

Мазунина Елена Петровна

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

3.2.7 – Иммунология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: **Гущин Владимир Алексеевич,**
доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Официальные оппоненты: **Красильников Игорь Викторович,**
доктор биологических наук, директор по науке Акционерного Общества «Развитие Биотехнологий» (АО «РБТ»)
Васин Андрей Владимирович,
доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, директор института биомедицинских систем и биотехнологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «05» июня 2026 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.018.03 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра: <http://www.gamaleya.org/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 21.1.018.03,
доктор биологических наук

С.А. Ермолаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. 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 (Роспотребнадзор, 2025). Эти вирусы обладают высокой изменчивостью, что позволяет им ускользать от приобретённого ранее иммунитета. Поэтому для сезонного гриппа выработана схема ежегодной смены антигенного состава вакцин. Несмотря на большое количество разрешённых к применению вакцин для профилактики гриппа, остаются нерешёнными проблемы низкой иммуногенности и эффективности вакцин, сильной зависимости эффективности вакцинации от совпадения (или несовпадения) циркулирующих и вакцинных штаммов, возможных мутаций в процессе адаптации вирусов к клеточным культурам, длительных сроков производства (Zost S.J. et al., 2017). Вакцинопрофилактика коронавируса SARS-CoV-2 столкнулась с проблемой нерегулярной и непонятной для широких слоев населения смены антигенного состава вакцин, что привело к резкому сокращению их использования. Статистика свидетельствует о том, что если исходным антигенным составом было иммунизировано подавляющее большинство людей (60-90%) в развитых странах (WHO, 2025a), то актуализированным составом иммунизируется гораздо меньшее число людей. Даже среди людей из групп риска вакцинируется незначительное число лиц (WHO, 2025b), что создает риск снижения напряженности иммунитета населения и, как следствие, значительного повышения заболеваемости и смертности от COVID-19 в будущем. Решением проблемы может стать переход к регулярному применению вакцины в отношении COVID-19. Целесообразнее всего было бы совместить такую вакцинацию с сезонной иммунизацией от гриппа, так как это единственная вакцина, ежегодно применяемая с обеспечением широкого охвата.

мРНК-платформа, активно исследуемая по всему миру и в Российской Федерации, открывает возможности для создания мультивалентных вакцин для одновременной профилактики нескольких заболеваний. Конструирование не реплицирующихся линейных мРНК-вакцин предполагает оптимизацию ключевых элементов: 5'-кэпа, нетранслируемых областей (НТО), модифицированных нуклеозидов и поли(А)-тракта. Несмотря на значимость этих модификаций для стабильности и трансляции, выбор конкретных технологических решений относительно кэпирования, модифицированных нуклеотидов и длины поли(А)-тракта остается нетривиальной задачей.

Таким образом, исследование влияния ключевых компонентов мРНК-платформы на экспрессию кодируемого белка, а также иммуногенность и эффективность экспериментальных мРНК-препаратов на животных является актуальной задачей, наряду с изучением особенностей индуцируемого ими иммунного ответа.

Степень разработанности проблемы. Платформенный подход к разработке вакцин представляет собой современную стратегию, использующую стандартизованную технологическую базу («платформу»), которую можно

быстро адаптировать для изготовления профилактических препаратов от различных патогенов (Whitley J. et al., 2022). 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, рекомбинантных белков, ДНК, разных типов РНК, включая мРНК (Kudlay D., Svistunov A., Satyshev O., 2022).

Препараты на основе мРНК представляют собой сложные молекулярные комплексы, где многокомпонентные молекулярные системы, в которых функциональная полинуклеотидная последовательность инкапсулирована в высокотехнологичную липидную наночастицу (ЛНЧ). Использование ЛНЧ позволяет стабилизировать молекулу мРНК, защищая её от ферментативной деградации, и обеспечивает эффективную доставку функциональной матрицы в цитозоль клеток-мишеней (Hou X. et al., 2021). Формирование ЛНЧ происходит путем высокоточного контролируемого микрофлюидного смешивания, что обеспечивает оптимальный размер частиц и высокую степень инкапсуляции нуклеиновой кислоты (Buschmann M.D. et al., 2021). В случае профилактических вакцинных препаратов в мРНК кодируют белковый антиген того или иного инфекционного агента. Важное значение для повышения эффективности трансляции закодированного белка с молекулы мРНК в организме, а также снижения возможности стимуляции врожденной иммунной системы, играют различные модификации ее структуры (Karikó K. et al., 2005; Pardi N. et al., 2018). К ним относятся кэп-структура, модифицированные нуклеотиды и поли(А)-тракт.

5'-кэп является важной структурой как природных, так и синтетических мРНК, которая защищает РНК от распада, обеспечивает ее экспорт из ядра и инициацию трансляции, а также участвует в сплайсинге. В условиях синтеза *in vitro* кэпирование мРНК осуществляют либо энзиматическим методом (*vaccinia capping system*), либо ко-транскрипционно. При выборе реагента для ко-транскрипционного кэпирования мРНК предпочтение отдают системе CleanCap (m7G(3'OMe)pppA(2'OMe)pG) (Sikorski P.J. et al., 2020), что позволяет достичь высоких показателей кэпированности мРНК, порядка 90-96%. Однако, CleanCap является дорогостоящим компонентом и имеет ограничения по промышленному применению. В то же время подход ARCA (Anti-Reverse Cap Analog, 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')) позволяет достичь порядка 71% кэпирования синтетической мРНК (Jemielity J. et al., 2003). При этом использование ARCA остается привлекательным вариантом ввиду его большей доступности и меньших лицензионных ограничений по сравнению с системами кэпирования последнего поколения.

Другим вопросом, требующим решения, является выбор модификаций нуклеиновых оснований при синтезе конструкции. Модификации нуклеозидов представляют собой изменения мономеров в составе ДНК и РНК. Эти модификации регулируют экспрессию генов, стабилизируют структуру РНК, повышают эффективность трансляции мРНК и позволяют синтетической мРНК

избегать распознавания рецепторами врожденной иммунной системы, что, по видимому, имеет большое значение для эффективности мРНК-вакцин (Anderson B.R. et al., 2010; Mu X. et al., 2018). Использование модифицированных нуклеотидов для получения мРНК-препаратов стало одним из прорывных открытий, которое сделало возможным широкое использование мРНК-вакцин для профилактики COVID-19 (Karikó K. et al., 2005). В разрешённых к применению мРНК вакцинах синтетическая мРНК получается со 100% заменой уридина на N1 -метилпсевдоуридин. При этом помимо N1 -метилпсевдоуридина существуют и другие модифицированные нуклеотиды – псевдоуридин, 5-метоксиуридин, N6-метиладенозин, 5-метилцитидин и другие. 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 влияют на ряд важных параметров вакцины, таких как иммунологическая эффективность, эффективная доза вакцины, её реактогенность. Немаловажным параметром, влияющим на эти процессы, является длина поли(А)-тракта мРНК. Поли(А)-тракт – это гомополимерный участок на 3'-конце мРНК, связывающийся с цитоплазматическим поли(А)-связывающим белком (РАВРС), который опосредует инициацию трансляции, стабильность и распад мРНК (Xiang K., Bartel D.P., 2021). Длина поли(А)-тракта влияет как на статус трансляции, так и на стабильность мРНК и функционирует как один из регуляторов экспрессии генов в цитоплазме (Brown C.E., Sachs A.B., 1998). В литературе по вопросу длины поли(А)-тракта мРНК встречается много противоречивой информации. Согласно результатам предшествующих исследований, для обеспечения стабильности минимально достаточна его длина примерно в 30 нуклеотидов, в то время как в одобренных мРНК-вакцинах заявляется поли(А)-тракт длиной не менее 110 нуклеотидов (Passmore L.A., Coller J., 2022). При этом некоторые мРНК стабильны и эффективно транслируются, несмотря на очень короткий (менее 20 нуклеотидов) или отсутствующий поли(А)-тракт (Сакмакси N.G. et al., 2008; Vende P. et al., 2000).

Несмотря на всю сложность устройства и высокотехнологичность, описанную выше, платформа мРНК представляется привлекательной для создания вакцины против сезонного гриппа и COVID-19 и имеет ряд преимуществ перед другими вариантами вакцин: а) с помощью синтетических мРНК можно обеспечить быстрое производство вакцин в случае появления нового штамма вируса (Chaudhary N., Weissman D., Whitehead K.A., 2021); б) производство вакцины может быть иницировано 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 (Wong S.-S., Webby R.J., 2013), д) этот тип доставки антигена способствует как

гуморальному, так и клеточному иммунному ответу и индуцирует врожденную иммунную систему (Vogel A.B. et al., 2021).

мРНК-платформа позволяет создавать комбинированные или мультивалентные препараты, для одновременной вакцинации от нескольких инфекций, и таких разработок становится всё больше, и они охватывают не только вирусные инфекции, но и бактериальные (Wang Y. и др., 2024; Alameh M.-G. et al., 2024; Liu S. et al., 2025; Wolf M.A. et al., 2024). Комбинированные вакцинные мРНК-препараты фармацевтических компаний Пфайзер (Influenza and COVID-19 Combination) и Модерна (mRNA-1083) находятся на 3-й фазе клинических испытаний.

Данная диссертационная работа направлена на разработку элементов мРНК-платформы и создание на ее основе кандидатных вакцинных препаратов для профилактики сезонного гриппа и коронавируса SARS-CoV-2, исследование их иммуногенности, эффективности и кросс-специфичности иммунного ответа.

Цель данной диссертационной работы заключалась в разработке мРНК-платформы и создании на ее основе кандидатных вакцинных препаратов для специфической профилактики сезонного гриппа и новой коронавирусной инфекции COVID-19.

Задачи исследования:

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) 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 репортерного гена люциферазы светлячка, 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.

Получены экспериментальные мультивалентные (трех-, четырёх- и пентавалентные) мРНК-препараты для одновременной 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 для одновременной профилактики гриппа и коронавируса.

В рамках работы впервые продемонстрировано, что, в отличие от классических применяемых вакцин, способ доставки антигена с помощью мРНК (на примере гемагглютинаина вируса гриппа) приводит к выработке гуморального иммунного ответа не только на иммунодоминантный домен антигена, но и на более консервативный домен гемагглютинаина, что вероятнее всего определяет более широкий кросс-специфичный иммунный ответ.

Теоретическая и практическая значимость. В работе исследовано влияние компонентов синтетической мРНК (кЭП-структуры, модифицированных нуклеотидов и длины 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 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). Также была выявлена способность мРНК-препаратов индуцировать выработку антител к консервативному стволу 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 на детектируемом уровне в течение как минимум 245 дней.

Разработан подход для создания мультивалентных вакцинных препаратов на основе мРНК. Созданные с помощью этого подхода препараты индуцируют выработку антител, перекрёстно реагирующих с разными штаммами гриппа внутри серотипов А/Н1N1, А/Н3N2 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.

Методология и методы исследования. В ходе исследования применялись современные молекулярно-генетические методы для получения препаратов синтетической мРНК (получение ДНК-конструкций, *in vitro* транскрипция, электрофорез нуклеиновых кислот, ПЦР), иммунологические методы (ИФА, РТГА, ВНА), вирусологические методы (накопление вирусов, определение цитопатической дозы), а также методы работы с животными (иммунизация, заражение, вскрытие) и методы прикладной статистики.

Положения, выносимые на защиту.

1. Способ доставки антигена в организм экспериментальных животных в виде мРНК (содержащей кэп1 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 обеспечивает продолжительный иммунный ответ у мышей.

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 при заражении летальными дозами вируса гриппа А и сниженную вирусную нагрузку в лёгких после заражения животных вирусом SARS-CoV-2.

Степень достоверности и апробация результатов. 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 заведующей 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. Синявиным А.Э. 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 проведённого 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.

Структура и объем 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разработка элементов мРНК-платформы, обеспечивающей высокую экспрессию кодируемого белка

Начальным этапом разработки мРНК-препаратов является сборка мРНК-конструкции в выбранном ДНК-векторе. В ходе выполнения диссертационной работы были получены конструкции, кодирующие S-гликопротеин коронавируса SARS-CoV-2 в кольцевом и линейном ДНК-векторах. Показано, что использование линейного вектора позволяет стабилизировать длинные гомополимерные участки в составе конструкции (сегментированный поли(Т) тракт длиной 110А).

Исследование влияния модифицированных нуклеотидов в составе синтетической мРНК на её трансляционные характеристики, а также уровень выхода мРНК в реакции *in vitro* транскрипции показало, что 100% замена уридина на N1-метилпсевдоуридин в реакции транскрипции приводит к получению активной молекулы мРНК, которая обеспечивает экспрессию трансгена в 7 раз большую относительно немодифицированной мРНК. При этом выход мРНК в реакции *in vitro* транскрипции оказался снижен по сравнению с немодифицированным в среднем на 50%.

Согласно результатам экспериментальной работы по выбору кэпирующего агента при ко-транскрипционном кэпировании мРНК оказалось, что при отсутствии значимых отличий в трансляционной активности *in vitro* на клеточных линиях, на мышцах мРНК, кэпированная ARCA обеспечивает более быструю экспрессию закодированного белка по сравнению с мРНК, кэпированной CleanCap. Одновременно с этим наблюдается и быстрый спад экспрессии белка в случае мРНК, кэпированной ARCA, с пиком на 3 часа, и значимо более низкая экспрессия трансгена на 24 ч по сравнению с мРНК, кэпированной CleanCap, которая, как показали наши исследования, приводит к трансляции люциферазы вплоть до 21 дня на мышцах в месте введения.

Экспериментально показано, что длина сегментированного поли(А)-тракта мРНК оказывает влияние на иммуногенность кодируемого ею гемагглютинина. Для этого мыши были иммунизированы препаратами мРНК-ЛНЧ, содержащими поли(А)-тракт разной длины (0А (без поли(А)-тракта), 30А, 80А и 110А). Иммунизацию проводили согласно двукратной схеме внутримышечного введения препаратов с интервалом в 14 дней. Кровь у мышей отбирали на 14, 28, 67, 245 дни эксперимента. Сыворотку крови мышей анализировали с помощью РТГА (рисунок 1).

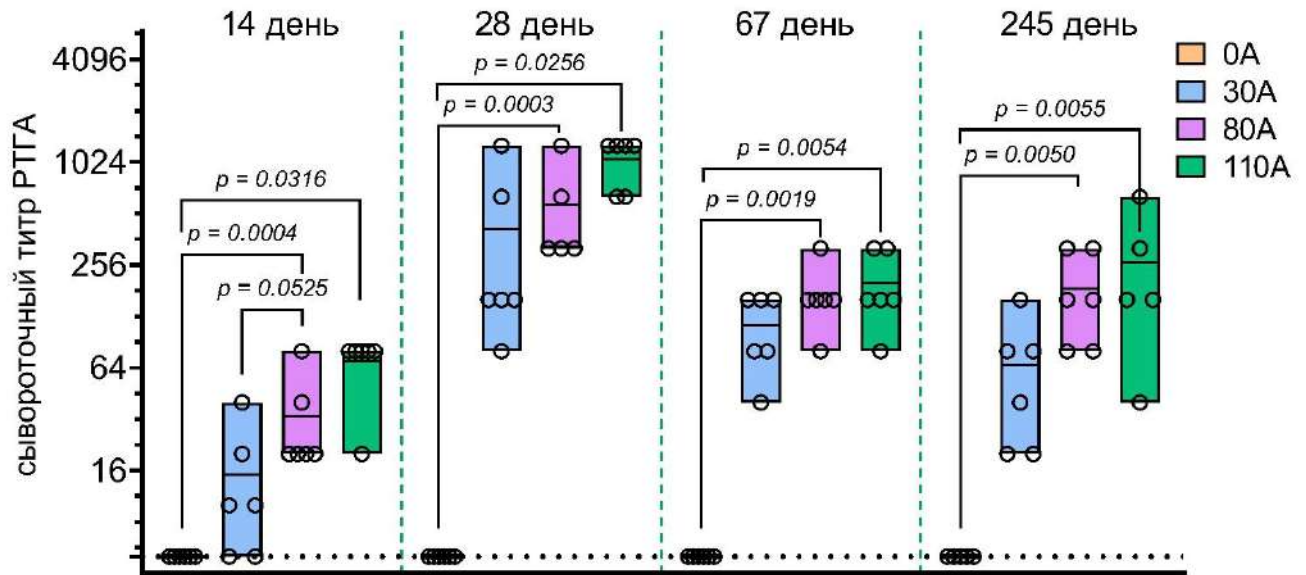


Рисунок 1 – Исследование влияния длины поли(А)-тракта мРНК на иммуногенность мРНК-ЛНЧ препарата на животных. Данные титров РТГА представлены в виде флотирующих боксов (от минимального до максимального значения) линия внутри бокса демонстрирует среднее значение, круглые символы – индивидуальные значения для каждого отдельного животного в группе; горизонтальная пунктирная линия означает нижний предел чувствительности метода, значение титра РТГА равное 1:5. 0А, 30А, 80А, 110А – длина поли(А) тракта. Статистическое сравнение проводилось с использованием критерия Краскела-Уоллиса с тестом Данна для множественного сравнения.

Таким образом можно заключить, что длина поли(А)-тракта в мРНК влияет на экспрессию трансгена на мышах. В то же время результаты сравнения мРНК-препаратов с поли(А)-трактом длиной 80А и 110А по иммуногенности демонстрируют отсутствие значимых отличий между этими группами. Поэтому выбор конструкции с длиной поли(А)-тракта 80А является «золотой серединой» между технологически достижимой длиной поли(Т)-тракта в ДНК конструкциях, кодирующих гемагглютинин, и иммуногенностью полученных мРНК-препаратов на животных.

Дополнительным результатом данного эксперимента являются данные о продолжительности иммунного ответа на препарат мРНК, кодирующей НА вируса гриппа А H1N1. 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 1).

Иммуногенность кандидатных мРНК вакцинных препаратов на животных

Согласно исследованиям «доза-эффект» для моновалентных мРНК-препаратов, кодирующих гемагглютинины вирусов гриппа А/Wisconsin/588/2019 (H1N1)pmd09, А/Darwin/9/2021 (H3N2), В/Austria/1359417/2021 (В/линия

Виктория), B/Massachusetts/02/12 (В/линия Ямагата) оптимальной дозой для всех препаратов оказалась 5 мкг инкапсулированной мРНК на мыш. Были получены комбинированные препараты путём смешивания отдельно инкапсулированных препаратов мРНК – трёх- и четырёхвалентные препараты для профилактики сезонного гриппа, и пятивалентный препарат для одновременной профилактики гриппа и коронавирусной инфекции COVID-19. Исследование иммуногенности данных препаратов показало отсутствие негативного влияния комбинирования на уровень иммунного ответа каждого из компонентов (рисунок 2).

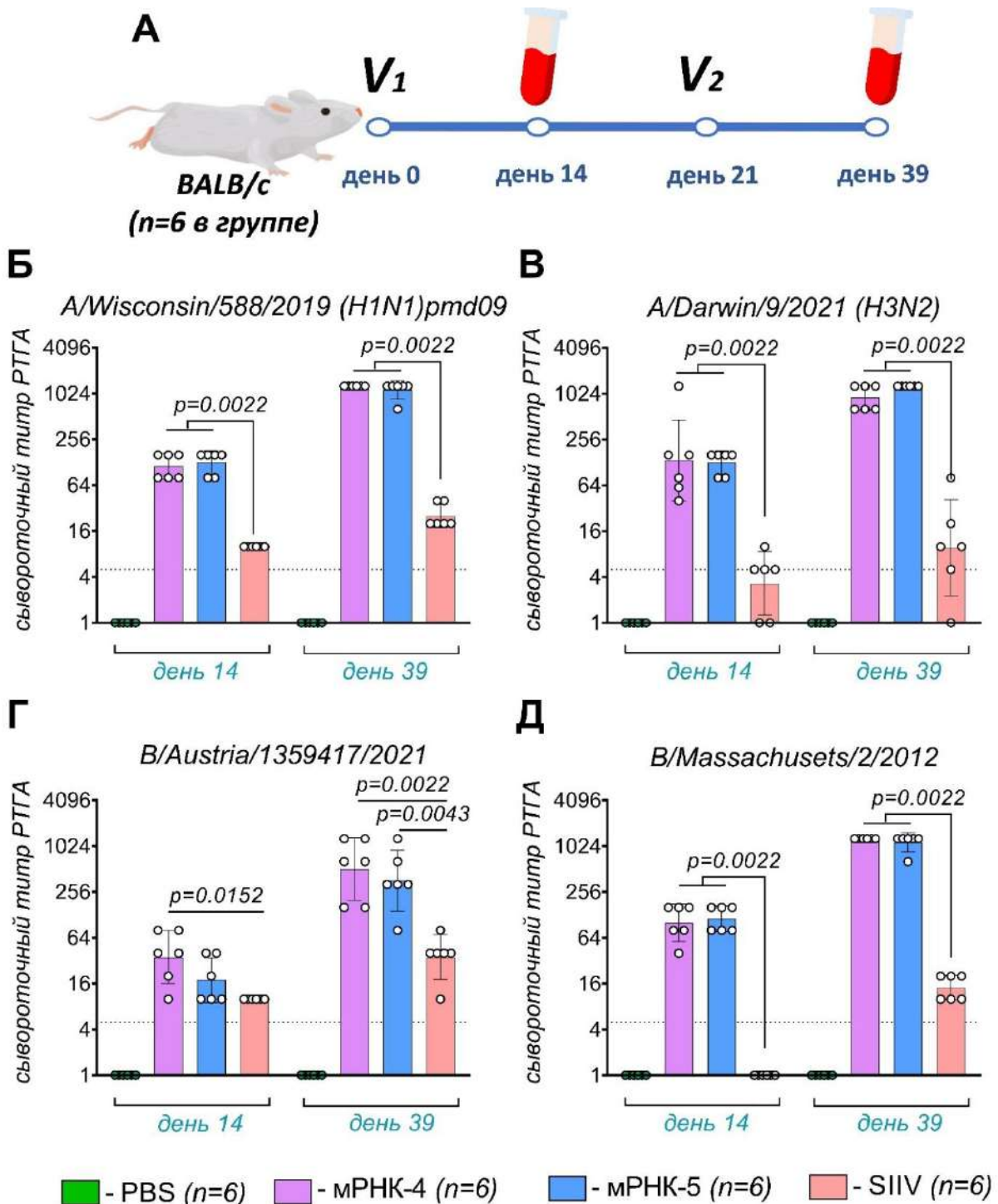


Рисунок 2 – Исследование иммуногенности гриппозных компонентов комбинированного мРНК-препарата на мышах. А - дизайн эксперимента по

определению уровня иммуногенности исследуемых вакцинных препаратов. В качестве антигенов использовали штаммы вируса гриппа, гомологичные вакцинным компонентам: H1N1 A/Wisconsin/588/2019 (Б); H3N2 A/Darwin/9/2021 (В); В/Austria/1359417/2021 (Г); В/Massachusetts/02/2012 (Д). 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. PBS – фосфатносолевой буферный раствор, мРНК-4 – четырёхвалентный мРНК-препарат, мРНК-5- комбинированный мРНК-препарат, SIV – инактивированная сплит-вакцина (1/5 человеческой дозы). Адаптировано из (Mazunina E.P. et al., 2024a).

Уровень иммунного ответа на мРНК-препарат отличался более высокими титрами в РТГА в отношении антигенов вирусов гриппа по сравнению с расщеплённой инактивированной вакциной как после первой, так и после второй иммунизации. В отношении антигена H1N1 A/Wisconsin/588/2019 титры РТГА для мРНК-препарата после второй дозы выше таковых для инактивированной сплит вакцины (SIV) в 48 раз, для H3N2 A/Darwin/9/2021 – в 142 раза, В/Austria/1359417/2021 – в 14 раз, для В/Massachusetts/02/2012 – 81 раз.

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

При изучении иммуногенности трёхвалентного мРНК-препарата на мышах (содержащего мРНК, кодирующие гемагглютинин вирусов гриппа H1N1 A/Wisconsin/588/2019, H3N2 A/Darwin/9/2021 и В/Austria/1359417/2021) сыворотка животных спустя 21 день после двукратного введения была исследована на предмет перекрёстного иммунного ответа по отношению к гетерологичным штаммам вируса гриппа.

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 оказался высоко перекрёстно-реактивным в группе животных, иммунизированных мРНК. Средние геометрические титры РТГА к штаммам H1N1 составили от 1:806 (против антигена штамма A/Guangdon-Maonan/SWL1536/2019) до 1:2032 (рисунок 3 А). Не наблюдалось существенного снижения титров РТГА даже к отдалённому пандемическому штамму A/California/07/2009 со средним значением 1:1015 (рисунок 3 А). Иммунный ответ на инактивированную вакцину был не таким выраженным, как на трёхвалентный мРНК-препарат, среднее значение титра не превышало 1:31 (против антигена штамма A/Victoria/2570/2021), что более чем в 60 раз ниже, чем в группе мышей, получивших мРНК-препарат.

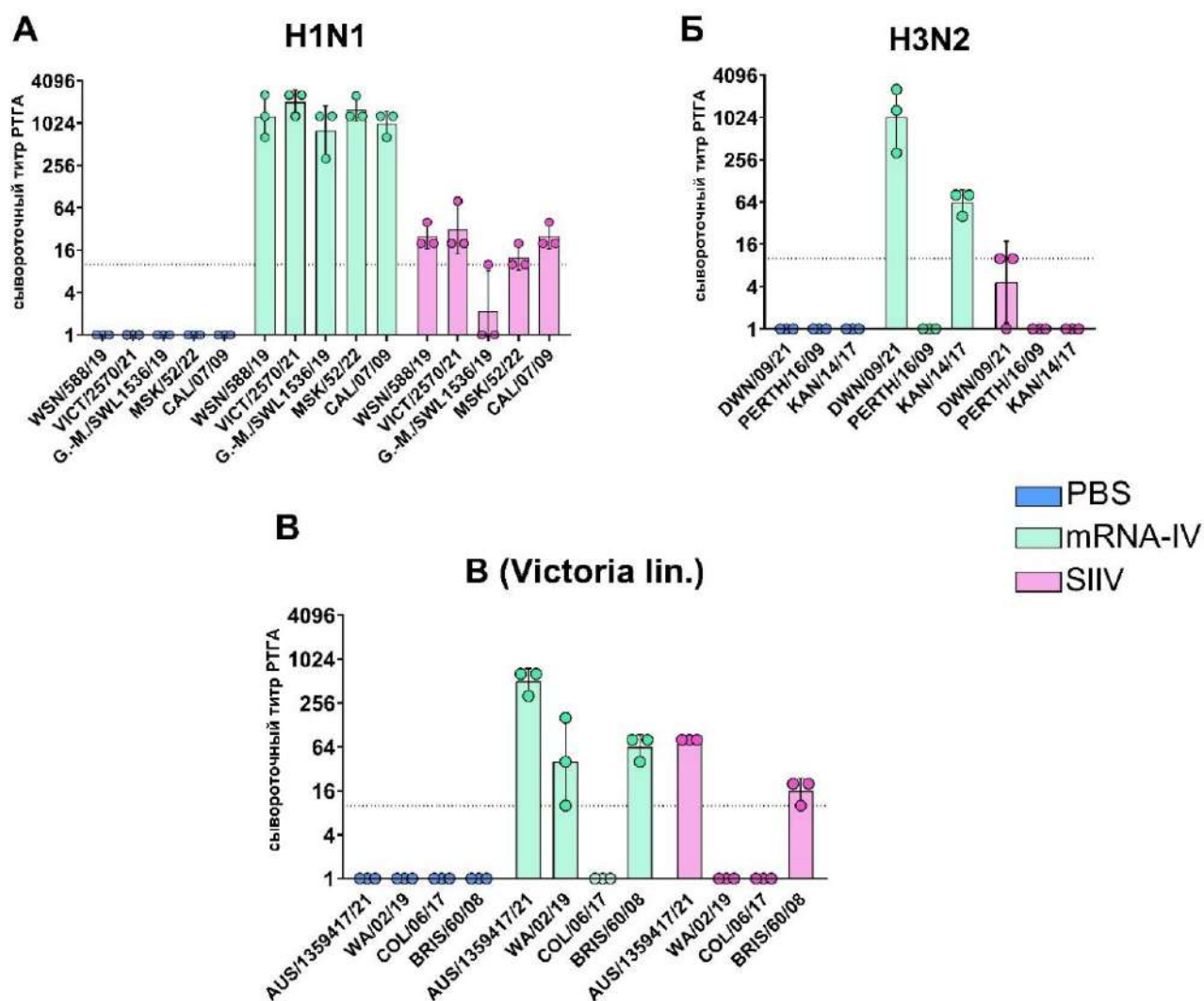


Рисунок 3 – Оценка перекрёстного иммунного ответа методом РТГА. Представлены сывороточные титры в РТГА по отношению к штаммам вируса группа А подтипа H1N1 (Wisconsin/588/2019, Victoria/2570/2021, Guangdong-Maonan/SWL1536/2019, Moscow/52/2022, California/07/2009 (А), к штаммам вируса группа А подтипа H3N2 (Darwin/9/2021, Perth/165/2009, Kansas/14/2017 (Б), к штаммам вируса группа В (линия Виктория – Austria/1359417/2021, Washington/02/2019, Colorado/06/2017, Brisbane/60/2008 (В). Группа мРНК-IV (трёхвалентный мРНК-препарат) показана зеленым цветом, SIIV (инактивированная сплит-вакцина от гриппа) – фиолетовым, а PBS – синим. Данные являются репрезентативными для одного эксперимента и выражены как геометрические средние значения \pm SD. Адаптировано из (Mazunina E.P. et al., 2024b).

Перекрестная активность иммунного ответа на компонент Н3 (рисунок 3 Б) вакцины проявилась в снижении титров к штамму А/Kansas/14/2017 (средний геометрический титр РТГА составил 1:63) и отсутствии обнаруживаемого ответа на штамм А/Perth/165/2009, в то время как ответ на серологически близкий штамм А/Darwin/6/2021 оставался высоким со средним геометрическим титром РТГА 1:1015. В РТГА с антигенами гетерологичных штаммов вируса гриппа В (В/Washington/02/2019, В/Colorado/06/2017 и В/Brisbane/60/2008, рисунок 3 В)

титры к перечисленным штаммам были снижены по сравнению с гомологичными титрами РТГА как для мРНК, так и для расщеплённой инактивированной вакцины. В группе мРНК снижение средних титров РТГА к антигену Washington/02/2019 было в 12 раз, а к антигену V/Brisbane/60/2008 — в 8 раз. Иммунный ответ на антиген V/Colorado/06/2017 не был обнаружен в сыворотке мышей, вакцинированных как мРНК, так и SIIV. В группе SIIV иммунный ответ на антиген V/Washington/02/2019 не был обнаружен, а снижение титров РТГА к V/Brisbane/60/2008 по сравнению с гомологичным было более чем в 30 раз.

Была проверена гипотеза о том, что более высокая перекрестная активность иммунного ответа мышей после иммунизации мРНК-препаратом обусловлена высоким содержанием антител, специфичных к консервативным доменам гемагглютинина, путем исследования сывороток иммунизированных мышей в ИФА (рисунок 4).

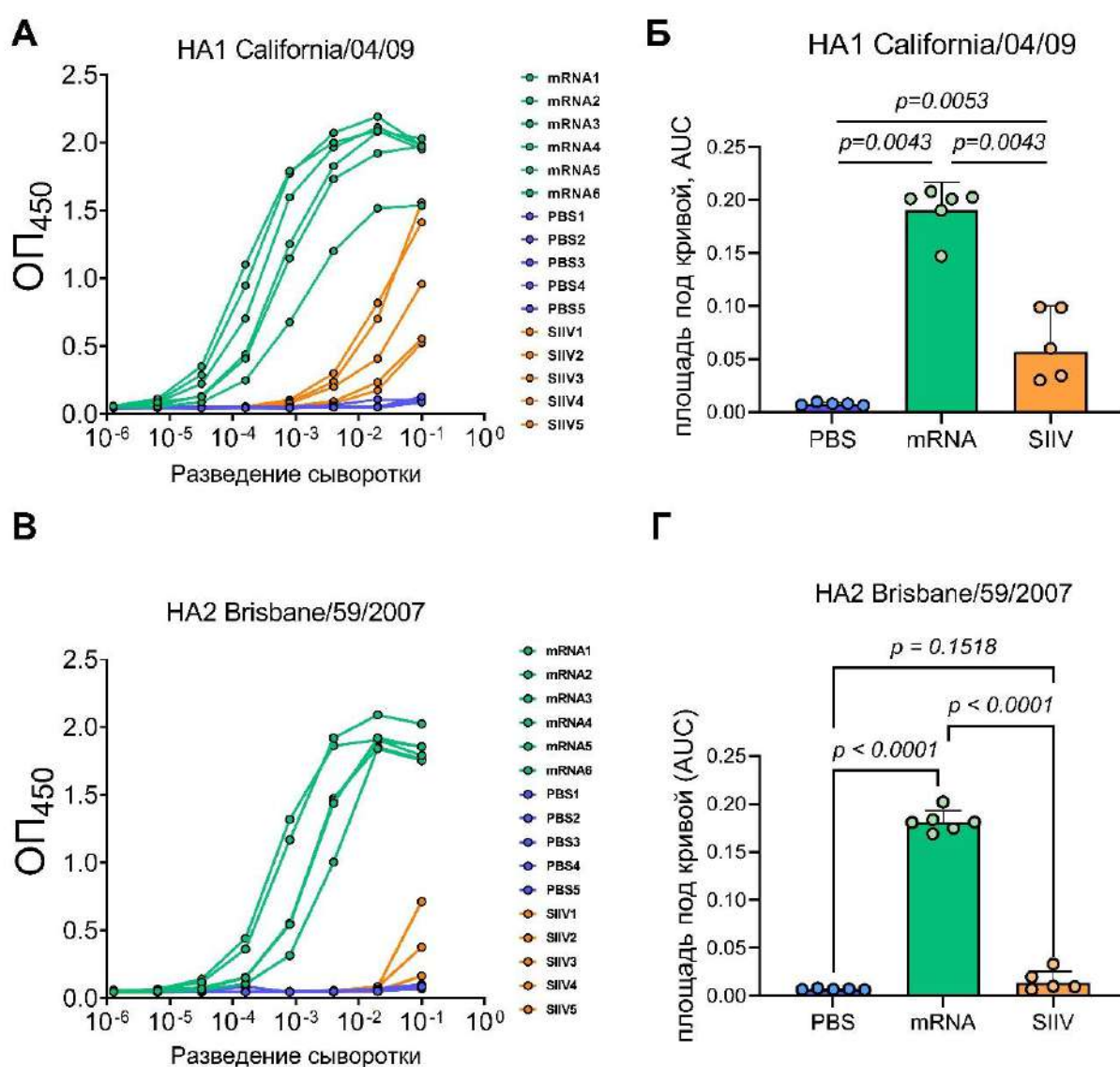


Рисунок 4 – Результаты исследования уровня антител к головному и стволочному доменам гемагглютинина вируса гриппа А H1N1 в ответ на иммунизацию животных трёхвалентным мРНК-препаратом. А и В - репрезентативные кривые титрования сывороток иммунизированных животных

в ИФА-тест системе с головным (субъединица HA1 вируса гриппа A H1N1 A/California/04/2009) и стволовым (модифицированный тримерный HA2 гриппа H1N1 A/Brisbane/59/2007) доменами HA соответственно. Б и Г - те же данные представлены как геометрические средние площади под кривыми ИФА и сравнены с помощью теста Манна-Уитни. Группа мРНК-IV (трёхвалентный мРНК-препарат) показана зеленым цветом, SIV (инактивированная сплит-вакцина от гриппа) – фиолетовым, а PBS – синим. Адаптировано из (Mazunina E.P. et al., 2024b).

В исследовании использовались сыворотки, полученные от мышей (n=6 в группе) через 21 день после двукратной иммунизации трехвалентным мРНК-препаратом, SIV и PBS. Анализ сывороток методом ИФА проводился с двумя антигенами – модифицированным тримеризованным стеблевым доменом HA (вирус гриппа H1N1 A/Brisbane/59/2007) и головным доменом HA (субъединица HA1 вируса гриппа H1N1 A/California/04/2009). Результаты ИФА показали высокий уровень антител против обеих субъединиц HA в сыворотке мышей, иммунизированных мРНК препаратом, по сравнению с вакцинированными SIV (рисунок 4).

Среднее геометрическое значение площади под кривой титрования для группы мРНК значительно отличается от такового для групп PBS и SIV в ИФА с обоими доменами HA (рисунок 4 Б и Г).

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 HA, так и на консервативный стволовой домен HA. При одинаковом количестве сорбируемого на плашке антигена для проведения ИФА, в сыворотках мышей, иммунизированных мРНК-препаратом антительный ответ на оба домена HA оказался в среднем одинаковым, несмотря на различную степень гомологии 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 стволовой домен. В контексте создания более универсальных вакцин от гриппа иммунный ответ на консервативные участки гемагглютинаина, подверженного непрерывным изменениям от сезона к сезону, является очень важным, что добавляет преимущество мРНК-платформе.

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

Протективная активность комбинированного мРНК препарата (содержащего мРНК, кодирующие гемагглютинины (HA) четырёх сезонных вирусов гриппа и S- белка коронавируса SARS-CoV-2) проверялась в экспериментах на мышинной модели вирусной инфекции, вызванной заражением штаммом вируса гриппа A (H1N1) Victoria/2570/2019 (m.a.), 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 В.6Сg-Tg(K18-ACE2), возрастом 4-5 недель были вакцинированы согласно двукратной схеме, приведённой на рисунке 5.

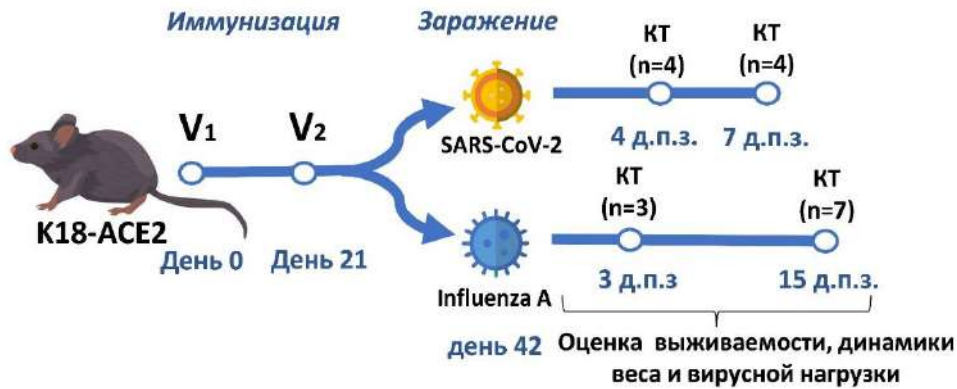


Рисунок 5 – Схема эксперимента по протективной эффективности комбинированного мРНК-препарата. Адаптировано из (Mazunina E.P. et al., 2024a).

Одна доза пятикомпонентного мРНК-препарата на животное содержала по 5 мкг мРНК, кодирующих антигены вирусов гриппа и коронавируса. Животным из контрольной группы был введён фосфатно-солевой буферный раствор. Спустя 21 день после полной схемы вакцинации мыши были заражены отдельно вирусом гриппа и коронавирусом. Доза вируса гриппа А (H1N1) Victoria/2570/2019 составляла 20 LD50 на животное. При вскрытии животных на 3-й день после заражения вирусом гриппа были заметны очаги некроза лёгочной ткани в контрольной группе (PBS), в то время как лёгкие животных вакцинированных комбинированным препаратом мРНК-5 визуально не имели очевидных очагов некроза (рисунок 6 В).

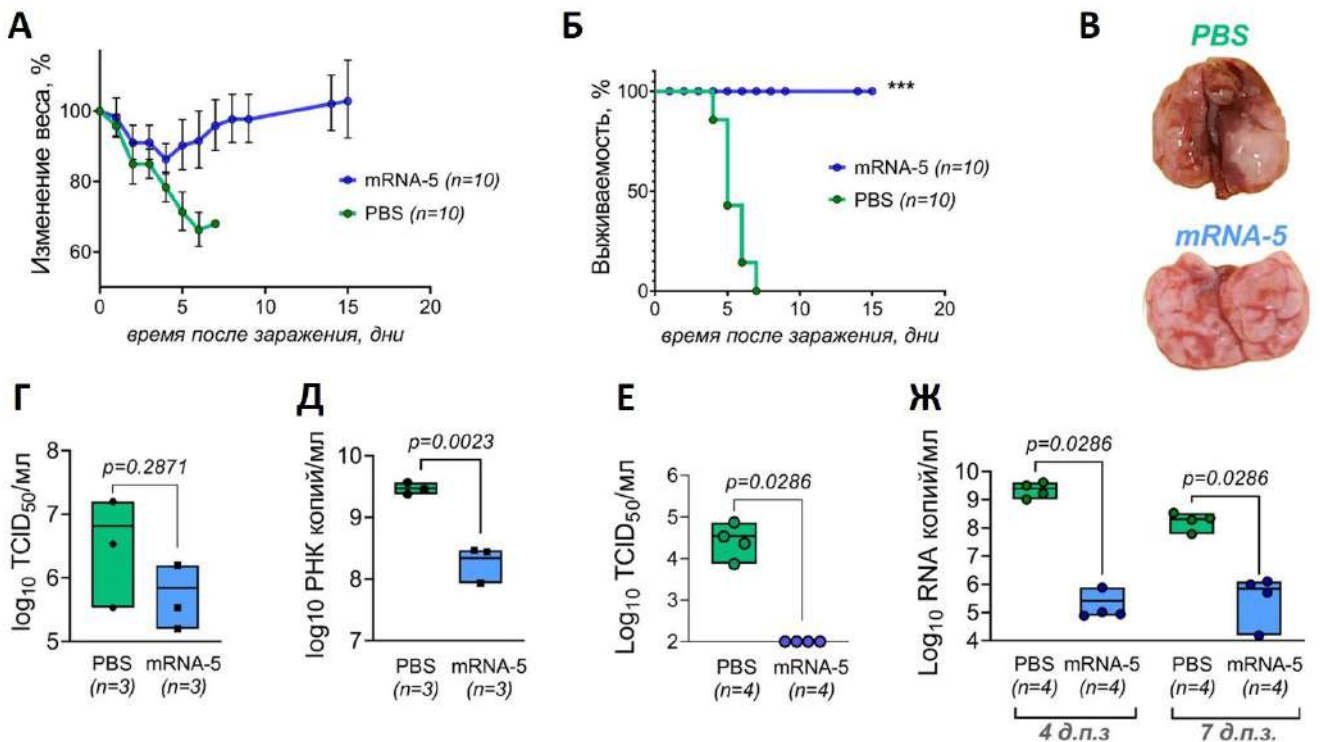


Рисунок 6 – Результаты изучения протективной эффективности комбинированного мРНК-препарата при раздельном заражении иммунизированных мышей вирусами гриппа А (H1N1) Victoria/2570/2019 и SARS-

*CoV-2. Результаты заражения вирусом гриппа: кривые выживаемости (А) и динамика потери веса после заражения (Б), фотографии лёгких изолированных у животных спустя 3 дня после заражения (В), титр вируса (Г) и вирусная нагрузка (Д) в лёгких животных на 3й день после заражения. Результаты заражения животных коронавирусом SARS-CoV-2: титр вируса SARS-CoV-2 в лёгких на 4-й день после заражения (Е) и вирусная нагрузка в лёгких животных на 4 и 7-й дни после заражения (Ж). Сравнение данных по выживаемости производили, используя тест Мантеля-Кокса. *** - критерий значимости $p \leq 0,001$. мРНК-5 – комбинированный мРНК препарат, PBS – фосфатно-солевой буферный раствор. Адаптировано из (Mazunina E.P. et al., 2024a).*

В контрольной группе мышей, получивших PBS, наблюдали гибель всей группы на 7-й день после инфицирования вирусом (рисунок 6 Б). В то же время все животные (100%), получившие комбинированный мРНК-препарат, выжили к 15 дню эксперимента, демонстрируя незначительно падение веса (в среднем на 10%) за первые 4 дня после инфицирования и полное восстановление к 9 дню (рисунок 6 А). Как показали результаты анализа вирусной нагрузки в лёгких на 3-й день после заражения вакцинация мышей комбинированным препаратом способствует значимо более низкому содержанию вируса гриппа в лёгких (рисунок 6 Г, Д).

Модель коронавирусной инфекции на мышах предусматривала интраназальное заражение вакцинированных мышей линии В.6Сg-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 подвергнуты эвтаназии для изоляции лёгких и отбора крови. В полученных биологических образцах (гомогенатах лёгких) были определены вирусная нагрузка и титры вируса (TCID₅₀), результаты представлены на рисунке 6 Е, Ж. На седьмой день жизнеспособный коронавирус в лёгких контрольных и вакцинированных препаратом мРНК-5 животных не был обнаружен при анализе TCID₅₀. При этом лёгкие животных из контрольной группы при препарировании были с признаками некроза тканей по всему органу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках разработки элементов технологической платформы для создания мРНК-вакцин нами были оптимизированы методы *in vitro* синтеза мРНК, обеспечивающие повышенную трансляционную активность и иммуногенность препаратов. В ходе экспериментов *in vitro* и *in vivo* на моделях репортерного белка (люциферазы светлячка), а также антигенов вирусов гриппа и SARS-CoV-2, было изучено влияние ключевых структурных элементов: типов кэпирующих агентов, модификаций нуклеотидов и длины поли(А)-тракта.

С помощью современных молекулярно-генетических методов были созданы кандидатные моновалентные вакцинные мРНК-препараты, оценена их трансляционная активность *in vitro* на культуре клеток и иммуногенность на животных, выбраны оптимальные дозы для иммунизации. Кроме того, на примере одного из моновалентных препаратов (мРНК, кодирующей HA A/H1N1) была

продемонстрирована значительная продолжительность иммунного ответа, достигающая 245 дней после введения второй дозы препарата.

На животной модели нами была показана высокая иммуногенность трёх- и четырёхвалентного препаратов мРНК, кодирующих антигены трёх и четырёх вирусов гриппа, соответственно, превосходящая таковую для препарата сравнения (четырёхвалентная инактивированная сплит-вакцина от гриппа).

На основе оптимизированной мРНК-платформы разработан мультивалентный кандидатный препарат для сочетанной профилактики сезонного гриппа и коронавирусной инфекции. В ходе исследований *in vivo* было доказано отсутствие антагонизма между компонентами вакцины. Препарат обеспечил полную (100%) защиту животных от летальной инфекции и достоверное снижение титров вирусов в легочной ткани по сравнению с группой плацебо. Практическая значимость работы заключается в возможности перехода к клиническим исследованиям данной комбинированной вакцины для нужд здравоохранения.

В заключение стоит отметить, что развитие данной тематики перспективно в контексте создания универсальных вакцин для профилактики гриппа и коронавирусной инфекции COVID-19. 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 приводит к снижению 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 инактивированной сплит-вакцины, что вероятно связано с более высоким количеством антител не только к подверженному изменениям головному ($p=0,043$), но и консервативному стволу доменам гемагглютинина ($p < 0,0001$).

7. Комбинированные кандидатные вакцинные препараты, разработанные на основе мРНК, с высокой эффективностью (100%) защищают мышей трансгенной линии В.6Сg-Tg(K18-ACE2) от гибели после заражения 20-кратной дозой LD50 вируса гриппа А 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.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшее развитие темы исследования в рамках совершенствования разработанной технологической платформы мРНК-вакцин предполагает работу по следующим направлениям:

- **Клиническая апробация:** переход к фазе клинических исследований созданного мультивалентного препарата для сочетанной профилактики гриппа и COVID-19 с целью подтверждения его безопасности и эффективности для человека.
- **Создание универсальных вакцин:** применение биоинформатических подходов для дизайна консервативных антигенов, что позволит разработать «универсальные» вакцинные препараты, обладающие широким спектром защиты против различных штаммов вирусов гриппа и вариантов SARS-CoV-2.
- **Оптимизация систем доставки:** изучение влияния различных составов липидных наночастиц (LNP) на термостабильность и органотропность препаратов для упрощения логистики и расширения способов введения (например, интраназально).
- **Расширение спектра мишеней:** адаптация оптимизированной мРНК-платформы для создания вакцин против других социально значимых инфекционных заболеваний, а также персонализированных противоопухолевых вакцин.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. **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, A.E. Siniavin, E.I. Burtseva, M.M. Shmarov, E.A. Mukasheva, E.N. Bykonja, S.R. Kozlova, E.A. Evgrafova, A.N. Zolotar, E.V. Shidlovskaya, E.S. Kirillova, A.S. Krepkaia, E.V. Usachev, N.A. Kuznetsova, I.A. Ivanov, S.E. Dmitriev, R.A. Ivanov, D.Y. Logunov, A.L. Gintsburg // *Frontiers in Immunology*. – 2024. – №15. – С.1381508.

2. **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. Bykonja, D.A. Kleymenov, A.E. Siniavin, S.R. Kozlova, E.A. Mukasheva, E.V. Shidlovskaya, N.A. Kuznetsova, E.V. Usachev, V.I. Zlobin, E.I. Burtseva, R.I. Ivanov, D.Y. Logunov, A.L. Gintsburg // *Vaccines*. — 2024. — Vol. 12, № 11. — P. 1206.

3. **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, E.N. Bykonja, **E.P. Mazunina**, A.S. Dzharullaeva, A.N. Zolotar, A.A. Derkaev, I.B. Esmagambetov, I.I. Sorokin, E.V. Usachev, A.N. Noskov, I.A. Ivanov, T.S. Zatsepin, S.E. Dmitriev, V.A. Gushchin, B.S. Naroditsky, D.Y. Logunov, A.L. Gintsburg // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – №14. – С.1098302.

Патенты РФ на изобретение

4. Патент РФ 2792231 С1, 2023, Вектор на основе мРНК для увеличенной продукции целевого белка в клетках млекопитающих (варианты). Авторы: Дмитриев С.Е., Панова Е.А., Клейменов Д.А., **Мазунина Е.П.**, Быконя Е.Н., Джаруллаева А.Ш., Усачев Е.В., Золотарь А.Н., Иванов И.А., Тутыхина И.Л., Тухватулина Н.М., Есмагамбетов И.Б., Деркаев А.А., Сорокин И.И., Токарская Е.А., Синявин А.Э., Кузнецова Н.А., Почтовый А.А., Захарова А.А., Карпов А.П., Семихин А.С., Государев А.И., Соловьев А.И., Егорова Д.А., Щербинин Д.Н., Прусс И.В., Ткачук А.П., Зацепин Т.С., Должикова И.В., Щебляков Д.В., Гуцин В.А., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Бюл. №9; опубликовано 21.03.2023.

5. Патент РФ 2829515 С1, 2024, Тринуклеотидный кэпирующий реагент, способ его получения и применение. Авторы: Гинцбург А.Л., Логунов Д.Ю., Гуцин В.А., Долгушин С.А., Шалаев П.В., Вердиев Б.И., Иванов Р.А., Клейменов Д.А., Быконя Е.Н., **Мазунина Е.П.**, Джаруллаева А.Ш., Почтовый А.А., Синявин А.Э., Усачев Е.В., Васина Д.В., Кузнецова Н.А., Дмитриев С.Е., Иванов И.А., Тутыхина И.Л., Ремизов Т.А., Захарова А.А., Семихин А.С., Государев А.И., Егорова Д.А., Щербинин Д.Н., Токарская Е.А., Лубенец Н.Л., Тухватулина Н.М. Бюл. №31; опубликовано 31.10.2024.

6. Патент РФ 2836687 С1, 2025, Иммунобиологическое средство для индукции комплексного иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2 и вируса гриппа и его применение. Авторы: Гинцбург А.Л., Логунов Д.Ю., Гуцин В.А., Вердиев Б.И., Иванов Р.А., Клейменов Д.А., Быконя Е.Н., **Мазунина Е.П.**, Джаруллаева А.Ш., Почтовый А.А., Синявин А.Э., Усачев Е.В., Васина Д.В., Кузнецова Н.А., Дмитриев С.Е., Иванов И.А., Тутыхина И.Л., Ремизов Т.А.,

Захарова А.А., Семихин А.С., Государев А.И., Егорова Д.А., Щербинин Д.Н., Токарская Е.А., Лубенец Н.Л., Тухватулина Н.М., Бурцева Е.И., Козлова С.Р., Шмаров М.М., Мукашева Е.А. Бюл. №8; опубликовано 19.03.2025.

7. Патент РФ 2838904 С1, 2025, Иммунобиологическое средство для индукции иммунного ответа против вируса гриппа и его применение. Авторы: Гинцбург А.Л., Логунов Д.Ю., Гуцин В.А., Вердиев Б.И., Иванов Р.А., Клейменов Д.А., Быконя Е.Н., **Мазунина Е.П.**, Джаруллаева А.Ш., Почтовый А.А., Синявин А.Э., Усачев Е.В., Васина Д.В., Кузнецова Н.А., Дмитриев С.Е., Иванов И.А., Тутыхина И.Л., Ремизов Т.А., Захарова А.А., Семихин А.С., Государев А.И., Егорова Д.А., Щербинин Д.Н., Токарская Е.А., Лубенец Н.Л., Тухватулина Н.М., Бурцева Е.И., Козлова С.Р., Шмаров М.М., Мукашева Е.А. Бюл. №12; опубликовано 23.04.2025.