 14 суток после ревакцинации проводили интраназальное заражение животных адаптированным штаммом вируса гриппа H1N1 pdm09 (A/Victoria/2570/2019) в дозе 25LD50. Гомология аминокислотной последовательности НА используемого штамма с вакцинным компонентом составляла 99,8%.

На 3-и сутки после инфицирования проводили количественный анализ вирусной нагрузки в гомогенатах легких методом ОТ-ПЦР с нормировкой по референсному гену PDK1. В группе мРНК-вакцинации средний уровень вирусной РНК составил 3,5lg копий/мл, что существенно ниже показателей в группах PBS и SIV (6,65 и 6,4 lg копий/мл соответственно; рисунок 28 Б).

Анализ выживаемости показал, что в группе отрицательного контроля полная гибель животных наступила к 9-м суткам (кумулятивная летальность 100%). В группе SIV летальность составила 23%, тогда как в группе мРНК-IV гибели животных зафиксировано не было (выживаемость 100%). Несмотря на то, что оба вакцинных препарата обеспечивали статистически значимую защиту от летальной инфекции ($p < 0,0001$ относительно PBS), между вакцинными препаратами достоверных различий по критерию выживаемости выявлено не было.

Мониторинг массы тела выявил выраженную потерю веса у животных группы PBS начиная со 2-х суток после заражения (рисунок 28 Г). В группе SIV снижение массы тела наблюдалось до 3-х суток с последующим восстановлением. В группе животных получивших мРНК-препарат потери веса не зарегистрировано. Примечательно, что на 1-е сутки в группе SIV отмечался кратковременный прирост массы (3%), однако со 2-х по 10-е сутки эксперимента минимальные

колебания веса и стабильное клиническое состояние были характерны преимущественно для группы мРНК-IV.

3.3.2. Эффективность комбинированного мРНК-препарата на мышах в экспериментах по заражению вирусом гриппа и коронавирусом

Способность комбинированного препарата на основе мРНК защищать иммунизированных животных от летального исхода проверялась в экспериментах на мышинной модели вирусной инфекции, вызванной вирусом гриппа А (H1N1) Victoria/2570/2019, адаптированным к мышам. Также изучали способность комбинированного мРНК-препарата защищать мышей от высокой вирусной нагрузки в лёгких при заражении их штаммом коронавируса SARS-CoV-2 EG.5.1.1 (GISAID EPI_ISL_18543695). Для этого самцы мыши трансгенной линии B.6Cg-Tg(K18-ACE2), возрастом 4-5 недель были вакцинированы согласно двукратной схеме, приведённой на рисунке 29 А.

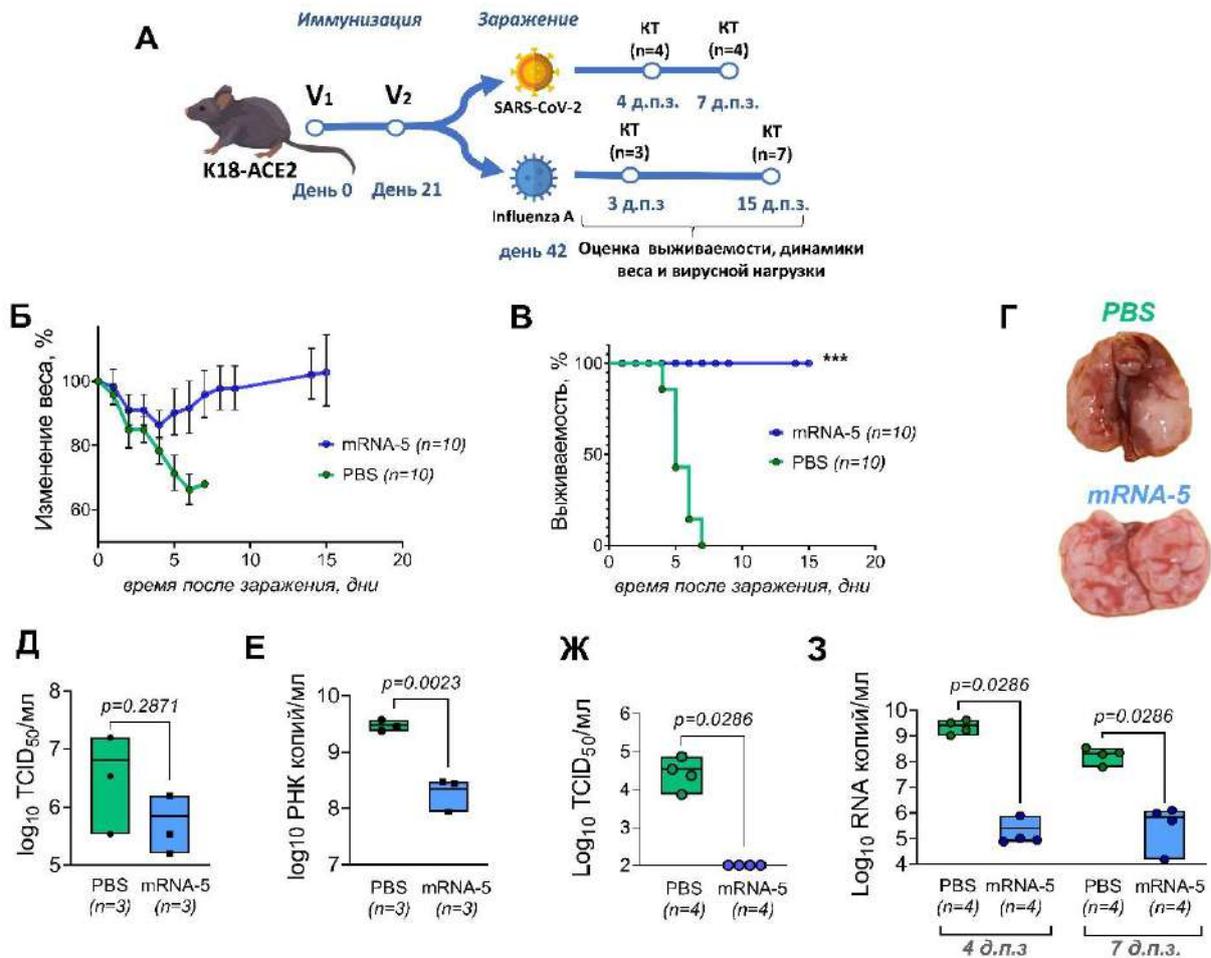


Рисунок 29 – Эффективность комбинированного мРНК-препарата. А – схема эксперимента. Б - динамика потери веса после заражения, В – результаты наблюдений за выживаемостью животных, Г – фото лёгких, изолированных у мышей, на 3-й день после заражения вирусом гриппа, Д – результаты определения жизнеспособного вируса гриппа в лёгких на 3-й день после заражения, Е – результаты определения копий генома вируса гриппа на 3-й день после заражения, Ж – результаты определения жизнеспособного вируса в лёгких на 4-й день после заражения, З - результаты определения копий генома вируса SARS-CoV-2 на 4-й и 7-й дни после заражения. Сравнение данных по выживаемости производили, используя тест Мантеля-Кокса. *** - критерий значимости $p \leq 0,001$. мРНК-5 – пятивалентный мРНК-препарат, PBS – фосфатно-солевой буферный раствор. Адаптировано из [168].

Одна доза на мышь пятикомпонентной вакцины состояла из 5 мкг каждой мРНК, кодирующих белки вирусов гриппа и коронавируса. Животным из контрольной группы был введён фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Спустя 21 день после полной схемы вакцинации мыши были заражены отдельно вирусом гриппа и коронавирусом SARS-CoV-2 EG.5.1.1 (рисунок 29 А). Доза вируса гриппа А (H1N1) Victoria/2570/2019 составляла 20 LD₅₀ на животное. После заражения вирусом гриппа наблюдали за выживаемостью и динамикой потери веса у мышей, а также на 3 день после заражения произвели вскрытие трёх животных для анализа вирусной нагрузки в лёгких. Визуально при вскрытии были заметны очаги некроза лёгочной ткани у мышей из контрольной группы (PBS), в то время как лёгкие животных вакцинированных мРНК-5 препаратом визуально не имели очевидных очагов некроза (рисунок 29 Г). В контрольной группе мышей, получивших PBS, наблюдали гибель всей группы на 7 день после инфицирования вирусом (рисунок 29 В). В то же время группа, вакцинированная мРНК-5 препаратом, демонстрировала 100% выживаемость. Что касается динамики веса мышей, в группе мРНК-5 наблюдали падение веса в среднем на 10% за первые 4 дня после инфицирования, после чего вес мышей восстановился к 9 дню и продолжил расти до конца наблюдений (рисунок 29 Б). Как показали результаты анализа вирусной нагрузки в лёгких на 3 день после заражения, вакцинация мышей комбинированным препаратом способствует значимо более низкому содержанию вируса гриппа в лёгких (рисунок 29 Д, Е)

Модель коронавирусной инфекции на мышах предусматривала интраназальное заражение вакцинированных мышей линии B.6Cg-Tg(K18-ACE2) вирусом SARS-CoV-2 EG.5.1. линии Омикрон (10^6 TCID₅₀ на мышь). Далее, спустя 4 и 7 дней после заражения, животные, вакцинированные пятивалентной вакциной, и животные из контрольной группы были эвтаназированы для изоляции лёгких и отбора крови. Согласно многим исследованиям, штаммы коронавируса, принадлежащие линии Омикрон, не показывают 100% летальность на мышинной модели, этим обуславливается выбранная нами схема проверки эффективности мРНК-вакцины. В полученных биологических образцах (гомогенатах лёгких) были

определены вирусная нагрузка и цитопатическая инфекционная доза вируса (TCID₅₀), результаты представлены на рисунке 29 Ж, 3. На 7-й день при анализе TCID₅₀ жизнеспособный вирус SARS-CoV-2 в лёгких контрольных и вакцинированных мРНК-5 животных не был обнаружен. При этом лёгкие животных из контрольной группы при препарировании были с признаками некроза тканей по всему органу. Одновременно, помимо лёгких, у мышей на 4-й и 7-й дни была отобрана кровь для анализа гематологических показателей крови. Значимые отличия удалось обнаружить при сравнении двух параметров у групп мышей, получивших PBS и mRNA-5 – относительное число эозинофилов (EOS) и ядросодержащих эритроидных клеток (NRBC, рисунок 30).

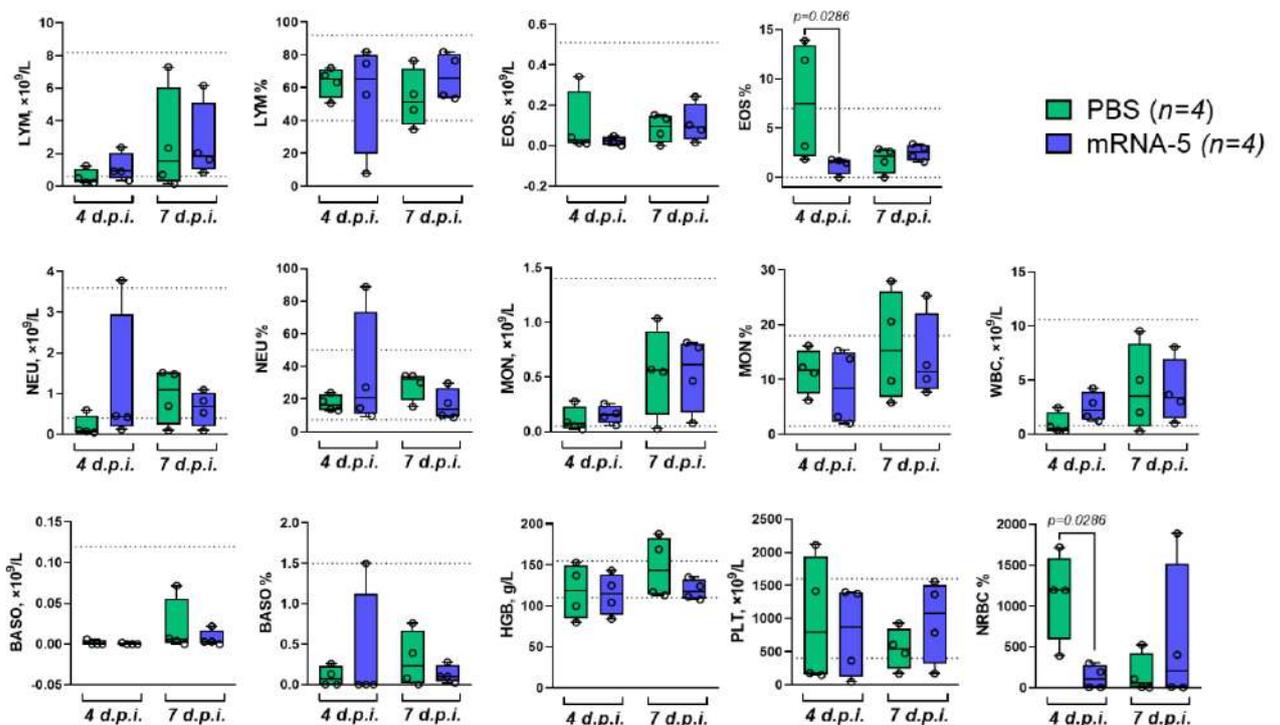


Рисунок 30 – Гематологические исследования цельной крови мышей на 4-й день после заражения коронавирусом в экспериментах по эффективности мРНК-5 вакцины на K18-hACE2 мышах. Сравнение групп проводили, используя непараметрический тест Манна-Уитни. мРНК-5 – комбинированный мРНК-препарат, PBS – фосфатно-солевой буферный раствор. Пунктирные линии обозначают диапазон значений нормы для мышинной сыворотки на приборе Smart V5 Vet laboratory.

Гематологические показатели крови при коронавирусной инфекции, согласно клиническим наблюдениям, могут иметь прогностическое значение для определения возможных рисков тяжелого течения заболевания у людей [15; 216]. Поэтому мы провели исследования крови у мышей на 4-й и 7-й дни после заражения коронавирусом. Определение гематологических показателей у мышей при моделировании коронавирусной инфекции редко встречается в публикациях. Известно лишь, что в норме ядродержащие эритроидные клетки отсутствуют в периферической крови. Наличие NRBC в крови человека связано с неблагоприятными исходами у тяжелобольных пациентов с коронавирусной инфекцией [222]. Согласно полученным нами результатам NRBC отсутствовали в крови мышей, которым вводили комбинированный мРНК-препарат, что ещё раз подтверждает защитное действие этого препарата.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка современной высокотехнологичной платформы на основе мРНК открывает новые возможности как в области вакцинопрофилактики, так и терапии. Некоторые зарубежные разработки уже применяются по всему миру, только фармацевтическая компания Pfizer/BioNTech на 2022 год выпустил более 3,7 млрд доз вакцины Комирнати для профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19 [265]. Однако, большинство препаратов на основе мРНК пока что находятся на разных стадиях доклинических и клинических исследований. В России пока что нет ни одного зарегистрированной вакцины на основе мРНК-платформы, но разработки активно проводятся рядом научных коллективов.

Данная диссертационная работа включает разработку некоторых существенных аспектов вакцинной мРНК-платформы, основные составляющие которой изучались в рамках выполнения государственных заданий и продолжают активно исследоваться в различных приложениях в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России. В работе приводится экспериментальное обоснование выбора некоторых компонентов получения синтетической мРНК. Полученные результаты разработки платформы, касающиеся кэпирования, поли(А)-тракта, модифицированных нуклеотидов, в целом хорошо согласуются с данными, описанными в литературе.

Процесс создания кандидатных мРНК-препаратов для профилактики гриппа и коронавируса SARS-CoV-2 при выполнении диссертационной работы показал, что стадия дизайна и оптимизации ДНК-вектора является важным и необходимым этапом в самом начале разработки вакцинного препарата. В нашей работе продемонстрированы результаты подбора ДНК-вектора, обеспечивающего стабильный поли(Т) тракт в ДНК-матрице. Используя более стабильный вектор рJAZZ совместно с подходом сегментирования поли(А)-тракта, удалось добиться наличия стабильного поли(Т)-тракта в конструкциях, кодирующих спайк-белок коронавируса SARS-CoV-2, не меняющегося при наработке плазмиды, что подтверждалось секвенированием после каждой ее наработки. Полученные

конструкции, кодирующие гликопротеины вирусов гриппа, тем не менее несли более короткий поли(А)-тракт (80А) по сравнению с конструкциями, кодирующими люциферазу светлячка и спайк белок коронавируса (110А), но данная длина поли(А)-тракта (80А) стабильно сохранялась при накоплении биомассы *E.coli* и воспроизводилась от партии к партии. Дальнейшая проверка влияния длины поли(А)-тракта на иммуногенность мРНК-препарата, кодирующего HA A/H1N1, показала отсутствие значимых отличий между молекулами мРНК, имеющими поли(А)-тракт 80А и 110А, что позволило проводить дальнейшую разработку с имеющимися конструкциями. Очень важно было добиться стабильности поли(А)-тракта в молекуле мРНК, так как препараты, лишённые поли(А)-тракта на мышах показывают недетектируемый гуморальный иммунный ответ. Однако, в контексте создания мультивалентной вакцины от гриппа и новой коронавирусной инфекции для трансфера данной вакцинной платформы на производство, вероятно, имеет смысл получить конструкции всех антигенов в едином векторе с одинаковой длиной поли(А)-тракта, что облегчит контроль качества препарата.

Немаловажным вопросом в разработке мРНК-препаратов является использование модифицированных нуклеозидов для синтеза мРНК. Это ещё одно из особенностей, связанных с мРНК-платформой, разработанное Каталин Карико и Дрю Вайсманом и удостоенно Нобелевской премии по физиологии и медицине в 2023 г. Модифицированные нуклеозиды используются во время синтеза мРНК для снижения стимуляции молекулой мРНК врождённых иммунных механизмов через различные PAMP рецепторы. Однако, есть различные исследования, бросающие тень на использование модифицированных оснований. Например, было показано незначительное влияние модифицированного основания N1-метил-псевдоуридина на точность присоединения аминокислот в зависимости от положения кодона и тРНК как *in vitro*, так и в клетках человека [175]. Более того, вышло исследование, доказывающее влияние N1-метил-псевдоурина в составе мРНК на сдвиг рамки аминокислотной последовательности +1 в определённых скользящих участках, что ведёт к синтезу нового антигена помимо основного закодированного в мРНК [179]. В данной диссертационной работе не было задачи опровергнуть результаты этих

исследований, одной из задач было на основе клеточных тестов по эффективности трансляции мРНК, кодирующей люциферазу, выбрать модифицированный нуклеозид, с которым далее продолжать работу. Эта задача была выполнена, результат был достаточно ожидаемый – наилучший профиль активности люциферазы на культуре клеток НЕК293 показал препарат мРНК, синтезированный со 100% заменой уридина на N1-метилпсевдоурин. Данная модификация была использована для приготовления кандидатных вакцинных препаратов.

Кэпирование – важнейший этап синтеза мРНК, который существенно влияет на её стабильность, эффективность трансляции и общую эффективность в различных областях применения. мРНК с кэп1-структурой обычно демонстрирует более высокую эффективность трансляции и большую стабильность по сравнению с мРНК кэп0 [180]. Это во многом связано со способностью мРНК с кэп1-структурой лучше обходить обнаружение врожденной иммунной системой. В данной работе приведены результаты сравнения двух типов ко-транскрипционного кэпирования мРНК с помощью реагентов ARCA и CleanCap с получением на выходе молекул мРНК с со структурами кэп0 и кэп1 соответственно. При отсутствии достоверной разницы в эффективности трансляции на клетках (*in vitro*), испытания *in vivo* на мышах показали явные преимущества мРНК кэп1 над мРНК кэп0.

Распределение и длительность экспрессии кодируемого в мРНК репортерного белка (люциферазы светлячка) показано при внутримышечном введении препаратов мышам. Полученные данные позволяют заключить, что такой способ доставки белка в макроорганизм приводит к его экспрессии преимущественно в печени и месте введения, а также способствует синтезу репортерного белка в региональном лимфатическом узле, в селезёнке, что может способствовать лучшему иммунному ответу. Успешная мРНК-вакцина должна вызывать сильный иммунный ответ, обеспечивающий защиту, для чего необходимо, чтобы она распространялась в критически важных тканях [114]. ЛНЧ имеют размер (<200 нм), позволяющий им взаимодействовать с клетками в месте инъекции или

проникать через лимфатическую систему в лимфатические узлы. Согласно исследованию Хассета и др. после внутримышечного введения препарата мРНК-ЛНЧ, кодирующей зелёный флуоресцирующий белок GFP, в месте инъекции у грызунов белок легко обнаруживается в инфильтрирующих клетках, соединительной и жировой ткани [99]. Также с помощью высокопроизводительной многопараметрической проточной цитометрии им удалось определить, какие иммунные клетки были положительными по экспрессируемому белку в регионарных лимфатических узлах через 24 часа после введения. Экспрессируемый белок в основном содержался в антигенпрезентирующих клетках, в частности в макрофагах. Макрофаги играют ключевую роль в формировании иммунного ответа посредством взаимодействия с Т- и В-клетками.

Предварительная проверка функциональности мРНК, полученной в результате работ по клонированию ДНК, наработки ДНК-матрицы, *in vitro* синтезу мРНК, осуществлялась путём трансфекции клеточной линии HEK293, с последующим иммуоцитохимическим окрашиванием [169]. Результаты показали наличие кодируемого в мРНК белка гемагглютинина вируса гриппа А/Н1N1 в клетках при наружном и внутриклеточном окрашивании, что позволило далее переходить к экспериментам на животных для определения иммуногенности и эффективности полученных кандидатных мРНК-препаратов.

В диссертационной работе представлены результаты изучения иммуногенности как монопрепаратов мРНК по отдельности (мРНК кодирующие гемагглютинины вирусов гриппа на основе антигенного состава, рекомендованного ВОЗ для использования в сезонных вакцинах в северном полушарии в 2022-2023 гг.: А/Wisconsin/588/2019 (H1), А/Darwin/6/2021 (H3) и В/Austria/1359417/2021 (IBV, линия Виктория), В/Massachusetts/2/2012 (линия Ямагата) и спайк-белок коронавируса SARS-CoV-2 XBB.1) так и их сочетаний (трёхвалентная гриппозная вакцина и пятивалентная комбинированная вакцина от гриппа и коронавируса). В качестве контроля использовалась четырехвалентная инактивированная расщеплённая вакцина, которая имеет аналогичный состав антигенов. В основной серии экспериментов мы использовали вакцины в 1/10 дозы для человека

(установленной в случае инактивированной сплит-вакцины и предполагаемой для мРНК-вакцины), чтобы можно было сравнить платформы при оценке иммуногенности у мышей. Иммуногенность гриппозных компонентов определяли с использованием метода РТГА. Этот метод является золотым стандартом для оценки иммуногенности вакцин против гриппа и эффективности иммунитета против новых вариантов вируса.

На основе изучения иммуногенности моновалентных препаратов в двух дозировках (2,5 и 5 мкг на мышь, что соответствовало 0,125 и 0,25 мг/кг мРНК), предпочтение было отдано в пользу большей (5 мкг на мышь) в силу того, что для неё иммуногенность значимо выше в сравнении с дозой 2,5 на мышь. Поэтому во всех последующих экспериментах использовалась доза 5 мкг мРНК на мышь.

Результаты исследования трёхвалентного мРНК-препарата для профилактики гриппа, который был получен путём смешивания трёх отдельно упакованных мРНК в соотношении 1:1:1, показали, что уровень гуморального ответа в РТГА на инъекцию мРНК-вакцины был в среднем в 10-100 раз выше, чем на инактивированную сплит-вакцину для всех подтипов. Эти данные коррелируют с более ранними исследованиями комбинированной мРНК-вакцины [81]. При анализе иммуногенности методом ИФА (в отношении H1N1pdm) для группы мышей, иммунизированных комбинированным мРНК-препаратом, как и в нашем случае, наблюдались в 10-100 раз более высокие уровни антител (в зависимости от дозы мРНК) по сравнению с этим значением в группе животных, вакцинированных квадριвалентной инактивированной вакциной (в дозе 1,5 мкг). Уровни ответа антител на инактивированную вакцину, полученные в наших экспериментах, хорошо согласуются с данными исследования расщеплённой вакцины [287]. Для дозы 1,5 мкг каждого антигена в отдельности были получены титры РТГА, сопоставимые с полученными в нашей работе для квадριвалентной вакцины (титры РТГА к H1N1 составили в среднем около 1:90, к H3N2 - около 1:500, к В (линия Victoria) - около 1:30). Можно предположить, что эта разница между иммунным ответом на мРНК и инактивированную расщеплённую вакцину может быть связана с дозой доставленного антигена. Так, в случае инактивированной

вакцины доза отдельных антигенов составляла 1,5 мкг, тогда как для мРНК-препарата доза каждой мРНК составляла 5 мкг. К сожалению, не существует адекватного метода количественного сравнения антигена, доставленного с использованием различных вакцинных платформ. Доставка антигенного белка и его аналога в форме мРНК изначально дает разную фармакокинетику. Согласно одному из исследований, основанному на результатах эксперимента *in vitro*, 1 пмоль спайк белка коронавируса был получен с использованием 6 пмоль вакцины мРНК в течение 24 часов во время трансфекции культуры клеток ВНК [239]. Согласно нашим более ранним экспериментам, когда в мышь доставляли 10 мкг мРНК (приблизительно 20 пмоль), кодирующей однодоменное антитело В11 против ботулинического токсина, удалось достигнуть максимальной концентрации антител в сыворотке мыши равной 99 нг/мл, что соответствует примерно 2,35 пмоль антитела на средний объем сыворотки мыши весом 18 г [191]. Оба примера показывают, что количество антигена, синтезируемого с целевой мРНК, в 5-10 раз меньше по сравнению с количеством использованной мРНК. Таким образом, более вероятно, что преимущество мРНК в контексте сформированного гуморального ответа обусловлено следующими факторами: 1) более высокой иммуногенностью, достигаемой выбранными дозами, 2) приобретением нативной конформации антигеном, доставленным в виде мРНК, в результате непосредственного синтеза в организме животного, в отличие от антигенов расщепленных вакцин, доставляемых в очищенной форме.

Несмотря на то, что в работе не проводились направленные изменения мРНК или кодируемого белка для преодоления антигенного импринтинга, удалось отметить наличие детектируемого перекрёстного иммунного ответа для созданных препаратов мРНК. Перекрёстный иммунный ответ внутри субтипов вируса гриппа является одной из целей разрабатываемых универсальных вакцин от гриппа. В работе выдвинуто предположение, что перекрестная реактивность иммунного ответа по отношению к гетерологичным штаммам вируса гриппа может быть достигнута за счет особенностей платформы мРНК. Вирусный антиген синтезируется непосредственно в клетках иммунизированного организма,

приобретая естественную пространственную организацию (фолдинг) и степень гликозилирования. Он подвергается процессингу в протеасомах и презентруется комплексами МНС I класса. Кроме того, секретлируемые клеткой антигены могут быть захвачены другими клетками в том числе ДК, деградированы внутри эндосом и презентованы в составе МНС класса II хелперным Т-клеткам [42]. В результате исследования перекрёстного иммунного ответа при анализе сывороток иммунизированных мышей в РТГА с гетерологичными по отношению к вакцинным штаммам вирусами гриппа, мы продемонстрировали более широкую активность сывороток для группы мышей, вакцинированных мРНК-препаратом, по сравнению с активностью сывороток мышей, получавших расщепленную инактивированную вакцину против гриппа. Иммунный ответ на штамм B/Washington/02/219, который был гетерологичен штамму в составе инактивированной вакцины, находился на уровне, превышающем нижний предел обнаружения, и увеличивался после повторной вакцинации. Однако в группе животных, иммунизированных расщепленной вакциной, сывороточные титры РТГА были ниже LOD во все временные точки, и не наблюдалось усиления иммунитета при повторной вакцинации. Результаты указывают на более высокий потенциал формирования кросс-специфического гуморального иммунного ответа композициями мРНК. Расширенное исследование с четырьмя различными антигенами H1N1 подтвердило эти результаты. Были обнаружены статистически значимые различия в активности сыворотки против эволюционно более далеких вариантов вируса (A/California/07/2009pmd и A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019), особенно заметно выраженные на 14-й день после иммунизации. Однако на 39-й день сыворотки показали высокую активность против всех вариантов; различия в уровне иммунного ответа в гетеро- и гомологичных титрах РТГА были статистически незначимы, а средние титры сывороток варьировались от 1:160 (в случае наиболее отдаленного штамма A/California/07/2009pdm) до 1:1280 (в случае эпидемического штамма A/Moscow/52/22, циркулировавшего в эпидемический сезон 2022–2023 гг. после выпуска вакцины). Эти данные коррелируют с результатами ранее опубликованных работ, в которых было показано наличие связывающих и

нейтрализующих антител против штамма H1N1 (A/Michigan/45/2015 более дистантного относительно вакцинного) в моновалентном мРНК-препарате. Однако против второго, более дистантного штамма H1N1, A/Puerto-Rico/08/1934, наблюдалось двукратное снижение уровня связывающих и отсутствие нейтрализующих антител [23]. Мы продемонстрировали перекрестный иммунитет, обусловленный вакцинацией мРНК против штамма, который появился после обновления состава вакцины для сезона 2022-2023 гг., приобретя 9 замен в аминокислотной последовательности HA (относительно A/Wisconsin/588/2019). Важно отметить, что перекрестная реактивность иммунного ответа на мРНК-препарат достигается за счет кодирования гликопротеинов одного штамма каждого подтипа вируса гриппа. Мы предположили, что перекрестная реактивность иммунного ответа после иммунизации мРНК-препаратом обусловлена более интенсивной индукцией антител, специфичных к консервативным доменам гемагглютинаина. Эта гипотеза была подтверждена с помощью оценки уровней антител к стволочному домену HA [169]. Титры сывороточных антител были в 1000 раз выше у мышей, вакцинированных мРНК, по сравнению с SIV. Рекомбинантный модифицированный тримерный стволочной домен HA (#4900) хорошо известен как иммуноген, приводящий к образованию широко нейтрализующих антител [118] и из-за модификаций имеет низкое сходство в аминокислотной последовательности со стволочным доменом HA, закодированного в мРНК-препарате и HA из инактивированной расщеплённой вакцины (78,9 % сходства для обоих). Что касается титров сывороточных антител к иммунодоминантному головному домену HA, они были в 100 раз выше у мышей, вакцинированных мРНК, по сравнению с SIV. Это может дополнительно обеспечивать количественное и качественное преимущество, увеличивая перекрестную реактивность иммунного ответа. Известно, что головной домен HA имеет некоторые консервативные области, которые, как было показано, являются мишенью для широко нейтрализующих антител [27; 68; 271]. Таким образом, наши результаты показывают, что природа перекрёстного иммунного ответа может быть обусловлена качественными и количественными преимуществами антител, генерируемых вакцинами мРНК по

сравнению с инактивированными расщеплёнными вакцинами. В свою очередь, это может быть связано со способностью платформы мРНК обеспечивать естественную пространственную организацию (фолдинг) и степень гликозилирования белкового антигена. Одновременно с этим есть большие перспективы для направленного изменения кодируемого антигена для улучшения универсальности индуцируемого иммунного ответа, такие исследования проводятся на основе других платформ [14; 101; 181; 255; 273]. Кроме этого, необходимы и возможны исследования феномена антигенного импринтинга на животных, который связан не только с особенностями быстро меняющихся вирусов гриппа, но и с особенностями иммунной системы хозяина. Примеры таких исследований не многочисленны, однако они проводятся, но на более высокоорганизованных животных (нечеловекообразных приматах), которые близки по организации иммунной системы к человеку.

В результате исследования эффективности защиты трёхвалентного мРНК-препарата на животной модели инфекции гриппа с интраназальным заражением 25 LD50 вируса H1N1 (A/Victoria/2570/2019, адаптированного к мышам) мы продемонстрировали защитный эффект как трёхвалентного мРНК-препарата, так и контрольной инактивированной вакцины. В случае мРНК не было зарегистрировано гибели животных в течение всего периода наблюдения, тогда как в группе мышей, которым была введена инактивированная сплит-вакцина, погибло 3 из 10 животных. Эти данные коррелировали с динамикой веса инфицированных животных (для сплит-вакцины потеря веса наблюдалась с 3-го по 9-й день наблюдения), а также вирусной нагрузкой в легких - на 3-й день разница в вирусной нагрузке между группами, получавшими мРНК-композицию и сплит-вакцину, составила 10^6 раз. Нам не удалось найти исследований, в которых изучалась бы протективность мРНК- и сплит-вакцин в рамках сравнительного эксперимента на животных, но есть исследования кандидатов сплит-вакцин, полученных путем производства вируса в клеточной линии MDCK [287]. На 4-й день после заражения вирусом гриппа H1N1 в дозе 10^7 инфекционной дозы культуры клеток 50% (CCID50) наблюдалась потеря веса до 10% в группе мышей, вакцинированных 5

мкг сплит-вакциной, а количество вируса в легких инфицированных мышей, изолированных на 6-й день, составило 10^2 копий вируса/мл по сравнению со 10^5 копий вируса/мл в группе плацебо. Это показательно, что как в нашем случае, так и в исследовании Zhang J. et al. вирус гриппа был обнаружен методом ПЦР в легких животных, вакцинированных инактивированными сплит-вакцинами после заражения [287]. В нашем исследовании в группе мРНК вирусная нагрузка в легких была ниже предела обнаружения, что согласуется с данными, полученными Aevalo S.P. et al. как для 20-валентных, так и для моновалентных вакцин против гриппа H1-мРНК [23]. В легких контрольных мышей, иммунизированных вектором мРНК с люциферазой (плацебо), вирусная нагрузка, определенная с помощью анализа медианной инфекционной дозы культуры ткани 50% (TCID₅₀), составила приблизительно 5×10^4 TCID₅₀/мл, а в группах мышей, иммунизированных монопрепаратом H1-мРНК или 20-валентной мРНК, вирусная нагрузка была ниже предела обнаружения. Что касается результатов гибели животных в группе сплит-вакцины (n = 3), то этот эффект наблюдали исследователи адьювантов для противогриппозных вакцин [254]. При интраназальном введении сплит-вакцины они наблюдали 100%-ную гибель животных к 6-му дню после заражения 10 LD₅₀ адаптированного к мышам вируса гриппа A H1N1 A/California/04/2009. На 3-й день после заражения титр вируса в бронхоальвеолярном лаваже инфицированных мышей составил $6,7 \pm 0,1$ Log₁₀ БОЕ/мл. В целом гибель мышей, иммунизированных сплит-вакцинами против гриппа, после заражения разными дозами вирусов гриппа не является новым явлением. Это отмечалось и в других исследованиях [32; 254]. Наши результаты по сплит-вакцине с точки зрения эффективности защиты вакцинированных мышей от гибели согласуются с опубликованными данными. Однако для доклинических исследований эффективности вакцины против гриппа видится целесообразным проведение дополнительных экспериментов по исследованию эффективности с использованием в качестве инфекционной модели хорьков [120].

Главной целью данной диссертационной работы является получение и исследование комбинированного мРНК-препарата для одновременной

профилактики инфекций, вызванных вирусами гриппа и коронавируса SARS-CoV-2. Разработка и изучение подобных комбинированных вакцин очень важно с точки зрения текущей ситуации по эффективности вакцинопрофилактики и охватам населения вакцинацией от коронавируса и гриппа. На основании результатов всемирной кампании по вакцинации против SARS-CoV-2 очевидно, что антигенный состав вакцины от коронавируса должен быть обновлен в соответствии с исследованием нескольких ключевых свойств новых обозначенных ВОЗ вариантов, вызывающих беспокойство (VOC) [93]. В настоящий момент уже хорошо известны ранние индикаторы необходимости смены антигенного состава вакцин против SARS-CoV-2, включая мутации в белке S, антигенные характеристики, способность текущей вакцины снижать инфицирование и передачу, спектр клинических проявлений, наиболее важным из которых является перекрестная нейтрализующая активность в отношении циркулирующих и новых вариантов VOC [97].

Существует несколько аргументов в пользу комбинированных вакцин против нескольких инфекций: снижение необходимости в многократных инъекциях, упрощение графика иммунизации и минимизация побочных эффектов, сокращение количества визитов к врачу, упрощение мониторинга и хранения вакцин, снижение затрат на вакцинацию, своевременная вакцинация в соответствии с графиком и снижение риска травм от уколов иглой для работников здравоохранения [231]. По данным различных исследований, использование комбинированных вакцин связано с ростом охвата вакцинацией [162; 269]. По данным Роспотребнадзора, охват вакцинацией от гриппа в 2023 году в России достиг 76,5 млн человек [9]. В Российской Федерации с 2024 года, несмотря на наличие обновленной вакцины «Спутник V» [6], вакцинация рекомендуется только группам высокого риска, что приводит к резкому снижению использования вакцины. Аналогичные тенденции наблюдаются и в других странах [9]. Не исключено, что внедрение комбинированной вакцины с компонентами вакцины от гриппа с доказанным профилем безопасности и эффективности, будет способствовать увеличению

охвата вакцинацией от коронавируса, тем самым обеспечивая население защитой от COVID-19.

Ещё одним аргументом в пользу высокой актуальности разработки комбинированной вакцины против гриппа и COVID-19 служит информация о том, что зарубежные аналоги производителей Pfizer/BioNTech и Moderna находятся на 3-й фазе клинических исследований и показывают обнадеживающие результаты иммуногенности на людях, значимо превышая показатели эффективности по сравнению с инактивированными вакцинами [174; 200; 233].

Эксперименты с мультивалентным препаратом от гриппа и коронавируса (мРНК, кодирующие НА четырех вирусов гриппа, A/Wisconsin/588/2019 (H1N1)pmd09, A/Darwin/9/221 (H3N2), B/Austria/1359417/2021 (линия B/Victoria), B/Massachusetts/2/2012 (линия B/Yamagata) и спайковый белок SARS-CoV-2 ХВВ.1) показали, что комбинирование не снижает иммуногенный эффект, вызванный отдельными компонентами. Для компонентов гриппа уровни иммуногенности в анализе РТГА воспроизводили вышеописанные результаты для трёхвалентного мРНК-препарата. Важно отметить, что не было выявлено существенных различий в титрах РТГА между четырехвалентным препаратом, объединяющим (мРНК-4) и пятивалентным комбинированным (мРНК-5), что указывает на отсутствие влияния коронавирусного компонента в составе мРНК-5. Уровень иммуногенности контрольной сплит-инактивированной вакцины против гриппа был значительно ниже в отношении всех четырех антигенов вируса гриппа. Наши результаты согласуются с результатами исследователей из Китая, которые при изучении комбинированной мРНК-вакцины с общей дозой 30 мкг на мышах не обнаружили взаимного влияния компонентов на уровни их иммуногенности [283]. Между тем, комбинированная интраназальная вакцина на основе аденовируса шимпанзе AdC68-HATRBD показала более низкую иммуногенность в РТГА, при этом среднее геометрическое титра не превышала 1:46 после первичной дозы и 1:80 после второй иммунизации против вируса гриппа H1N1 [281]. Относительно иммуногенности коронавирусного компонента вакцины стоит отметить, что комбинированная мРНК-вакцина демонстрирует высокую иммуногенность,

неотличимую от моновалентной вакцины. На момент создания коронавирусного мРНК-компонента доминирующими вариантами Омикрон были сублинии ХВВ (ХВВ.1.5, ХВВ.1.16, ХВВ.1.9.1). В нашей лаборатории была получена конструкция рDNA, кодирующая оптимизированную по кодонам последовательность S-гликопротеина вируса ХВВ.1 для синтеза мРНК. Однако в ходе экспериментальных работ состав циркулирующих штаммов изменился, и к моменту изучения комбинированной вакцины доминирующим стал вариант EG.5.1.1. Этот вариант, впервые появившийся в марте 2023 года, стал доминирующим, приобретя три уникальные мутации в белке шипа относительно ХВВ.1 [87]. Поэтому анализ вируснейтрализации сыворотки мышей был проведен с использованием этих двух вариантов вируса. Было обнаружено, что, несмотря на мутации, приобретенные вариантом Омикрон EG.5.1.1 относительно ХВВ.1, сыворотки мышей, вакцинированных как моновалентными, так и комбинированными формулами мРНК, эффективно нейтрализовали его в одинаковой степени. Возможно, что эти два варианта линии Омикрон недостаточно различаются, чтобы обнаружить снижение титров нейтрализующих антител против нового варианта EG.5.1.1. Однако, согласно исследованию интраназальной комбинированной вакцины на основе аденовируса шимпанзе AdC68-HATRBD в сыворотках вакцинированных мышей наблюдалось снижение титров нейтрализующих антител против эволюционно более поздних вариантов [281].

В результате изучения эффективности комбинированной вакцины против заражения вирусом гриппа она продемонстрировала 100% защитный эффект на модели гриппозной инфекции на трансгенных мышах линии K18-ACE2. При этом та же доза вируса в контрольной группе привела к гибели 100% животных к 7-му дню эксперимента. Вакцинация комбинированной мРНК-вакциной достоверно снижала вирусную нагрузку в легких мышей при заражении как вирусом гриппа, так и коронавирусом. На 3-й день после заражения вирусом гриппа анализ гомогенатов легких у мышей показал достоверно более низкую вирусную нагрузку в группе мышей, вакцинированных комбинированной мРНК-вакциной, по сравнению с мышами из контрольной группы. Аналогичные тенденции

наблюдались на 4-й и 7-й день после заражения коронавирусом у мышей. Однако, в отличие от вируса гриппа, в легких мышей, вакцинированных комбинированной мРНК-вакциной, жизнеспособного вируса обнаружено не было, что согласуется со значительно меньшим числом геномных эквивалентов, определенных методом ОТ-ПЦР по сравнению с контрольной группой.

В настоящей диссертации подчеркиваются преимущества платформы мРНК для создания комбинированных вакцин, поскольку такой способ доставки обеспечивает синтез нативных вирусных антигенов непосредственно в организме хозяина и имеет преимущества перед инактивированными вирусами [168; 169]. Кроме того, существенным преимуществом является отсутствие взаимного влияния на уровень иммуногенности разных компонентов. В то время как некоторые исследования показали, что при одновременной вакцинации людей разными типами вакцин (вакцина на основе мРНК от коронавируса, инактивированная сплит-вакцина от гриппа) наблюдается более низкая иммуногенность, измеряемая в единицах связывания антител (BAU), по сравнению с отдельной вакцинацией от коронавируса. При этом влияние на уровень защиты от симптоматической инфекции COVID-19 и тяжелого течения заболевания не изучалось [67]. В исследовании также не изучались клеточные и молекулярные детерминанты наблюдаемого эффекта, однако авторы предполагают, что такие явления могут быть связаны с ингибированием вакцины мРНК от коронавируса из-за высвобождения интерферонов I типа (IFN I), индуцированного вакцинацией от гриппа. Предполагается, что разработанный комбинированный мРНК-препарат позволит достичь равного эффекта для всех компонентов благодаря единой платформе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Платформа мРНК открыла новую эру создания как профилактических, так и терапевтических препаратов. Исследование её возможностей, преимуществ и недостатков – важные задачи, стоящие перед современными исследователями. Создание вакцинных препаратов нового поколения для профилактики гриппа и коронавируса не теряет свою актуальность, а с годами наоборот приобретает новые цели – задачи получения универсальных, вакцин с широкой кросс-реактивностью, формирующих продолжительный устойчивый иммунный ответ, индуцируемый вакцинацией, остаются не решёнными. Однако результаты новых исследований вселяют надежду на то, что в существенной степени данные проблемы могут быть как раз решены благодаря использованию новых платформ.

В ходе проведённой разработки платформы для получения мРНК-вакцинных препаратов нами были выявлены оптимальные подходы к *in vitro* синтезу мРНК (в т.ч.), обеспечивающие лучшие трансляционные характеристики и иммуногенность таких препаратов при испытании на животных. В экспериментах с использованием конструкций, кодирующих как ген репортерного белка люциферазы светлячка, так и антигенов вирусов гриппа и коронавируса, было оценено влияние таких основополагающих элементов конструкции как копирующие агенты, модификации нуклеотидов, длина поли(А)-тракта.

С помощью современных молекулярно-биологических методов были созданы кандидатные моновалентные вакцинные мРНК-препараты, оценена их трансляционная активность *in vitro* на клетках и иммуногенность на животных, выбраны оптимальные дозы и режимы для иммунизации. Кроме того, на примере одного из моновалентных препаратов (мРНК, кодирующей НА А/Н1N1) была продемонстрирована значительная продолжительность иммунного ответа, достигающая 8 месяца после введения второй дозы препарата.

На животной модели была показана высокая иммуногенность трёхвалентного и четырёхвалентного препаратов мРНК, кодирующих антигены трёх и четырёх вирусов гриппа, соответственно, превосходящая таковую для препарата сравнения

аналогичного антигенного состава (инактивированная расщеплённая четырёхвалентная вакцина от гриппа).

В рамках данной работы впервые было проведено прямое сравнительное исследование мРНК кандидатной трёхвалентной и инактивированной сплит-вакцин на животной модели гриппозной инфекции, в ходе которого были показаны высокие протективные свойства мРНК-препарата, защищающего мышей при заражении 20-кратными дозами LD50 вируса гриппа.

Совокупность рассмотренных фундаментальных и прикладных аспектов разработки мРНК-платформы позволила получить мультивалентный кандидатный вакцинный препарат для одновременной профилактики инфекций, вызванных сезонными вирусами гриппа и коронавирусом. Для полученного комбинированного препарата показано отсутствие ингибирующего взаимного влияния компонентов на иммуногенность и протективность компонентов на мышинной модели. Выживаемость животных, вакцинированных кандидатным исследуемым препаратом в условиях отдельного заражения вирусом гриппа и коронавирусом составила 100% при достоверном снижении титра вируса в лёгких животных по сравнению с контрольными группами, получившими препарат плацебо. В связи с этим, практический потенциал работы заключается в возможности использования полученных результатов при создании кандидатного мультивалентного препарата для использования в будущем.

В заключении стоит отметить, что развитие данной тематики перспективно в контексте создания универсальных вакцин для профилактики гриппа и коронавирусной инфекции. В сочетании с современными биоинформатическими подходами к дизайну вакцинных антигенов мРНК-платформа имеет большой потенциал для создания вакцинных препаратов, максимально приближённых к универсальным.

ВЫВОДЫ

1. Линейный ДНК вектор обеспечивает стабильность сегментированного поли(А)-тракта в конструкциях, кодирующих спайк-белок коронавируса SARS-CoV-2 и гемагглютинин вирусов гриппа.

2. Препараты мРНК в составе липидных наночастиц, несущие кэп1 на 5'-конце мРНК в опытах на мышах транслируются достоверно более эффективно по сравнению с мРНК содержащими кэп0, демонстрируя более чем 10-кратное превышение уровня суммарной люминесценции в месте введения на 3 ч и 100-кратное превышение в печени на 24 ч.

3. Модифицированная мРНК, полученная путём 100% замены уридина на N1-метилпсевдоуридин, обладает преимуществом в уровне трансляции репортерного белка люциферазы светлячка над другими вариантами модификаций (с применением псевдоуридина, 5-метоксиуридина, N6-метиладенозина, 5-метилцитидина и их комбинаций), обеспечивая максимум биолюминесценции на уровне 10^6 RLU *in vitro*.

4. Использование в составе структуры мРНК сегментированного поли(А)-тракта длиной 80А позволяет достигать иммуногенность в отношении гемагглютинина вируса гриппа H1N1, не отличимую по титру РТГА от варианта мРНК с длиной 110А даже после однократной иммунизации.

5. Использование трёх - и четырёхвалентных композиций кандидатных вакцинных мРНК-препаратов позволяет достигать высоких значений титров РТГА (для гриппа А H1N1 до 1:5120, для гриппа А H3N2 – до 1:2986, для гриппа В (линия Виктория) – до 1:960, для гриппа В (линия Ямагата) – до 1:1280), превышающих таковые для контрольного вакцинного препарата в 4 – 186 раз. Комбинирование препаратов мРНК, кодирующих антигены вирусов сезонного гриппа с препаратом мРНК, кодирующим антиген коронавируса SARS-CoV-2 не снижает уровня иммуногенности каждого из компонентов в отдельности.

6. Полученные в данной работе кандидатные мРНК-препараты, кодирующие гемагглютинин вирусов гриппа А и В, позволяют формировать более

широкий перекрёстный иммунный ответ по сравнению с использованием инактивированного препарата, что вероятно связано с более высоким количеством антител не только к подверженному изменениям головному ($p=0,043$), но и консервативному стеблевому доменам гемагглютинаина ($p < 0,0001$).

7. Комбинированные кандидатные вакцинные препараты, разработанные на основе мРНК, с высокой эффективностью (100%) защищают мышей трансгенной линии B.6Cg-Tg(K18-ACE2) от гибели после заражения 25-кратной дозой LD50 вируса гриппа A H1N1/Victoria/2570/2019 и снижают в 10^4 раз вирусную нагрузку в лёгких при заражении дозой 10^6 TCID50 коронавируса SARS-CoV-2 EG.5.1.1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ВВП – валовой внутренний продукт
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ВНА – вирус нейтрализующая активность
- ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
- ГБ – гипертоническая болезнь
- ГПЗ – гриппоподобное заболевание
- ДК -дендритная клетка
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЕМА – Европейское агентство лекарственных средств
- ИБС – ишемическая болезнь сердца
- ИМТ – индекс массы тела
- ИФА – иммуноферментный анализ
- КИ – клинические испытания
- ЛНЧ – липидная наночастица
- М1 – матричный белок вируса гриппа
- МВФ – международный валютный фонд
- миРНК – малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота
- МНС-I - молекула главного комплекса гистосовместимости класса I
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- НИИ – научно-исследовательский институт
- НТО – нетранслируемая область
- ОРВИ – острые респираторные вирусные инфекции
- ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой
- ОЭВ – относительная эффективность вакцины
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- РНК – рибонуклеиновая кислота

- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РСВ – респираторно-синцитиальный вирус
- РСВ – респираторно-синцитиальный вирус
- РТГА – реакция торможения гемагглютинации
- РТГА -реакция торможения гемагглютинации
- СанПиН – санитарно-эпидемиологические правила и нормативы
- СРЕ – цитопатический эффект
- СССР – Советский Союз Социалистических Республик
- ТВЕ – Трис-борат-ЭДТА буфер
- ТЕ – Трис-ЭДТА буфер
- ТОРИ – тяжелые острые респираторные инфекции
- тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота
- УФ – ультрафиолет
- ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких
- ADCC – антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичности
- АроЕ – аполипопротеина Е
- ARCA – Anti-Reverse Cap Analog — это структурный аналог кэпа (5'-кэпа)
мРНК, используемый при синтезе мРНК in vitro
- ATCC – American Type Culture Collection – Американская коллекция типовых культур)
- BSA – bovine serum albumin – бычий сывороточный альбумин
- CDC – центры по контролю и профилактике заболеваний США
- сНА – химерный гемагглютинин
- CleanCap - запатентованная технология кэпирования для синтеза мРНК, обеспечивающая котранскрипционное добавление структуры Cap 1 (5'-кэп)
- COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 года
- DSPC - дистеароил фосфатидилхолин
- Е – белок оболочки коронавируса SARS-CoV-2
- EOS – эозинофилы
- FBS – fetal bovine serum – бычья эмбриональная сыворотка

FDA - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

GISRS – глобальная система эпиднадзора за гриппом и реагирования на него

HA – гемагглютинин

HBA – альфа субъединица гемоглобина человека

HGB – гемоглобин

IgA – иммуноглобулины класса A

IgG – иммуноглобулины класса G

IgM – иммуноглобулины класса M

IVT – in vitro транскрипция

LOD – limit of detection – нижний предел детекции

LYM – лимфоциты

M – мембранный белок коронавируса SARS-CoV-2

M2 – мембранный белок вируса гриппа

MERS-CoV – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома

MON – моноциты

N – нуклеокапсидный белок коронавируса SARS-CoV-2

NA – нейраминидаза

NAID – национальный институт аллергии и инфекционных заболеваний

США

NEU – нейтрофилы

NP – белок нуклеокапсида вируса гриппа

NRBC – нормобласты

NS1 – неструктурный белок 1 вируса гриппа

NS2 – неструктурный белок 2 вируса гриппа

OAS – «первичный антигенный грех»

ORF – open-reading frame – открытая рамка считывания

PABPC – цитоплазматический поли(A)-связывающий белок

PBS – фосфатно-солевой буфер

PDI – индекс полидисперсности

PFA – параформальдегид

RBS – сайт связывания рецептора

RIG-I – ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой

RNP – рибонуклеопротеиновым вируса гриппа

S - шиповидный гликопротеин коронавируса SARS-CoV-2

SAM – self-amplifying mRNA – самореплицирующаяся мРНК

SARS-CoV – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома

SARS-CoV -2 - коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2

SHIV –инактивированная сплит-вакцина от гриппа

TCID50 - Tissue Culture Infectious Dose 50% – это 50%-я тканевая цитопатическая (инфекционная) доза.

TLR3 – Толл-подобный рецептор 3

TLR7 – Толл-подобный рецептор 7

TLR8 – Толл-подобный рецептор 8

TMC – 5-метилцитидин

TMOU – 5-метоксиуридин

TMPRSS2 – трансмембранная сериновая протеаза

TNA – N6-метиладенозин,

TNP – N1-метил-псевдоуридин

TPU – псевдоуридин

UTR – untranslated region – нетранслируемые регионы

VOC – variant of concern – варианты, вызывающие беспокойство

VOI – variant under interest – варианты, вызывающие интерес и

VUM – variant under monitoring – варианты под наблюдением

WBC – лейкоциты

ACE2 - рецепторы ангиотензинпревращающего фермента II типа

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 19 (27.05.2025)» (утв. Минздравом России). — URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896/ (дата обращения: 26.01.2026). — Текст : электронный.
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации в 2024 году» // Роспотребнадзор. — URL: https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=30171 (дата обращения: 16.02.2026). — Текст : электронный.
3. Жданов, В. М. Актуальные проблемы гриппа / В. М. Жданов // Клиническая медицина. — 1982. — № 11. — С. 6–15.
4. Клинические рекомендации «Грипп у взрослых» (утв. Минздравом России). — URL: https://legalacts.ru/doc/klinicheskie-rekomendatsii-gripp-u-vzroslykh-utv-minzdravom-rossii_1/ (дата обращения: 26.01.2026). — Текст : электронный.
5. Львов, Д. К. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / Д. К. Львов. — Москва : МИА, 2013. — С. 307–314.
6. Минздрав зарегистрировал обновленную вакцину «Спутник V» // Коммерсантъ. — URL: <https://www.kommersant.ru/doc/6535351> (дата обращения: 18.07.2025). — Текст : электронный.
7. Национальная ассоциация специалистов по инфекционным болезням имени академика В. И. Покровского (НАСИБ). Клинические рекомендации: грипп у взрослых / НАСИБ, Российское научное медицинское общество терапевтов (РНМОТ). — Рубрикатор клинических рекомендаций Минздрава России, 2022.
8. Никифоров, В. В. Методические рекомендации ФМБА России от 10.10.2022: грипп и другие ОРВИ в период продолжающейся пандемии COVID-19 / В. В. Никифоров, Т. Г. Суранова, Н. Л. Бондаренко [и др.]. — Академия постдипломного образования ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, 2022.

9. О ходе вакцинации против COVID-19 // Роспотребнадзор. — URL: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=26491 (дата обращения: 18.07.2025). — Текст : электронный.
10. Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» от 28 января 2021. — URL: <https://docs.cntd.ru/document/573660140> (дата обращения: 31.01.2026). — Текст : электронный.
11. Пшеничная, Н. Ю. Грипп в эпоху пандемии COVID-19 : руководство для врачей / Н. Ю. Пшеничная. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2023. — 192 с. — ISBN 978-5-9704-7814-1.
12. Российские вакцины от коронавируса // Роспотребнадзор. — URL: <https://www.04.rospotrebnadzor.ru/index.php/epid-otdel/org/14411-06042021.html> (дата обращения: 15.02.2026). — Текст : электронный.
13. Соминина, А. А. Совершенствование системы надзора за гриппом в Российской Федерации: основные результаты сигнального надзора за гриппом и другими острыми респираторными вирусными инфекциями / А. А. Соминина, Е. А. Смородинцева, К. А. Столяров [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2017. — Т. 1, № 92.
14. Abbadi, N. Differential Recognition of Computationally Optimized H3 Hemagglutinin Influenza Vaccine Candidates by Human Antibodies / N. Abbadi, K. Nagashima, A. Pena-Briseno [et al.] // Journal of Virology. — 2022. — Vol. 96, № 16. — P. e00896-22.
15. Aghbash, P. S. Dynamic alterations in white blood cell counts and SARS-CoV-2 shedding in saliva: an infection predictor parameter / P. S. Aghbash, R. Rasizadeh, M. Shirvaliloo [et al.] // Frontiers in Medicine. — 2023. — Vol. 10. — P. 1208928.
16. Akinc, A. Targeted Delivery of RNAi Therapeutics With Endogenous and Exogenous Ligand-Based Mechanisms / A. Akinc, W. Querbes, S. De [et al.] // Molecular Therapy. — 2010. — Vol. 18, № 7. — P. 1357–1364.
17. Alameh, M.-G. Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses / M.-

- G. Alameh, I. Tombácz, E. Bettini [et al.] // *Immunity*. — 2021. — Vol. 54, № 12. — P. 2877–2892.e7.
18. Alameh, M.-G. A multivalent mRNA-LNP vaccine protects against *Clostridioides difficile* infection / M.-G. Alameh, A. Semon, N. U. Bayard [et al.] // *Science*. — 2024. — Vol. 386, № 6717. — P. 69–75.
19. Alexandrova, G. I. Obtaining of an Additionally Attenuated Vaccinating Cryophil Influenza Strain / G. I. Alexandrova, A. A. Smorodintsev. — 1965.
20. Altenburg, A. F. Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) as Production Platform for Vaccines against Influenza and Other Viral Respiratory Diseases / A. F. Altenburg, J. H. C. M. Kreijtz, R. D. de Vries [et al.] // *Viruses*. — 2014. — Vol. 6, № 7. — P. 2735–2761.
21. Ambrose, C. S. The role of nasal IgA in children vaccinated with live attenuated influenza vaccine / C. S. Ambrose, X. Wu, T. Jones [et al.] // *Vaccine*. — 2012. — Vol. 30, № 48. — P. 6794–6801.
22. Angelova, L. A. Original antigenic sin to influenza in rats / L. A. Angelova, Ya. S. Shvartsman // *Immunology*. — 1982. — Vol. 46, № 1. — P. 183–188.
23. Arevalo, C. P. A multivalent nucleoside-modified mRNA vaccine against all known influenza virus subtypes / C. P. Arevalo, M. J. Bolton, V. Le Sage [et al.] // *Science*. — 2022. — Vol. 378, № 6622. — P. 899–904.
24. Asatryan, M. N. Development, study, and comparison of models of cross-immunity to the influenza virus using statistical methods and machine learning / M. N. Asatryan // *Problems of Virology*. — 2024. — T. 69, № 4. — C. 349–362.
25. Baden, L. R. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine / L. R. Baden, H. M. El Sahly, B. Essink [et al.] // *New England Journal of Medicine*. — 2021. — Vol. 384, № 5. — P. 403–416.
26. Bahl, K. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses / K. Bahl, J. J. Senn, O. Yuzhakov [et al.] // *Molecular Therapy*. — 2017. — Vol. 25, № 6. — P. 1316–1327.

27. Bangaru, S. A Site of Vulnerability on the Influenza Virus Hemagglutinin Head Domain Trimer Interface / S. Bangaru, S. Lang, M. Schotsaert [et al.] // *Cell*. — 2019. — Vol. 177, № 5. — P. 1136–1152.e18.
28. Berlanda Scorza, F. Universal influenza vaccines: Shifting to better vaccines / F. Berlanda Scorza, V. Tsvetnitsky, J. J. Donnelly // *Vaccine*. — 2016. — Vol. 34, № 26. — P. 2926–2933.
29. Bertram, S. TMPRSS2 Activates the Human Coronavirus 229E for Cathepsin-Independent Host Cell Entry and Is Expressed in Viral Target Cells in the Respiratory Epithelium / S. Bertram, R. Dijkman, M. Habjan [et al.] // *Journal of Virology*. — 2013. — Vol. 87, № 11. — P. 6150–6160.
30. Biere, B. Differentiation of Influenza B Virus Lineages Yamagata and Victoria by Real-Time PCR / B. Biere, B. Bauer, B. Schweiger // *Journal of Clinical Microbiology*. — 2010. — Vol. 48, № 4. — P. 1425–1427.
31. Bodewes, R. Vaccination against Seasonal Influenza A/H3N2 Virus Reduces the Induction of Heterosubtypic Immunity against Influenza A/H5N1 Virus Infection in Ferrets / R. Bodewes, J. H. C. M. Kreijtz, M. M. Geelhoed-Mieras [et al.] // *Journal of Virology*. — 2011. — Vol. 85, № 6. — P. 2695–2702.
32. Boravleva, E. Y. Immune Response and Protective Efficacy of Inactivated and Live Influenza Vaccines Against Homologous and Heterosubtypic Challenge / E. Y. Boravleva // *Biochemistry (Moscow)*. — 2020. — Vol. 85, № 5. — P. 553–566.
33. Both, G. W. Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites / G. W. Both, M. J. Sleight, N. J. Cox [et al.] // *Journal of Virology*. — 1983. — Vol. 48, № 1. — P. 52–60.
34. Burnet, F. M. A Genetic Approach to Variation in Influenza Viruses: 3. Recombination of Characters in Influenza Virus Strains Used in Mixed Infections / F. M. Burnet, P. E. Lind // *Journal of General Microbiology*. — 1951. — Vol. 5, № 1. — P. 59–66.
35. Bykonia, E. N. Major Role of S-Glycoprotein in Providing Immunogenicity and Protective Immunity in mRNA Lipid Nanoparticle Vaccines Based on SARS-CoV-2

- Structural Proteins / E. N. Bykonja, D. A. Kleymenov, V. A. Gushchin [et al.] // *Vaccines*. — 2024. — Vol. 12, № 4. — P. 379.
36. Cakmakci, N. G. SLIP1, a Factor Required for Activation of Histone mRNA Translation by the Stem-Loop Binding Protein / N. G. Cakmakci, R. S. Lerner, E. J. Wagner [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. — 2008. — Vol. 28, № 3. — P. 1182–1194.
37. Cao, G. J. Identification of the gene for an Escherichia coli poly(A) polymerase / G. J. Cao, N. Sarkar // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1992. — Vol. 89, № 21. — P. 10380–10384.
38. Carlson, C. J. Misconceptions about weather and seasonality must not misguide COVID-19 response / C. J. Carlson, A. C. R. Gomez, S. Bansal [et al.] // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11, № 1.
39. Carrasco, M. J. Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration / M. J. Carrasco, S. Alishetty, M.-G. Alameh [et al.] // *Communications Biology*. — 2021. — Vol. 4, № 1. — P. 956.
40. Carter, T. The Influenza A Virus Replication Cycle: A Comprehensive Review / T. Carter, M. Iqbal // *Viruses*. — 2024. — Vol. 16, № 2. — P. 316.
41. Chan, J. F.-W. COVID-19 drug discovery and treatment options / J. F.-W. Chan, S. Yuan, H. Chu [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. — 2024. — Vol. 22, № 7. — P. 391–407.
42. Chaudhary, N. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation / N. Chaudhary, D. Weissman, K. A. Whitehead // *Nature Reviews Drug Discovery*. — 2021. — Vol. 20, № 11. — P. 817–838.
43. Chen, J. Advances in Development and Application of Influenza Vaccines / J. Chen, J. Wang, J. Zhang [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2021. — Vol. 12. — P. 711997.
44. Chen, S. Influence of particle size on the in vivo potency of lipid nanoparticle formulations of siRNA / S. Chen, Y. Y. C. Tam, P. J. C. Lin [et al.] // *Journal of Controlled Release*. — 2016. — Vol. 235. — P. 236–244.

45. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 // *Nature Microbiology*. — 2020. — Vol. 5, № 4. — P. 536–544.
46. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Monoclonal Antibodies for Treatment of COVID-19 // FDA. — URL: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-monoclonal-antibodies-treatment-covid-19> (дата обращения: 10.07.2025). — Текст : электронный.
47. Coronavirus Disease (COVID-19) Situation Reports // WHO. — URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports> (дата обращения: 10.07.2024). — Текст : электронный.
48. Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes // *Advances in Virus Research*. — Elsevier, 2016. — P. 29–57.
49. Corti, D. Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine / D. Corti, A. L. Suguitan Jr., D. Pinna [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. — 2010. — Vol. 120, № 5. — P. 1663–1673.
50. Couch, R. B. Randomized comparative study of the serum antihemagglutinin and antineuraminidase antibody responses to six licensed trivalent influenza vaccines / R. B. Couch, R. L. Atmar, W. A. Keitel [et al.] // *Vaccine*. — 2012. — Vol. 31, № 1. — P. 190–195.
51. COVID-19 deaths // WHO COVID-19 dashboard. — URL: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths> (дата обращения: 20.06.2025). — Текст : электронный.
52. COVID-19 vaccine tracker and landscape // WHO. — URL: <https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19/covid-19-vaccine-tracker-and-landscape> (дата обращения: 15.02.2026). — Текст : электронный.
53. COVID-19 vaccines // WHO COVID-19 dashboard. — URL: <https://data.who.int/dashboards/covid19/vaccines> (дата обращения: 06.06.2025). — Текст : электронный.

54. Cowling, B. J. Influenza Vaccine Effectiveness and Progress Towards a Universal Influenza Vaccine / B. J. Cowling, G. N. Okoli // *Drugs*. — 2024. — Vol. 84, № 9. — P. 1013–1023.
55. Cox, N. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance / N. Cox, R. Webster, K. Stohr. — WHO/CDS/CSR/NCS.
56. Cromer, D. The burden of influenza in England by age and clinical risk group: A statistical analysis to inform vaccine policy / D. Cromer, A. J. van Hoek, M. Jit [et al.] // *Journal of Infection*. — 2014. — Vol. 68, № 4. — P. 363–371.
57. Daniels, R. S. The health of influenza surveillance and pandemic preparedness in the wake of the COVID-19 pandemic / R. S. Daniels, J. W. McCauley // *Journal of General Virology*. — 2023. — Vol. 104, № 2.
58. Darnotuk, E. S. Synthesis and Antiviral Activity of Novel β -D-N4-Hydroxycytidine Ester Prodrugs as Potential Compounds for the Treatment of SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses / E. S. Darnotuk, A. E. Siniavin, N. S. Shastina [et al.] // *Pharmaceuticals*. — 2023. — Vol. 17, № 1. — P. 35.
59. Davenport, F. M. Epidemiologic and Immunologic Significance of Age Distribution of Antibody to Antigenic Variants of Influenza Virus / F. M. Davenport, A. V. Hennessy, T. Francis Jr. // *Journal of Experimental Medicine*. — 1953. — Vol. 98, № 6. — P. 641–656.
60. Dawre, S. Human respiratory viral infections: Current status and future prospects of nanotechnology-based approaches for prophylaxis and treatment / S. Dawre, S. Maru // *Life Sciences*. — 2021. — Vol. 278. — P. 119561.
61. De St. Groth, S. F. Disquisitions on Original Antigenic Sin / S. F. De St. Groth, R. G. Webster // *The Journal of Experimental Medicine*. — 1966. — Vol. 124, № 3. — P. 347–361.
62. Debbag, R. The Impact of Vaccination on COVID-19, Influenza, and Respiratory Syncytial Virus-Related Outcomes: A Narrative Review / R. Debbag, D. Rudin, F. Ceddia [et al.] // *Infectious Diseases and Therapy*. — 2025. — Vol. 14, № S1. — P. 63–97.
63. Devarkar, S. C. Structural basis for m7G recognition and 2'-O-methyl discrimination in capped RNAs by the innate immune receptor RIG-I / S. C. Devarkar, C.

- Wang, M. T. Miller [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2016. — Vol. 113, № 3. — P. 596–601.
64. Diebold, S. S. Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA / S. S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi [et al.] // *Science*. — 2004. — Vol. 303, № 5663. — P. 1529–1531.
65. DiLillo, D. J. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcγR interactions for protection against influenza virus in vivo / D. J. DiLillo, G. S. Tan, P. Palese [et al.] // *Nature Medicine*. — 2014. — Vol. 20, № 2. — P. 143–151.
66. Drosten, C. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome / C. Drosten, S. Günther, W. Preiser [et al.] // *New England Journal of Medicine*. — 2003. — Vol. 348, № 20. — P. 1967–1976.
67. Dulfer, E. A. Timing and sequence of vaccination against COVID-19 and influenza (TACTIC): a single-blind, placebo-controlled randomized clinical trial / E. A. Dulfer, B. Geckin, E. J. M. Taks [et al.] // *The Lancet Regional Health – Europe*. — 2023. — Vol. 29. — P. 100628.
68. Ekiert, D. C. Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop / D. C. Ekiert, A. K. Kashyap, J. Steel [et al.] // *Nature*. — 2012. — Vol. 489, № 7417. — P. 526–532.
69. Ellebedy, A. H. Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination / A. H. Ellebedy, K. J. L. Jackson, H. T. Kissick [et al.] // *Nature Immunology*. — 2016. — Vol. 17, № 10. — P. 1226–1234.
70. Erbeling, E. J. A Universal Influenza Vaccine: The Strategic Plan for the National Institute of Allergy and Infectious Diseases / E. J. Erbeling, D. J. Post, E. J. Stemmy [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2018. — Vol. 218, № 3. — P. 347–354.
71. Factsheet about seasonal influenza // ECDC. — URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/facts/factsheet> (дата обращения: 13.12.2023). — Текст : электронный.
72. Feldman, R. A. mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1

- randomized clinical trials / R. A. Feldman, R. Fuhr, I. Smolenov [et al.] // *Vaccine*. — 2019. — Vol. 37, № 25. — P. 3326–3334.
73. Ferdinands, J. M. Effectiveness of Influenza Vaccine Against Life-threatening RT-PCR-confirmed Influenza Illness in US Children, 2010–2012 / J. M. Ferdinands, B. Flannery, S. B. Reynolds [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2014. — Vol. 210, № 5. — P. 674–683.
74. Ferdinands, J. M. Does influenza vaccination attenuate the severity of breakthrough infections? A narrative review and recommendations for further research / J. M. Ferdinands, M. G. Thompson, L. Blanton [et al.] // *Vaccine*. — 2021. — Vol. 39, № 28. — P. 3678–3695.
75. FluNet Summary // WHO. — URL: <https://www.who.int/tools/flunet/flunet-summary> (дата обращения: 13.02.2026). — Текст : электронный.
76. Foni, E. Influenza D in Italy: towards a better understanding of an emerging viral infection in swine / E. Foni, C. Chiapponi, L. Baioni [et al.] // *Scientific Reports*. — 2017. — Vol. 7, № 1. — P. 11660.
77. Fonville, J. M. Antibody landscapes after influenza virus infection or vaccination / J. M. Fonville, S. H. Wilks, S. L. James [et al.] // *Science*. — 2014. — Vol. 346, № 6212. — P. 996–1000.
78. Fotin-Mleczek, M. Messenger RNA-based Vaccines With Dual Activity Induce Balanced TLR-7 Dependent Adaptive Immune Responses and Provide Antitumor Activity / M. Fotin-Mleczek, K. M. Duchardt, C. Lorenz [et al.] // *Journal of Immunotherapy*. — 2011. — Vol. 34, № 1. — P. 1–15.
79. Fouchier, R. A. M. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome / R. A. M. Fouchier, P. M. Schneeberger, F. W. Rozendaal [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2004. — Vol. 101, № 5. — P. 1356–1361.
80. Francis, T. Influenza: The New Acquaintance / T. Francis // *Annals of Internal Medicine*. — 1953. — Vol. 39, № 2. — P. 203–221.

81. Freyn, A. W. A Multi-Targeting, Nucleoside-Modified mRNA Influenza Virus Vaccine Provides Broad Protection in Mice / A. W. Freyn, J. Ramos da Silva, V. C. Rosado [et al.] // *Molecular Therapy*. — 2020. — Vol. 28, № 7. — P. 1569–1584.
82. Furuichi, Y. Discovery of m7G-cap in eukaryotic mRNAs / Y. Furuichi // *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. — 2015. — Vol. 91, № 8. — P. 394–409.
83. Gallie, D. R. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency / D. R. Gallie // *Genes & Development*. — 1991. — Vol. 5, № 11. — P. 2108–2116.
84. Garcia-Beltran, W. F. mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant / W. F. Garcia-Beltran, K. J. St Denis, A. Hoelzemer [et al.] // *Cell*. — 2022. — Vol. 185, № 3. — P. 457–466.e4.
85. García-Sastre, A. Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses / A. García-Sastre // *Virus Research*. — 2011. — Vol. 162, № 1–2. — P. 12–18.
86. Ghendon, Y. Genome analysis of influenza A virus strains isolated during an epidemic of 1979–1980 / Y. Ghendon, A. Klimov, N. Gorodkova [et al.] // *Journal of General Virology*. — 1981. — Vol. 56, № 2. — P. 303–313.
87. Giancotti, R. The Omicron XBB.1 Variant and Its Descendants: Genomic Mutations, Rapid Dissemination and Notable Characteristics / R. Giancotti, U. Lomoio, B. Puccio [et al.] // *Biology*. — 2024. — Vol. 13, № 2. — P. 90.
88. Gibbs, M. J. Recombination in the Hemagglutinin Gene of the 1918 "Spanish Flu" / M. J. Gibbs, J. S. Armstrong, A. J. Gibbs // *Science*. — 2001. — Vol. 293, № 5536. — P. 1842–1845.
89. Global COVID-19 Overview // WHO COVID-19 dashboard. — URL: <https://data.who.int/dashboards/covid19/summary> (дата обращения: 25.06.2025). — Текст : электронный.
90. Global Economic Prospects, June 2020 / World Bank. — Washington, DC : World Bank, 2020. — ISBN 978-1-4648-1553-9.
91. Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) // WHO. — URL: <https://www.who.int/initiatives/global-influenza-surveillance-and-response-system> (дата обращения: 10.07.2025). — Текст : электронный.

92. Gostic, K. M. Potent protection against H5N1 and H7N9 influenza via childhood hemagglutinin imprinting / K. M. Gostic, M. Ambrose, M. Worobey [et al.] // *Science*. — 2016. — Vol. 354, № 6313. — P. 722–726.
93. Grant, R. When to update COVID-19 vaccine composition / R. Grant, J. A. Sacks, P. Abraham [et al.] // *Nature Medicine*. — 2023. — Vol. 29, № 4. — P. 776–780.
94. Grier, A. E. pEVL: A Linear Plasmid for Generating mRNA IVT Templates With Extended Encoded Poly(A) Sequences / A. E. Grier, S. Burleigh, J. Sahni [et al.] // *Molecular Therapy – Nucleic Acids*. — 2016. — Vol. 5. — P. e306.
95. Gross, P. A. A Controlled Double-Blind Comparison of Reactogenicity, Immunogenicity, and Protective Efficacy of Whole-Virus and Split-Product Influenza Vaccines in Children / P. A. Gross, F. A. Ennis // *Journal of Infectious Diseases*. — 1977. — Vol. 136, № 5. — P. 623–632.
96. Guan, S. Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems / S. Guan, J. Rosenecker // *Gene Therapy*. — 2017. — Vol. 24, № 3. — P. 133–143.
97. Gushchin, V. A. Characterisation of the COVID-19 epidemic process in Moscow and search for possible determinants of the trends of the observed changes / V. A. Gushchin, A. A. Pochtovyi, D. D. Kustova [et al.] // *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. — 2023. — Vol. 100, № 4. — P. 267–284.
98. Hamele, C. E. Headless hemagglutinin-containing influenza viral particles direct immune responses toward more conserved epitopes / C. E. Hamele, Z. Luo, R. A. Leonard [et al.] // *Journal of Virology*. — 2024. — Vol. 98, № 10. — P. e01166-24.
99. Hassett, K. J. Impact of lipid nanoparticle size on mRNA vaccine immunogenicity / K. J. Hassett, J. Higgins, A. Woods [et al.] // *Journal of Controlled Release*. — 2021. — Vol. 335. — P. 237–246.
100. Heaton, N. S. Genome-wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of the hemagglutinin and NS1 proteins / N. S. Heaton, D. Sachs, C.-J. Chen [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2013. — Vol. 110, № 50. — P. 20248–20253.

101. Hendin, H. E. Elimination of receptor binding by influenza hemagglutinin improves vaccine-induced immunity / H. E. Hendin, P.-O. Lavoie, J. M. Bhargava Gravett [et al.] // *npj Vaccines*. — 2022. — Vol. 7, № 1. — P. 42.
102. Henry, C. From Original Antigenic Sin to the Universal Influenza Virus Vaccine / C. Henry, A.-K. E. Palm, F. Krammer [et al.] // *Trends in Immunology*. — 2018. — Vol. 39, № 1. — P. 70–79.
103. Hirst, G. K. The Experimental Production of Combination Forms of Virus / G. K. Hirst, T. Gotlieb // *Journal of Experimental Medicine*. — 1953. — Vol. 98, № 1. — P. 41–52.
104. History of influenza vaccination // WHO. — URL: <https://www.who.int/news-room/spotlight/history-of-vaccination/history-of-influenza-vaccination> (дата обращения: 29.05.2024). — Текст : электронный.
105. Hoernes, T. P. Nucleotide modifications within bacterial messenger RNAs regulate their translation and are able to rewire the genetic code / T. P. Hoernes, N. Clementi, K. Faserl [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2016. — Vol. 44, № 2. — P. 852–862.
106. Holtkamp, S. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells / S. Holtkamp, S. Kreiter, A. Selmi [et al.] // *Blood*. — 2006. — Vol. 108, № 13. — P. 4009–4017.
107. Hornung, V. 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I / V. Hornung, J. Ellegast, S. Kim [et al.] // *Science*. — 2006. — Vol. 314, № 5801. — P. 994–997.
108. Hou, X. Lipid nanoparticles for mRNA delivery / X. Hou, T. Zaks, R. Langer [et al.] // *Nature Reviews Materials*. — 2021. — Vol. 6, № 12. — P. 1078–1094.
109. Hsu, M. T. Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle / M. T. Hsu, J. D. Parvin, P. Palese // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1987. — Vol. 84, № 22. — P. 8140–8144.
110. Huang, C. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li [et al.] // *The Lancet*. — 2020. — Vol. 395, № 10223. — P. 497–506.

111. Huang, Y. Flu-COVID combo recombinant protein vaccines elicited protective immune responses against both influenza and SARS-CoV-2 viruses infection / Y. Huang, H. Shi, D. Forgacs [et al.] // *Vaccine*. — 2024. — Vol. 42, № 5. — P. 1184–1192.
112. Huet, T. Anakinra for severe forms of COVID-19: a cohort study / T. Huet, H. Beaussier, O. Voisin [et al.] // *The Lancet Rheumatology*. — 2020. — Vol. 2, № 7. — P. e393–e400.
113. Iacobucci, G. Covid-19: Vaccines have saved at least 1.4 million lives in Europe, WHO reports / G. Iacobucci // *BMJ*. — 2024. — P. q125.
114. Iavarone, C. Mechanism of action of mRNA-based vaccines / C. Iavarone, D. T. O'Hagan, D. Yu [et al.] // *Expert Review of Vaccines*. — 2017. — Vol. 16, № 9. — P. 871–881.
115. Ibarondo, F. J. Rapid Decay of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Persons with Mild Covid-19 / F. J. Ibarondo, J. A. Fulcher, D. Goodman-Meza [et al.] // *New England Journal of Medicine*. — 2020. — Vol. 383, № 11. — P. 1085–1087.
116. Iketani, S. Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages / S. Iketani, L. Liu, Y. Guo [et al.] // *Nature*. — 2022. — Vol. 604, № 7906. — P. 553–556.
117. Ilyushina, N. A. Adaptation of Pandemic H1N1 Influenza Viruses in Mice / N. A. Ilyushina, A. M. Khalekov, J. P. Seiler [et al.] // *Journal of Virology*. — 2010. — Vol. 84, № 17. — P. 8607–8616.
118. Impagliazzo, A. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen / A. Impagliazzo, F. Milder, H. Kuipers [et al.] // *Science*. — 2015. — Vol. 349, № 6254. — P. 1301–1306.
119. Influenza (seasonal) // WHO. — URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (дата обращения: 13.05.2025). — Текст : электронный.
120. Influenza vaccines – non-clinical and clinical module – Scientific guideline // European Medicines Agency (EMA). — URL: <https://www.ema.europa.eu/en/influenza-vaccines-non-clinical-clinical-module-scientific-guideline> (дата обращения: 16.02.2026). — Текст : электронный.

121. Interim COVID-19 vaccination coverage in the EU/EEA during the 2023–24 season campaigns // ECDC. — URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/interim-covid-19-vaccination-coverage-eueea-during-2023-24-season-campaigns-1> (дата обращения: 06.06.2025). — Текст : электронный.
122. Isakova-Sivak, I. Development of a T Cell-Based COVID-19 Vaccine Using a Live Attenuated Influenza Vaccine Viral Vector / I. Isakova-Sivak, E. Stepanova, V. Matyushenko [et al.] // *Vaccines*. — 2022. — Vol. 10, № 7. — P. 1142.
123. Jain, S. Messenger RNA-based vaccines: Past, present, and future directions in the context of the COVID-19 pandemic / S. Jain, A. Venkataraman, M. E. Wechsler [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2021. — Vol. 179. — P. 114000.
124. Jemielity, J. Novel "anti-reverse" cap analogs with superior translational properties / J. Jemielity, T. Fowler, J. Zuberek [et al.] // *RNA*. — 2003. — Vol. 9, № 9. — P. 1108–1122.
125. Jennings, R. Reactogenicity and Immunogenicity of Whole and Ether-Tween-Split Influenza A Virus Vaccines in Volunteers / R. Jennings, C. W. Potter, P. M. O. Massey [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. — 1978. — Vol. 138, № 5. — P. 577–586.
126. Jensen, K. E. Characterization of Influenza Antibodies by Serum Absorption / K. E. Jensen, F. M. Davenport, A. V. Hennessy [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. — 1956. — Vol. 104, № 2. — P. 199–209.
127. Jia, N. Glycomic Characterization of Respiratory Tract Tissues of Ferrets / N. Jia, W. S. Barclay, K. Roberts [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 2014. — Vol. 289, № 41. — P. 28489–28504.
128. Johnson, N. P. A. S. Updating the Accounts: Global Mortality of the 1918-1920 "Spanish" Influenza Pandemic / N. P. A. S. Johnson, J. Mueller // *Bulletin of the History of Medicine*. — 2002. — Vol. 76, № 1. — P. 105–115.
129. Johnson, P. R. Comparison of long-term systemic and secretory antibody responses in children given live, attenuated, or inactivated influenza A vaccine / P. R. Johnson, S. Feldman, J. M. Thompson [et al.] // *Journal of Medical Virology*. — 1985. — Vol. 17, № 4. — P. 325–335.

130. Kanegae, Y. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season / Y. Kanegae, S. Sugita, A. Endo [et al.] // *Journal of Virology*. — 1990. — Vol. 64, № 6. — P. 2860–2865.
131. Karapiperis, C. A Strong Seasonality Pattern for Covid-19 Incidence Rates Modulated by UV Radiation Levels / C. Karapiperis, P. Kouklis, S. Papastratos [et al.] // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13, № 4. — P. 574.
132. Karikó, K. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA / K. Karikó, M. Buckstein, H. Ni [et al.] // *Immunity*. — 2005. — Vol. 23, № 2. — P. 165–175.
133. Karikó, K. Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability / K. Karikó, H. Muramatsu, F. A. Welsh [et al.] // *Molecular Therapy*. — 2008. — Vol. 16, № 11. — P. 1833–1840.
134. Karikó, K. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA / K. Karikó, H. Muramatsu, J. Ludwig [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2011. — Vol. 39, № 21. — P. e142.
135. Karpova, L. S. Influence of the ways of spreading influenza epidemics across the territory Russia on the peculiarities of the epidemic process in various Federal districts / L. S. Karpova // *Journal Infectology*. — 2021. — T. 13, № 4. — C. 90–99.
136. Kato, H. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5 / H. Kato, O. Takeuchi, E. Mikamo-Satoh [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. — 2008. — Vol. 205, № 7. — P. 1601–1610.
137. Kendal, A. P. Development of cold-adapted recombinant live, attenuated influenza A vaccines in the USA and USSR / A. P. Kendal // *European Journal of Epidemiology*. — 1997. — Vol. 13, № 5. — P. 591–609.
138. Khaitov, M. Silencing of SARS-CoV-2 with modified siRNA-peptide dendrimer formulation / M. Khaitov, A. Nikonova, I. Shilovskiy [et al.] // *Allergy*. — 2021. — Vol. 76, № 9. — P. 2840–2854.

139. Kilbourne, E. D. The total influenza vaccine failure of 1947 revisited: Major intrasubtypic antigenic change can explain failure of vaccine in a post-World War II epidemic / E. D. Kilbourne, C. Smith, I. Brett [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2002. — Vol. 99, № 16. — P. 10748–10752.
140. Kim, J. H. Original Antigenic Sin Responses to Influenza Viruses / J. H. Kim, I. Skountzou, R. Compans [et al.] // *The Journal of Immunology*. — 2009. — Vol. 183, № 5. — P. 3294–3301.
141. Kotomina, T. S. Conserved linear B-cell peptides among the influenza A viral neuraminidases enhance the cross-protective potential of inactivated whole-virion influenza vaccine / T. S. Kotomina // *Russian Journal of Infection and Immunity*. — 2024. — T. 14, № 3. — C. 593–600.
142. Krammer, F. Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines / F. Krammer, P. Palese // *Current Opinion in Virology*. — 2013. — Vol. 3, № 5. — P. 521–530.
143. Krammer, F. Advances in the development of influenza virus vaccines / F. Krammer, P. Palese // *Nature Reviews Drug Discovery*. — 2015. — Vol. 14, № 3. — P. 167–182.
144. Krammer, F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination / F. Krammer // *Nature Reviews Immunology*. — 2019. — Vol. 19, № 6. — P. 383–397.
145. Kubota, Y. Multiple drivers of the COVID-19 spread: The roles of climate, international mobility, and region-specific conditions / Y. Kubota, T. Shiono, B. Kusumoto [et al.] // *PLOS ONE*. — 2020. — Vol. 15, № 9. — P. e0239385.
146. Kudlay, D. COVID-19 Vaccines: An Updated Overview of Different Platforms / D. Kudlay, A. Svistunov, O. Satyshev // *Bioengineering*. — 2022. — Vol. 9, № 11. — P. 714.
147. Kulkarni, J. A. Lipid Nanoparticle Technology for Clinical Translation of siRNA Therapeutics / J. A. Kulkarni, D. Witzigmann, S. Chen [et al.] // *Accounts of Chemical Research*. — 2019. — Vol. 52, № 9. — P. 2435–2444.

148. Kunz, C. Eine neue Influenza-Subunit-Vakzine: Verträglichkeit und Antigenität im Vergleich zu herkömmlichen Spalt- und Ganzvirusvakzinen / C. Kunz, H. Hofmann, H. Bachmayer [et al.] // *Infection*. — 1976. — Vol. 4, № 2. — P. 73–79.
149. Lau, D. Low CD21 expression defines a population of recent germinal center graduates primed for plasma cell differentiation / D. Lau, L. Y.-L. Lan, S. F. Andrews [et al.] // *Science Immunology*. — 2017. — Vol. 2, № 7. — P. eaai8153.
150. Lee, J. Molecular-level analysis of the serum antibody repertoire in young adults before and after seasonal influenza vaccination / J. Lee, D. R. Boutz, V. Chromikova [et al.] // *Nature Medicine*. — 2016. — Vol. 22, № 12. — P. 1456–1464.
151. Li, Z.-N. IgM, IgG, and IgA Antibody Responses to Influenza A(H1N1)pdm09 Hemagglutinin in Infected Persons during the First Wave of the 2009 Pandemic in the United States / Z.-N. Li, S.-C. Lin, P. J. Carney [et al.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. — 2014. — Vol. 21, № 8. — P. 1054–1060.
152. Liao, Y.-C. Bioinformatics models for predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 virus / Y.-C. Liao, M.-S. Lee, C.-T. Su // *Bioinformatics*. — 2008. — Vol. 24, № 4. — P. 505–512.
153. Liu, S. A Multivalent mRNA Therapeutic Vaccine Exhibits Breakthroughs in Immune Tolerance and Virological Suppression of HBV by Stably Presenting the Pre-S Antigen on the Cell Membrane / S. Liu, J. Wang, Y. Li [et al.] // *Pharmaceutics*. — 2025. — Vol. 17, № 2. — P. 211.
154. Liu, X. The role of seasonality in the spread of COVID-19 pandemic / X. Liu, J. Huang, C. Li [et al.] // *Environmental Research*. — 2021. — Vol. 195. — P. 110874.
155. Lowy, R. J. Influenza Virus Induction of Apoptosis by Intrinsic and Extrinsic Mechanisms / R. J. Lowy // *International Reviews of Immunology*. — 2003. — Vol. 22, № 5–6. — P. 425–449.
156. Luke, C. J. The Role of Animal Models In Influenza Vaccine Research / C. J. Luke, K. Subbarao // *Influenza Vaccines for the Future* / eds. R. Rappuoli, G. Del Giudice. — Basel : Springer Basel, 2011. — P. 223–272.

157. L'vov, D. K. Peculiarities of the influenza and ARVI viruses circulation during epidemic season 2019–2020 in some regions of Russia / D. K. L'vov // *Problems of Virology*. — 2021. — T. 65, № 6. — C. 335–349.
158. Maassab, H. F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 °C / H. F. Maassab // *Nature*. — 1967. — Vol. 213, № 5076. — P. 612–614.
159. Maassab, H. F. Laboratory and clinical characteristics of attenuated strains of influenza virus / H. F. Maassab // *Bulletin of the World Health Organization*. — 1969. — Vol. 41, № 3–4–5. — P. 589.
160. Magnus, C. J. Ultrapotent chemogenetics for research and potential clinical applications / C. J. Magnus, P. H. Lee, J. Bonaventura [et al.] // *Science*. — 2019. — Vol. 364, № 6436.
161. Magurano, F. SARS-CoV-2 infection: the environmental endurance of the virus can be influenced by the increase of temperature / F. Magurano, M. Baggieri, A. Marchi [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. — 2021. — Vol. 27, № 2. — P. 289.e5–289.e7.
162. Maman, K. The value of childhood combination vaccines: From beliefs to evidence / K. Maman, Y. Zöllner, D. Greco [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. — 2015. — Vol. 11, № 9. — P. 2132–2141.
163. Margine, I. H3N2 Influenza Virus Infection Induces Broadly Reactive Hemagglutinin Stalk Antibodies in Humans and Mice / I. Margine, R. Hai, R. A. Albrecht [et al.] // *Journal of Virology*. — 2013. — Vol. 87, № 8. — P. 4728–4737.
164. Margine, I. Animal Models for Influenza Viruses: Implications for Universal Vaccine Development / I. Margine, F. Krammer // *Pathogens*. — 2014. — Vol. 3, № 4. — P. 845–874.
165. Markov, P. V. The evolution of SARS-CoV-2 / P. V. Markov, M. Ghafari, M. Beer [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. — 2023. — Vol. 21, № 6. — P. 361–379.
166. Masyeni, S. Molnupiravir: A lethal mutagenic drug against rapidly mutating severe acute respiratory syndrome coronavirus 2—A narrative review / S. Masyeni, H. Harapan, M. Iqhrammullah [et al.] // *Journal of Medical Virology*. — 2022. — Vol. 94, № 7. — P. 3006–3016.

167. Mathieu, E. Coronavirus Pandemic (COVID-19) / E. Mathieu // Our World in Data. — 2020.
168. Mazunina, E. P. Immunogenicity and Efficacy of Combined mRNA Vaccine Against Influenza and SARS-CoV-2 in Mice Animal Models / E. P. Mazunina, V. A. Gushchin, E. N. Bykonia [et al.] // *Vaccines*. — 2024. — Vol. 12, № 11. — P. 1206.
169. Mazunina, E. P. Trivalent mRNA vaccine-candidate against seasonal flu with cross-specific humoral immune response / E. P. Mazunina, V. A. Gushchin, D. A. Kleymenov [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2024. — Vol. 15. — P. 1381508.
170. McCarthy, K. R. Differential immune imprinting by influenza virus vaccination and infection in nonhuman primates / K. R. McCarthy, T. A. Von Holle, L. L. Sutherland [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2021. — Vol. 118, № 23. — P. e2026752118.
171. Mengist, H. M. Mutations of SARS-CoV-2 spike protein: Implications on immune evasion and vaccine-induced immunity / H. M. Mengist, A. J. K. Kombe, D. Mekonnen [et al.] // *Seminars in Immunology*. — 2021. — Vol. 55. — P. 101533.
172. Mestas, J. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology / J. Mestas, C. C. W. Hughes // *The Journal of Immunology*. — 2004. — Vol. 172, № 5. — P. 2731–2738.
173. Mlcochova, P. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication, sensitivity to neutralising antibodies and vaccine breakthrough / P. Mlcochova, S. A. Kemp, M. S. Dhar [et al.]. — 2021.
174. Moderna Announces Positive Phase 3 Results for Seasonal Influenza Vaccine // Moderna, Inc. — URL: <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2025/Moderna-Announces-Positive-Phase-3-Results-for-Seasonal-Influenza-Vaccine/default.aspx> (дата обращения: 11.07.2025). — Текст : электронный.
175. Monroe, J. N1-Methylpseudouridine and pseudouridine modifications modulate mRNA decoding during translation / J. Monroe, D. E. Eyler, L. Mitchell [et al.] // *Nature Communications*. — 2024. — Vol. 15, № 1.

176. Moreira, E. D. Safety and Efficacy of a Third Dose of BNT162b2 Covid-19 Vaccine / E. D. Moreira, N. Kitchin, X. Xu [et al.] // *New England Journal of Medicine*. — 2022. — Vol. 386, № 20. — P. 1910–1921.
177. Morens, D. M. The 1918 Influenza Pandemic: Insights for the 21st Century / D. M. Morens, A. S. Fauci // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2007. — Vol. 195, № 7. — P. 1018–1028.
178. Muik, A. Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron by BNT162b2 mRNA vaccine-elicited human sera / A. Muik, B. G. Lui, A.-K. Wallisch [et al.] // *Science*. — 2022. — Vol. 375, № 6581. — P. 678–680.
179. Mulrone, T. E. N1-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting / T. E. Mulrone, T. Pöyry, J. C. Yam-Puc [et al.] // *Nature*. — 2024. — Vol. 625, № 7993. — P. 189–194.
180. Muttach, F. Synthetic mRNA capping / F. Muttach, N. Muthmann, A. Rentmeister // *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. — 2017. — Vol. 13. — P. 2819–2832.
181. Nachbagauer, R. Universal influenza virus vaccines and therapeutic antibodies / R. Nachbagauer, F. Krammer // *Clinical Microbiology and Infection*. — 2017. — Vol. 23, № 4. — P. 222–228.
182. Nachbagauer, R. A chimeric hemagglutinin-based universal influenza virus vaccine approach induces broad and long-lasting immunity in a randomized, placebo-controlled phase I trial / R. Nachbagauer, J. Feser, A. Naficy [et al.] // *Nature Medicine*. — 2021. — Vol. 27, № 1. — P. 106–114.
183. Ng, S. Influenza Burden and Transmission in the Tropics / S. Ng, A. Gordon // *Current Epidemiology Reports*. — 2015. — Vol. 2, № 2. — P. 89–100.
184. Njouom, R. Detection of Influenza C Virus Infection among Hospitalized Patients, Cameroon / R. Njouom, G. C. Monamele, B. Ermetal [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. — 2019. — Vol. 25, № 3. — P. 607–609.
185. O'Gorman, W. E. The Split Virus Influenza Vaccine rapidly activates immune cells through Fcγ receptors / W. E. O'Gorman, H. Huang, Y.-L. Wei [et al.] // *Vaccine*. — 2014. — Vol. 32, № 45. — P. 5989–5997.

186. Ohmit, S. E. Influenza Hemagglutination-Inhibition Antibody Titer as a Correlate of Vaccine-Induced Protection / S. E. Ohmit, M. G. Thompson, J. G. Petrie [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. — 2011. — Vol. 204, № 12. — P. 1879–1885.
187. Okuno, Y. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains / Y. Okuno, Y. Isegawa, F. Sasao [et al.] // *Journal of Virology*. — 1993. — Vol. 67, № 5. — P. 2552–2558.
188. Olsen, B. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds / B. Olsen, V. J. Munster, A. Wallensten [et al.] // *Science*. — 2006. — Vol. 312, № 5772. — P. 384–388.
189. Owen, D. R. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19 / D. R. Owen, C. M. N. Allerton, A. S. Anderson [et al.] // *Science*. — 2021. — Vol. 374, № 6575. — P. 1586–1593.
190. Pajon, R. SARS-CoV-2 Omicron Variant Neutralization after mRNA-1273 Booster Vaccination / R. Pajon, N. A. Doria-Rose, X. Shen [et al.] // *New England Journal of Medicine*. — 2022. — Vol. 386, № 11. — P. 1088–1091.
191. Panova, E. A. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A / E. A. Panova, D. A. Kleymenov, D. V. Shcheblyakov [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2023. — Vol. 14. — P. 1098302.
192. Pardi, N. Nucleoside Modified mRNA Vaccines for Infectious Diseases / N. Pardi, D. Weissman // *RNA Vaccines : Methods in Molecular Biology* / eds. T. Kramps, K. Elbers. — New York, NY : Springer New York, 2017. — Vol. 1499. — P. 109–121.
193. Pardi, N. mRNA vaccines — a new era in vaccinology / N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter [et al.] // *Nature Reviews Drug Discovery*. — 2018. — Vol. 17, № 4. — P. 261–279.
194. Pardi, N. Nucleoside-modified mRNA immunization elicits influenza virus hemagglutinin stalk-specific antibodies / N. Pardi, K. Parkhouse, E. Kirkpatrick [et al.] // *Nature Communications*. — 2018. — Vol. 9, № 1. — P. 3361.
195. Partington, R. UK economy hit by record slump in 2020 but double-dip recession avoided / R. Partington // *The Guardian*. — 2021. — 12 Feb.

196. Passmore, L. A. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression / L. A. Passmore, J. Collier // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2022. — Vol. 23, № 2. — P. 93–106.
197. Peiris, J. S. M. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome / J. S. M. Peiris, S. T. Lai, L. L. M. Poon [et al.] // *The Lancet*. — 2003. — Vol. 361, № 9366. — P. 1319–1325.
198. People at High Risk of Flu // CDC. — URL: <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/index.htm> (дата обращения: 13.12.2023). — Текст : электронный.
199. People with Certain Medical Conditions and COVID-19 Risk Factors // CDC. — URL: <https://www.cdc.gov/covid/risk-factors/index.html> (дата обращения: 10.07.2025). — Текст : электронный.
200. Pfizer and BioNTech Initiate Phase 1 Study of Single Dose mRNA-Based Combination Vaccine Candidate for Influenza and COVID-19 // BioNTech. — URL: <https://investors.biontech.de/news-releases/news-release-details/pfizer-and-biontech-initiate-phase-1-study-single-dose-mrna/> (дата обращения: ...). — Текст : электронный.
201. Pielak, R. M. Influenza M2 proton channels / R. M. Pielak, J. J. Chou // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. — 2011. — Vol. 1808, № 2. — P. 522–529.
202. Polack, F. P. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine / F. P. Polack, S. J. Thomas, N. Kitchin [et al.] // *New England Journal of Medicine*. — 2020. — Vol. 383, № 27. — P. 2603–2615.
203. Pollard, C. Challenges and advances towards the rational design of mRNA vaccines / C. Pollard, S. De Koker, X. Saelens [et al.] // *Trends in Molecular Medicine*. — 2013. — Vol. 19, № 12. — P. 705–713.
204. Pormohammad, A. Comparison of confirmed COVID-19 with SARS and MERS cases — Clinical characteristics, laboratory findings, radiographic signs and outcomes: A systematic review and meta-analysis / A. Pormohammad, S. Ghorbani, A. Khatami [et al.] // *Reviews in Medical Virology*. — 2020. — Vol. 30, № 4.

205. Preiss, T. Poly(A)-tail-promoted translation in yeast: Implications for translational control / T. Preiss, M. Muckenthaler, M. W. Hentze // *RNA*. — 1998. — Vol. 4, № 11. — P. 1321–1331.
206. Public health surveillance for COVID-19: interim guidance // WHO. — URL: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-SurveillanceGuidance-2022.2> (дата обращения: 16.02.2026). — Текст : электронный.
207. Ramanathan, A. mRNA capping: biological functions and applications / A. Ramanathan, G. B. Robb, S.-H. Chan // *Nucleic Acids Research*. — 2016. — Vol. 44, № 16. — P. 7511–7526.
208. Rauch, S. New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations / S. Rauch, E. Jasny, K. E. Schmidt [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2018. — Vol. 9. — P. 1963.
209. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2024-2025 northern hemisphere influenza season // WHO. — URL: <https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2024-2025-northern-hemisphere-influenza-season> (дата обращения: 15.07.2024). — Текст : электронный.
210. Redondo, N. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns / N. Redondo, S. Zaldívar-López, J. J. Garrido [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2021. — Vol. 12.
211. Rettig, L. Particle size and activation threshold: a new dimension of danger signaling / L. Rettig, S. P. Haen, A. G. Bittermann [et al.] // *Blood*. — 2010. — Vol. 115, № 22. — P. 4533–4541.
212. Risk factors of COVID-19: immunological aspects // *Russian Medical Inquiry*. — 2023. — Vol. 7, № 11. — P. 751–758.
213. Rondy, M. Effectiveness of influenza vaccines in preventing severe influenza illness among adults: A systematic review and meta-analysis of test-negative design case-control studies / M. Rondy, N. El Omeiri, M. G. Thompson [et al.] // *Journal of Infection*. — 2017. — Vol. 75, № 5. — P. 381–394.

214. Roubidou, E. K. Animal Models Utilized for the Development of Influenza Virus Vaccines / E. K. Roubidou, S. Schultz-Cherry // *Vaccines*. — 2021. — Vol. 9, № 7. — P. 787.
215. Rudman Spergel, A. K. mRNA-based seasonal influenza and SARS-CoV-2 multicomponent vaccine in healthy adults: a phase 1/2 trial / A. K. Rudman Spergel, J. Ananworanich, R. Guo [et al.] // *Nature Medicine*. — 2025. — Vol. 31, № 5. — P. 1484–1493.
216. Rutkowska, E. Cytokines and Leukocytes Subpopulations Profile in SARS-CoV-2 Patients Depending on the CT Score Severity / E. Rutkowska, I. Kwiecień, M. Zabicka [et al.] // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13, № 5. — P. 880.
217. Rydzik, A. M. Synthesis and properties of mRNA cap analogs containing imidodiphosphate moiety—fairly mimicking natural cap structure, yet resistant to enzymatic hydrolysis / A. M. Rydzik, M. Lukaszewicz, J. Zuberek [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. — 2012. — Vol. 20, № 5. — P. 1699–1710.
218. Samaridou, E. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives / E. Samaridou, J. Heyes, P. Lutwyche // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2020. — Vols. 154–155. — P. 37–63.
219. Sanders, B. Inactivated Viral Vaccines / B. Sanders, M. Koldijk, H. Schuitemaker // *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control* / eds. B. K. Nunnally, V. E. Turula, R. D. Sitrin. — Berlin ; Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2015. — P. 45–80.
220. SARS-CoV-2 Interagency Group // CDC. — URL: <https://www.cdc.gov/covid/php/interagency-group/index.html> (дата обращения: 10.07.2025). — Текст : электронный.
221. Schlake, T. Developing mRNA-vaccine technologies / T. Schlake, A. Thess, M. Fotin-Mleczek [et al.] // *RNA Biology*. — 2012. — Vol. 9, № 11. — P. 1319–1330.
222. Schmidt, G. Nucleated red blood cells are a late biomarker in predicting intensive care unit mortality in patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome: an observational cohort study / G. Schmidt, A. Martens, C. Koch [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2024. — Vol. 15. — P. 1313977.

223. Schober, G. B. A careful look at lipid nanoparticle characterization: analysis of benchmark formulations for encapsulation of RNA cargo size gradient / G. B. Schober, S. Story, D. P. Arya // *Scientific Reports*. — 2024. — Vol. 14, № 1.
224. Schotsaert, M. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments / M. Schotsaert, M. De Filette, W. Fiers [et al.] // *Expert Review of Vaccines*. — 2009. — Vol. 8, № 4. — P. 499–508.
225. Sedeyn, K. New antibody-based prevention and treatment options for influenza / K. Sedeyn, X. Saelens // *Antiviral Research*. — 2019. — Vol. 170. — P. 104562.
226. Sekiya, T. Selecting and Using the Appropriate Influenza Vaccine for Each Individual / T. Sekiya, M. Ohno, N. Nomura [et al.] // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13, № 6. — P. 971.
227. Semenenko, T. A. Characteristics of the Epidemic Situation Associated with Acute Respiratory Viral Infections in the Russian Federation during the Pandemic Spread of COVID-19 / T. A. Semenenko // *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. — 2022. — T. 21, № 4. — C. 4–15.
228. Shi, R. A combination vaccine against SARS-CoV-2 and H1N1 influenza based on receptor binding domain trimerized by six-helix bundle fusion core / R. Shi, S. Qin, C. Wang [et al.] // *eBioMedicine*. — 2022. — Vol. 85. — P. 104297.
229. Sikorski, P. J. The identity and methylation status of the first transcribed nucleotide in eukaryotic mRNA 5' cap modulates protein expression in living cells / P. J. Sikorski, M. Warminski, D. Kubacka [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2020. — Vol. 48, № 4. — P. 1607–1626.
230. Siniavin, A. E. New conjugates based on N4-hydroxycytidine with more potent antiviral efficacy in vitro than EIDD-2801 against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses / A. E. Siniavin, V. A. Gushchin, N. S. Shastina [et al.] // *Antiviral Research*. — 2024. — Vol. 225. — P. 105871.
231. Skibinski, D. A. G. Combination vaccines / D. A. G. Skibinski, B. C. Baudner, M. Singh [et al.] // *Journal of Global Infectious Diseases*. — 2011. — Vol. 3, № 1. — P. 63.
232. Smorodintseff, A. A. Investigation on volunteers infected with the influenza virus / A. A. Smorodintseff, M. D. Tushinsky, A. I. Drobyshevskaya [et al.]. — 1937.

233. Soens, M. A phase 3 randomized safety and immunogenicity trial of mRNA-1010 seasonal influenza vaccine in adults / M. Soens, J. Ananworanich, B. Hicks [et al.] // *Vaccine*. — 2025. — Vol. 50. — P. 126847.
234. Starostina, E. V. Construction and Immunogenicity of Modified mRNA-Vaccine Variants Encoding Influenza Virus Antigens / E. V. Starostina, S. V. Sharabrin, D. N. Antropov [et al.] // *Vaccines*. — 2021. — Vol. 9, № 5. — P. 452.
235. Statement on the antigen composition of COVID-19 vaccines // WHO. — URL: <https://www.who.int/news/item/18-12-2025-statement-on-the-antigen-composition-of-covid-19-vaccines> (дата обращения: 03.02.2026). — Текст : электронный.
236. Stone, J. H. Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 / J. H. Stone, M. J. Frigault, N. J. Serling-Boyd [et al.] // *New England Journal of Medicine*. — 2020. — Vol. 383, № 24. — P. 2333–2344.
237. Sui, J. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses / J. Sui, W. C. Hwang, S. Perez [et al.] // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2009. — Vol. 16, № 3. — P. 265–273.
238. Sun, Y. Guinea Pig Model for Evaluating the Potential Public Health Risk of Swine and Avian Influenza Viruses / Y. Sun, Y. Bi, J. Pu [et al.] // *PLoS ONE*. — 2010. — Vol. 5, № 11. — P. e15537.
239. Sutton, W. J. H. Quantification of SARS-CoV-2 spike protein expression from mRNA vaccines using isotope dilution mass spectrometry / W. J. H. Sutton, P. J. Branham, Y. M. Williamson [et al.] // *Vaccine*. — 2023. — Vol. 41, № 26. — P. 3872–3884.
240. Suzuki, Y. Difference in the lipid nanoparticle technology employed in three approved siRNA (Patisiran) and mRNA (COVID-19 vaccine) drugs / Y. Suzuki, H. Ishihara // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. — 2021. — Vol. 41. — P. 100424.
241. Tamerius, J. Global Influenza Seasonality: Reconciling Patterns across Temperate and Tropical Regions / J. Tamerius, M. I. Nelson, S. Z. Zhou [et al.] // *Environmental Health Perspectives*. — 2011. — Vol. 119, № 4. — P. 439–445.
242. Tenforde, M. W. Effect of Antigenic Drift on Influenza Vaccine Effectiveness in the United States—2019–2020 / M. W. Tenforde, H. K. Talbot, C. H. Trabue [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. — 2021. — Vol. 73, № 11. — P. e4244–e4250.

243. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 // *New England Journal of Medicine*. — 2021. — Vol. 384, № 8. — P. 693–704.
244. Throsby, M. Heterosubtypic Neutralizing Monoclonal Antibodies Cross-Protective against H5N1 and H1N1 Recovered from Human IgM+ Memory B Cells / M. Throsby, E. van den Brink, M. Jongeneelen [et al.] // *PLoS ONE*. — 2008. — Vol. 3, № 12. — P. e3942.
245. Timofeeva, T. A. Predicting the Evolutionary Variability of the Influenza A Virus / T. A. Timofeeva, L. G. Rudenko // *Acta Naturae*. — 2017. — Vol. 9, № 3. — P. 48–54.
246. Timofeeva, T. A. Mutations in the genome of avian influenza viruses of the H1 and H5 subtypes responsible for adaptation to mammals / T. A. Timofeeva, I. A. Rudneva, N. F. Lomakina [et al.] // *Microbiology Independent Research Journal (MIR Journal)*. — 2021. — Vol. 8, № 1.
247. Tong, S. A distinct lineage of influenza A virus from bats / S. Tong, Y. Li, P. Rivaller [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2012. — Vol. 109, № 11. — P. 4269–4274.
248. Townsend, J. P. Seasonality of endemic COVID-19 / J. P. Townsend, H. B. Hassler, A. D. Lamb [et al.] // *mBio*. — 2023. — Vol. 14, № 6.
249. Treating Flu with Antiviral Drugs // CDC. — URL: <https://www.cdc.gov/flu/treatment/antiviral-drugs.html> (дата обращения: 29.01.2026). — Текст : электронный.
250. Trepotec, Z. Segmented poly(A) tails significantly reduce recombination of plasmid DNA without affecting mRNA translation efficiency or half-life / Z. Trepotec, J. Geiger, C. Plank [et al.] // *RNA*. — 2019. — Vol. 25, № 4. — P. 507–518.
251. Troeger, C. E. Mortality, morbidity, and hospitalisations due to influenza lower respiratory tract infections, 2017: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 / C. E. Troeger, B. F. Blacker, I. A. Khalil [et al.] // *The Lancet Respiratory Medicine*. — 2019. — Vol. 7, № 1. — P. 69–89.
252. Tukhvatulin, A. I. Immunogenicity and protectivity of intranasally delivered vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine Sputnik V in mice and non-

- human primates / A. I. Tukhvatulin, I. V. Gordeychuk, I. V. Dolzhikova [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. — 2022. — Vol. 11, № 1. — P. 2229–2247.
253. Valero, J. A serum-stable RNA aptamer specific for SARS-CoV-2 neutralizes viral entry / J. Valero, L. Civit, D. M. Dupont [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2021. — Vol. 118, № 50.
254. Van De Sandt, C. E. Novel G3/DT adjuvant promotes the induction of protective T cells responses after vaccination with a seasonal trivalent inactivated split-virion influenza vaccine / C. E. Van De Sandt, J. H. C. M. Kreijtz, G. F. Rimmelzwaan [et al.] // *Vaccine*. — 2014. — Vol. 32, № 43. — P. 5614–5623.
255. Van Der Lubbe, J. E. M. Mini-hemagglutinin vaccination induces cross-reactive antibodies in pre-exposed NHP that protect mice against lethal influenza challenge / J. E. M. Van Der Lubbe, J. W. A. Verspuij, S. Huizingh [et al.] // *npj Vaccines*. — 2018. — Vol. 3, № 1. — P. 25.
256. Van Riel, D. Human and Avian Influenza Viruses Target Different Cells in the Lower Respiratory Tract of Humans and Other Mammals / D. Van Riel, V. J. Munster, E. de Wit [et al.] // *The American Journal of Pathology*. — 2007. — Vol. 171, № 4. — P. 1215–1223.
257. Vende, P. Efficient Translation of Rotavirus mRNA Requires Simultaneous Interaction of NSP3 with the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4G and the mRNA 3' End / P. Vende, M. Piron, N. Castagné [et al.] // *Journal of Virology*. — 2000. — Vol. 74, № 15. — P. 7064–7071.
258. Verbeke, R. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines / R. Verbeke, M. J. Hogan, K. Loré [et al.] // *Immunity*. — 2022. — Vol. 55, № 11. — P. 1993–2005.
259. V'kovski, P. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 / P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. — 2021. — Vol. 19, № 3. — P. 155–170.
260. Vogel, A. B. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2 / A. B. Vogel, I. Kanevsky, Y. Che [et al.] // *Nature*. — 2021. — Vol. 592, № 7853. — P. 283–289.

261. Wahl, A. SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801 / A. Wahl, L. E. Gralinski, C. E. Johnson [et al.] // *Nature*. — 2021. — Vol. 591, № 7850. — P. 451–457.
262. Wald, A. Booster Vaccination to Reduce SARS-CoV-2 Transmission and Infection / A. Wald // *JAMA*. — 2022. — Vol. 327, № 4. — P. 327.
263. Wang, M. Antibody Dynamics of 2009 Influenza A (H1N1) Virus in Infected Patients and Vaccinated People in China / M. Wang, J. Yuan, T. Li [et al.] // *PLoS ONE*. — 2011. — Vol. 6, № 2. — P. e16809.
264. Wang, Y. A 10-valent composite mRNA vaccine against both influenza and COVID-19 / Y. Wang, Q. Ma, M. Li [et al.]. — 2024.
265. Warne, N. Delivering 3 billion doses of Comirnaty in 2021 / N. Warne, M. Ruesch, P. Siwik [et al.] // *Nature Biotechnology*. — 2023.
266. Webster, R. G. Evolution and ecology of influenza A viruses / R. G. Webster, W. J. Bean, O. T. Gorman [et al.] // *Microbiological Reviews*. — 1992. — Vol. 56, № 1. — P. 152–179
267. Weekly COVID-19 Vaccination Dashboard // CDC. — URL: <https://www.cdc.gov/vaccines/imz-managers/coverage/covidvaxview/interactive/vaccination-dashboard.html> (дата обращения: 22.08.2024). — Текст : электронный.
268. Weissman, D. mRNA transcript therapy / D. Weissman // *Expert Review of Vaccines*. — 2015. — Vol. 14, № 2. — P. 265–281.
269. Weston, W. M. Kinrix™: a new combination DTaP–IPV vaccine for children aged 4–6 years / W. M. Weston, N. P. Klein // *Expert Review of Vaccines*. — 2008. — Vol. 7, № 9. — P. 1309–1320.
270. Whitley, J. Development of mRNA manufacturing for vaccines and therapeutics: mRNA platform requirements and development of a scalable production process to support early phase clinical trials / J. Whitley, C. Zwolinski, C. Denis [et al.] // *Translational Research*. — 2022. — Vol. 242. — P. 38–55.
271. Whittle, J. R. R. Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin / J. R. R. Whittle, R. Zhang, S. Khurana

- [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2011. — Vol. 108, № 34. — P. 14216–14221.
272. WHO guidelines on non-clinical evaluation of vaccines, Annex 1, TRS No 927 // WHO. — URL: <https://www.who.int/publications/m/item/nonclinical-evaluation-of-vaccines-annex-1-trs-no-927> (дата обращения: 13.05.2025). — Текст : электронный.
273. Widge, A. T. An influenza hemagglutinin stem nanoparticle vaccine induces cross-group 1 neutralizing antibodies in healthy adults / A. T. Widge, A. R. Hofstetter, K. V. Houser [et al.] // Science Translational Medicine. — 2023. — Vol. 15, № 692. — P. eade4790.
274. Wolf, M. A. Multivalent mRNA-DTP vaccines are immunogenic and provide protection from Bordetella pertussis challenge in mice / M. A. Wolf, J. M. O'Hara, G. J. Bitzer [et al.] // npj Vaccines. — 2024. — Vol. 9, № 1.
275. Wong, S.-S. Traditional and New Influenza Vaccines / S.-S. Wong, R. J. Webby // Clinical Microbiology Reviews. — 2013. — Vol. 26, № 3. — P. 476–492.
276. Wrammert, J. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus / J. Wrammert, K. Smith, J. Miller [et al.] // Nature. — 2008. — Vol. 453, № 7195. — P. 667–671.
277. Xia, S. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein / S. Xia, M. Liu, C. Wang [et al.] // Cellular & Molecular Immunology. — 2020. — Vol. 17, № 7. — P. 765–767.
278. Xia, X. Detailed Dissection and Critical Evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA Vaccines / X. Xia // Vaccines. — 2021. — Vol. 9, № 7. — P. 734.
279. Xia, Y.-L. A Deep Learning Approach for Predicting Antigenic Variation of Influenza A H3N2 / Y.-L. Xia // Computational and Mathematical Methods in Medicine. — 2021. — Vol. 2021. — P. 1–10.
280. Xiao, J. Conserved peptides enhance immune efficiency of inactive vaccines against emerging avian influenza viruses in chicken / J. Xiao // Science China Life Sciences. — 2017. — Vol. 60, № 12. — P. 1340–1347

281. Xing, M. An intranasal combination vaccine induces systemic and mucosal immunity against COVID-19 and influenza / M. Xing // *npj Vaccines*. — 2024. — Vol. 9, № 1. — P. 64.
282. Yang, Y. T. Hypothermia in mice due to influenza virus infection / Y. T. Yang, C. A. Evans // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. — 1961. — Vol. 108, № 3. — P. 776–780
283. Ye, Q. Rational development of a combined mRNA vaccine against COVID-19 and influenza / Q. Ye, M. Wu, C. Zhou [et al.] // *npj Vaccines*. — 2022. — Vol. 7, № 1. — P. 84.
284. Yewdell, J. W. Original Antigenic Sin: How Original? How Sinful? / J. W. Yewdell, J. J. S. Santos // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. — 2021. — Vol. 11, № 5. — P. a038786.
285. Yu, H. Characterization of Regional Influenza Seasonality Patterns in China and Implications for Vaccination Strategies: Spatio-Temporal Modeling of Surveillance Data / H. Yu, W. J. Alonso, L. Feng [et al.] // *PLoS Medicine*. — 2013. — Vol. 10, № 11. — P. e1001552.
286. Zaki, A. M. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia / A. M. Zaki, S. van Boheemen, T. M. Bestebroer [et al.] // *New England Journal of Medicine*. — 2012. — Vol. 367, № 19. — P. 1814–1820.
287. Zhang, J. Development of MDCK-based quadrivalent split seasonal influenza virus vaccine with high safety and immunoprotection: A preclinical study / J. Zhang // *Antiviral Research*. — 2023. — Vol. 216. — P. 105639.
288. Zhang, J. Recent Advances and Innovations in the Preparation and Purification of In Vitro-Transcribed-mRNA-Based Molecules / J. Zhang, Y. Liu, C. Li [et al.] // *Pharmaceutics*. — 2023. — Vol. 15, № 9. — P. 2182.
289. Zhirnov, O. P. Unique Bipolar Gene Architecture in the RNA Genome of Influenza A Virus / O. P. Zhirnov // *Biochemistry (Moscow)*. — 2020. — Vol. 85, № 3. — P. 387–392.
290. Zhirnov, O. P. The Unique Genome of the Virus and Alternative Strategies for its Realization / O. P. Zhirnov // *Acta Naturae*. — 2023. — Vol. 15, № 2. — P. 14–19. {280}

291. Zhu, N. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 / N. Zhu, D. Zhang, W. Wang [et al.] // *New England Journal of Medicine*. — 2020. — Vol. 382, № 8. — P. 727–733.