

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ ЛАССА

Попова О., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Зрелкин Д.И.,
Воронина Д.В., Голдовская П.П., Кан В.Ю., Должилова И.В.,
Гроусова Д.М., Ковыршина А.В., Ермолова И.А., Щебляков Д.В.,
Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Резюме. Геморрагическая лихорадка Ласса — острое инфекционное заболевание человека с высокой летальностью и пандемическим потенциалом. Геморрагическая лихорадка Ласса ежегодно уносит жизни тысяч людей. На сегодняшний день в мире нет одобренных средств для специфической терапии или профилактики заболевания. Целью данной работы было конструирование, изучение иммунобиологических свойств и доклинической безопасности кандидатной вакцины для профилактики геморрагической лихорадки Ласса на основе рекомбинантных аденовирусных векторов. В ходе работы использовались стандартные генно-инженерные, молекулярно-биологические, вирусологические методы и методы работы с лабораторными животными. В результате работы была сконструирована и охарактеризована комбинированная векторная кандидатная вакцина для профилактики геморрагической лихорадки Ласса — «ГамЛассаВак». Вакцина представлена двумя компонентами для гетерологичной иммунизации в режиме прайм-буст на основе рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусных векторов. Первый компонент вакцины — рекомбинантный аденовирус человека 26-го серотипа, второй компонент — аденовирус человека 5-го серотипа. Оба рекомбинантных вектора несут кодон-оптимизированную последовательность гликопротеина вируса Ласса. В GMP-условиях произведены и проанализированы две экспериментальные серии кандидатной вакцины. Приведены результаты исследований экспериментальных серий на соответствие требованиям, предъявляемым к вирусным векторным вакцинам. В доклинических исследованиях на мышах показана индукция анти-

Адрес для переписки:

Попова Ольга
ФГБУ «Национальный исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии имени почетного
академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства
здравоохранения РФ
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.
Тел.: 8 (499) 193-30-01.
Факс: 8 (499) 193-61-83.
E-mail: olga.popova31@yandex.ru

Address for correspondence:

Olga Popova
N. Gamaleya National Research Center
for Epidemiology and Microbiology
18 Gamaleya St
Moscow
123098 Russian Federation
Phone: +7 (499) 193-30-01.
Fax: +7 (499) 193-61-83.
E-mail: olga.popova31@yandex.ru

Образец цитирования:

О. Попова, О.В. Зубкова, Т.А. Ожаровская,
Д.И. Зрелкин, Д.В. Воронина, П.П. Голдовская,
В.Ю. Кан, И.В. Должилова, Д.М. Гроусова,
А.В. Ковыршина, И.А. Ермолова, Д.В. Щебляков,
Д.Ю. Логунов, А.Л. Гинцбург «Исследование
иммунологической эффективности и безопасности
кандидатной вакцины для профилактики
геморрагической лихорадки Ласса // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 153–168.
doi: 10.15789/1563-0625-SOT-2988

© Попова О. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O. Popova, O.V. Zubkova, T.A. Ozharovskaia, D.I. Zrelkin,
D.V. Voronina, P.P. Goldovskaya, V.Yu. Kan, I.V. Dolzhikova,
D.M. Grousova, A.V. Kovyrshina, I.A. Ermolova,
D.V. Shcheblyakov, D.Yu. Logunov, A.L. Gintsburg “Study
of the immunological efficacy and safety of a candidate vaccine
against Lassa hemorrhagic fever”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 1,
pp. 153–168.
doi: 10.15789/1563-0625-SOT-2988

© Popova O. et al., 2025

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-SOT-2988

ген-специфических IgG при введении компонентов вакцины индивидуально и в режиме прайм-буст, а также динамика развития гуморального иммунного ответа на 42-й, 77-й, 119-й и 147-й дни после вакцинации. При этом, несмотря на 100%-ную сероконверсию, вируснейтрализующие антитела не были обнаружены ни в одном из образцов, полученных от иммунизированных мышей. В исследовании биораспределения показано, что через 24 часа после внутримышечного введения компонентов кандидатной вакцины ДНК аденовирусных векторов детектируется только в месте инъекции и региональных лимфатических узлах. В результате доклинических исследований безопасности (острая токсичность, хроническая токсичность, иммунотоксичность, аллергизирующие свойства, репродуктивная токсичность) не выявлено противопоказаний для получения разрешения на клинические исследования кандидатной вакцины. В совокупности результаты демонстрируют, что кандидатная вакцина для профилактики геморрагической лихорадки Ласса на основе рекомбинантных аденовирусных векторов 26-го и 5-го серотипов является перспективным препаратом для специфической иммунопрофилактики.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка Ласса, вакцина, рекомбинантный аденовирусный вектор, аденовирус человека, иммуногенность, безопасность

STUDY OF THE IMMUNOLOGICAL EFFICACY AND SAFETY OF A CANDIDATE VACCINE AGAINST LASSA HEMORRHAGIC FEVER

**Popova O., Zubkova O.V., Ozharovskaia T.A., Zrelkin D.I.,
Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Kan V.Yu., Dolzhikova I.V.,
Grousova D.M., Kovyrshina A.V., Ermolova I.A., Shcheblyakov D.V.,
Logunov D.Yu., Gintsburg A.L.**

N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Lassa hemorrhagic fever is an acute human infectious disease with high mortality rate and pandemic potential. To date, there are no approved drugs for the specific treatment or prevention of Lassa hemorrhagic fever in the world. The aim of this study was to develop and evaluate the immunobiological properties and preclinical safety of a candidate vaccine for the prevention of Lassa hemorrhagic fever (LHF) based on recombinant human adenoviral vectors. Standard genetic engineering techniques, molecular biology techniques, virological methods, and animal testing procedures were used in the course of the study. A combined vector candidate vaccine for the prevention of Lassa hemorrhagic fever has been designed and characterized. The vaccine is composed of two components for heterologous immunization in a prime-boost regimen. Both components are based on recombinant replication-defective adenovirus vectors. The first component of the vaccine is a recombinant human adenovirus type 26; the second component is a recombinant human adenovirus type 5. Both recombinant vectors contain the codon-optimized sequence of Lassa virus glycoprotein. Two experimental batches of the candidate vaccine were produced under GMP-conditions and analyzed. The results of studies in compliance with appropriate specifications for viral vector vaccines are provided. In preclinical studies in mice, antigen-specific IgG response was detected after immunization with two vaccine components, either separately, or in a prime-boost regimen. The time dynamics of the IgG response was also studied on 42, 77, 119 and 147 days after immunization. At the same time, despite achieving 100% seroconversion, no virus neutralizing antibodies were detected in any of the samples collected from immunized mice. A biodistribution study showed that 24 hours following intramuscular injection of the vaccine components, the DNA of adenovirus vectors was detected only at the site of injection and in regional lymph nodes. Based on preclinical safety assessments (including acute toxicity, chronic toxicity, immunotoxicity, allergenic properties, reproductive toxicity), no contraindications were found for initiation of the candidate Lassa vaccine clinical trials. Taken together, the results demonstrate that the candidate vaccine for prevention of Lassa hemorrhagic fever based on recombinant adenovirus vectors types 26 and 5 is a promising drug for specific immunoprophylaxis.

Keywords: Lassa hemorrhagic fever, vaccine, adenovirus vector, human adenovirus, immunogenicity, safety assessment

Введение

Вирусные геморрагические лихорадки (ВГЛ) являются значительной причиной заболеваемости и смертности во всем мире. Эти заболевания характеризуются сложным течением, высоким уровнем летальности и обладают пандемическим потенциалом. Поскольку для большинства из них нет специфического лечения или средств профилактики, периодически возникающие вспышки могут принести разрушительный урон человечеству. Возбудители ВГЛ — ряд РНК-содержащих вирусов семейств *Filoviridae* (болезни, вызванные вирусами Эбола и Марбург), *Hantaviridae* (геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хантавирусный кардио-легочный синдром), *Nairoviridae* (геморрагическая лихорадка Крым-Конго, лихорадка Рифт-Валли), *Flaviviridae* (Денге, желтая лихорадка) и *Arenaviridae* (лимфоцитарный хореоменингит, Аргентинская, Боливийская и Венесуэльская геморрагические лихорадки, геморрагическая лихорадка Ласса) [13]. Геморрагическая лихорадка Ласса (ГЛЛ) — вирусное заболевание зоонозной природы, эндемичное для части западноафриканских стран (Нигерия, Мали, Гвинея, Того, Кот д'Ивуар, Сьерра-Леоне, Мали, Гана, Буркина-Фасо и Бенин). Этиологическим агентом ГЛЛ является РНК-содержащий вирус семейства *Arenaviridae* — вирус Ласса. Его природный резервуар — мыши рода *Mastomys natalensis*, распространенные на территории Африканского континента [12]. В трех из четырех случаев заболевание передается человеку при контакте с пищевыми продуктами или предметами обихода, контаминированными выделениями инфицированных грызунов [19]. Также имеет место передача от человека к человеку, особенно в больницах, где отсутствуют адекватные меры контроля и профилактики инфекций [19]. Ввиду ряда причин, среди которых отсутствие доступных диагностических тестов, состояние местного здравоохранения и социально-экономическое положение населения, на сегодняшний день нет эпидемиологических данных, объективно отражающих бремя, наносимое ГЛЛ населению эндемичных регионов. На основании данных, полученных в 80-х годах прошлого века, расчетная ежегодная заболеваемость составляет от 100 до 300 тысяч, до 5000 из которых заканчиваются летальным исходом [16]. Согласно современной математической модели, основанной на данных серологических исследований, прогнозируемая заболеваемость может составлять более 890 тысяч новых случаев в год [6].

Начиная с момента открытия вируса в 1969 году многие коммерческие и научные организа-

ции инициировали исследования по разработке вакцины для профилактики ГЛЛ. Однако на сегодняшний день в мире все еще нет одобренных препаратов для специфической профилактики инфекции. В 2018 году в Нигерии была зарегистрирована беспрецедентная по количеству инфицированных и умерших людей вспышка заболевания. В течение года в регионе зафиксировали 3506 случаев, из которых 633 были подтверждены лабораторно, тогда как в 2017 году аналогичные показатели составляли 1030 и 312 случаев [10]. В связи с этим в 2018 году ВОЗ включила вирус в список приоритетных патогенов, нуждающихся в ускоренной разработке лекарств и средств профилактики [23]. Это событие привело к значительному прогрессу в области разработки вакцин. На сегодняшний день описано несколько кандидатных препаратов, обладающих благоприятными прогнозами, все они получены с помощью рекомбинантных технологий [5].

В НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ была разработана кандидатная комбинированная вакцина «ГамЛассаВак» для введения в режиме прайм-буст, основанная на репликативно-дефектных векторах, полученных из генетически и иммунологически отличных аденовирусов человека 26-го и 5-го серотипов, несущих протективный антиген вируса Ласса. Следует отметить, что вакцина «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V), сконструированная на той же технологической платформе, обладает доказанной безопасностью и эффективностью. По результатам клинических исследований показано, что вакцина хорошо переносится и индуцирует стойкий специфический протективный иммунный ответ [20, 21]. В данной работе описана технология конструирования рекомбинантных аденовирусных векторов, а также представлены результаты, полученные в рамках доклинических исследований кандидатной вакцины для профилактики ГЛЛ. Показано, что вакцина «ГамЛассаВак» не оказывает токсического действия и индуцирует стойкий антиген-специфический гуморальный иммунный ответ у экспериментальных животных.

Материалы и методы

Клеточные линии и бактериальные штаммы

В ходе работы использовали клеточные линии HEK293 — клетки почки человеческого эмбриона, содержащие в геноме E1 область Ad5; A549 — эпителиальные клетки аденокарциномы человека; Vero E6 — клетки почки зеленой африканской марышки; BHK21 — клетки почки новорожденного сирийского хомячка. Клетки культивировали в среде DMEM (HyClone, США) с добавлением

6%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США), пенициллина-стрептомицина (НПП «ПанЭко», Россия) и L-глутамина (НПП «ПанЭко», Россия) при 37 °C в атмосфере 5% CO₂.

Для генно-инженерных работ использовали лабораторные штаммы *E. coli DH5α* и *BJ5183*. Для культивирования бактериальных штаммов применяли среду 2xYT (ООО «Диаэм», Россия), агар бактериологический (ООО «Диаэм», Россия), селективные антибиотики ампициллин и канамицин (Thermo Fisher Scientific, США).

Получение рекомбинантных аденовирусных векторов

Ген гликопротеина вируса Ласса GPC (GenBank MH887755.1) синтезирован в ЗАО «Евроген». Плазмидные конструкции, кодирующие полный геном рекомбинантных аденовирусов с геном GPC в составе экспрессирующей каскады, получали методом гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli* штамма *BJ5183*. Для получения рекомбинантных вирусов препаратами плазмидной ДНК трансфицировали клетки линии HEK293 реагентом Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Трансфицированные клетки пересевали с увеличением посевной площади до наступления 100%-ного цитопатического действия. Получение рекомбинантных вирусных векторов подтверждали ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Экспериментальные серии вакцины были произведены в условиях биотехнологического производства филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Методы анализа экспериментальных серий

Анализ на стерильность, бактериальные эндотоксины, содержание общего белка проводились согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания [1].

Анализ на отсутствие микоплазмы в испытуемых образцах определяли методом ПЦР с праймерами GPO1 (actcctacgggagggcagcagt) и MGSO (tgcaccatctgtcactctgttaacctc) с последующим электрофорезом в агарозном геле.

Для определения остаточной ДНК-культуры продуцента, а также подтверждения подлинности использовали метод ПЦР-РВ на приборе CFX 96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) с реакционной смесью qPCRMix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия). В анализах применяли праймеры, специфические к ДНК HEK293 (HEK-S2 — ctaacacgggtgaaccccg и HEK-A2 — cgcaccaggtctggagtg), гексону аденовируса 26 серотипа (Hex26_Real_F — CCCTCGGCTCGGGTTTCGACCC,

Hex26_Real_R — GTCGTTGCCGGGCCAGCTGACC), гексону аденовируса 5 серотипа (Real-Ad5F — CTGGGCAATGGTCGCTATGT, Real-Ad5R — AGAAGGTGGCGTAAAGGCAAT), гликопротеину вируса Ласса (lassa-gpc-f — TCAGCCTTCTGGCAATATTGA, lassa-gpc-r — AAGTTGTTGAGCATGATCTTCC).

Количество вирусных частиц в препарате определяли набором Pico488 dsDNA quantification qit (Lumiprobe, США), для построения калибровочной кривой использовали стандартный образец аденовируса.

Концентрацию остаточного белка культуры продуцента оценивали с использованием коммерческого набора HEK 293 Host Cell Proteins (CYGNUS Technologies, США) согласно протоколу производителя.

Титр инфекционных частиц определяли в ТЦД₅₀ на культуре клеток HEK293 с учетом результатов на 10-14-й день после трансдукции [18].

2-й компонент вакцины (Ad5-GPC-LasV) проверяли на содержание репликативно-компетентных аденовирусов (РКА) титрованием в культуре клеток A549 с последующим нанесением агарозного покрытия. Учет результатов производили на 14-й день после трансдукции.

Иммуноблоттинг для оценки экспрессии GPC

Клетки линии A549 трансдуцировали аденовирусными векторами из расчета 1000 в. ч./клетку. Вестерн-блот анализ проводили, как описано ранее [15]. Для специфичного связывания с антигеном использовали сыворотку мышей, иммунизированных VSV-GPC-LasV, в разведении 1:1000. В качестве вторичных антител вносили антитела к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), в разведении 1:2500.

Эксперименты с использованием лабораторных животных

Для оценки иммуногенных свойств самок мышей BALB/c (n = 8 в группе) иммунизировали внутримышечно в дозе 2,5 × 10¹⁰ в. ч. однократно каждым из компонентов вакцины или дважды с интервалом в 21 день (rAd26-GPC-LasV — 0-й день, rAd5-GPC-LasV — 21-й день). Образцы крови у мышей, иммунизированных однократно, отбирали на 42-й день. У мышей, вакцинированных в режиме прайм-буст, кровь отбирали на 42-й, 77-й, 119-й и 147-й дни после введения 1-го компонента.

Для изучения биораспределения компонентов кандидатной вакцины мышам линии BALB/c обоих полов (по 3 самки и 3 самца в группе) внутримышечно вводили по 100 мкл rAd26-GPC-LasV либо rAd5-GPC-LasV в дозе 2,5 × 10¹⁰ в. ч./животное, контрольной группе вводили раствор плацебо, соответствующий по составу буферному

раствору вакцины. Через 24 часа мышей эвтаназировали с помощью углекислого газа и отбирали образцы исследуемых органов и тканей (желудок, легкие, нижние лимфатические узлы, мозг, матка, мочевого пузырь, мышцы, печень, почки, селезенка, семенники, сердце, толстый кишечник, тонкий кишечник, яичники).

В эксперименте по изучению токсичности оценивали влияние вакцины на состояние экспериментальных животных (мышей и кроликов) при внутримышечном и внутривенном введении. Для каждого способа введения было сформировано по 4 группы аутбредных мышей обоего пола (по 10 самок и 10 самцов в группе) и по 4 группы кроликов породы Шиншилла (по 4 самки и 4 самца в группе), которым вводили кандидатную вакцину в разных дозах ($2,5 \times 10^9$ в. ч./животное; $2,5 \times 10^{10}$ в. ч./животное; $2,5 \times 10^{11}$ в. ч./животное) либо раствор плацебо с 7-дневным интервалом между компонентами. За животными наблюдали в течение 21 дня, ежедневно проводя клинический осмотр. Фиксировали параметры функционального состояния, внешний вид, физиологические функции. На 0-й, 7-й, 14-й, 21-й дни производили взвешивание. На 21-й день животных эвтаназировали и проводили полную некропсию. При некропии исследовали внешнее состояние тела, внутренние поверхности и проходы, полость черепа, грудную, брюшную и тазовую полости с находящимися в них органами и тканями, шею с органами и тканями и скелетно-мышечную систему. Производили взвешивание следующих органов: сердце, легкие, тимус, печень, селезенка, поджелудочная железа, почки, гонады, головной мозг. Парные органы взвешивали вместе.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Для сенсibilизации 96-луночного иммунологического планшета использовали VSV-GPC-LasV в конечной концентрации 2×10^7 БОЕ/мл в 50 мМ карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9.5. После 18-часовой инкубации при 4 °C планшет трижды промывали ФСБ-Т и добавляли буфер для блокировки (ФСБ-Т с добавлением 5% обезжиренного сухого молока). Двукратные разведения сывороток иммунизированных мышей вносили в лунки планшета и инкубировали 1 час при 37 °C и 350 об/мин в планшетном термошейкере. После промывки в планшет вносили вторичные антитела к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США) в разведении 1:5000. Для визуализации связавшихся антител использовали субстрат ТМБ (Bio-Rad, США). Спустя 15 мин реакцию останавливали 1 М H_2SO_4

и результаты детектировали на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Получение вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного гликопротеином вируса Ласса

Для определения титров GPC-специфических и вируснейтрализующих IgG в сыворотках крови иммунизированных мышей использовали рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, несущий гликопротеин вируса Ласса (VSV-GPC-LasV). Вирус был получен по стандартной методике, описанной в [27]. Вирус накапливали в клетках VeroE6 и концентрировали двукратным ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы. Инфекционный титр определяли титрованием на культуре VeroE6 с нанесением агарозного покрытия, выражали в БОЕ/мл.

Реакция нейтрализации псевдовирioнов

Сыворотки крови иммунизированных мышей инкубировали 30 минут при 56 °C для инактивации системы комплемента. После готовили серийные разведения (двукратный шаг) сывороток от 1:5 до 1:640, к которым добавляли 100 БОЕ VSV-GPC-LasV. Смесь сывороток и вируса инкубировали в течение 1 часа при 37 °C. В качестве контролей использовали сыворотку крови intactных мышей и 100 БОЕ VSV-GPC-LasV без добавления антител. Далее вносили образцы в 12-луночные планшеты с высевными за сутки до постановки реакции клетками VeroE6 (монослой 90-100% конфлюэнтности). Через 3 часа инкубации (37 °C, 5% CO_2) культуральную среду, содержащую смесь вируса и антител, заменяли покрытием, содержащим 0,35% агарозы. Учет результатов производили через 72-96 часов. За положительные считали разведения сывороток, ингибирующих более 50% инфекционных вирусных частиц, относительно лунок, содержащих вирус без добавления антител.

Анализ биораспределения аденовирусных векторов

Пробы анализируемых тканей и органов гоменизировали, тотальную ДНК выделяли набором Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. Количество аденовирусной ДНК оценивали методом ПЦР-РВ с универсальными праймерами, комплементарными как к rAd26, так и rAd5 (Ad cons F — GGCGGCTGGCGGTAGAG, Ad cons R — GCAACATCTGGAACCGCG) в автоматическом режиме на амплификаторе CFX 96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Для построения стандартной калибровочной кривой использовали серию 10-кратных последовательных разведений ДНК, выделенной из концентри-

рованного препарата рекомбинантного аденовируса с известным количеством копий генома.

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили с использованием компьютерных программ GraphPad 8.0 (GraphPad Software, США), а также Excel (Microsoft, США). Для количественных результатов рассчитывали среднее арифметическое, среднее геометрическое, стандартную ошибку среднего, стандартное отклонение. При анализе данных несвязанных выборок использовали критерий Стьюдента для независимых образцов или критерий Манна–Уитни в зависимости от нормальности распределения данных. Нормальность распределения определяли с помощью обобщенного теста Д’Агостино–Пирсона. Результаты сравнения групп считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Конструирование кандидатной вакцины

Кандидатная вакцина «ГамЛассаВак» состоит из двух рекомбинантных репликативно-дефект-

ных аденовирусных векторов для гетерологичной прайм-буст иммунизации. Праймирующий компонент вакцины (1-й компонент) — вектор на основе аденовируса человека 26-го серотипа подгруппы D (rAd26-GPC-LasV). Геном rAd26-GPC-LasV содержит следующие модификации: 1) E1-область, необходимая для репликации, заменена экспрессионной кассетой, содержащей кодон-оптимизированную последовательность гена GPC вируса Ласса под контролем CMV-промотора и терминатор транскрипции SV40; 2) для повышения безопасности и увеличения пакующей емкости вектора удалена E3-область, содержащая гены белков, влияющих на иммунный ответ, но не участвующих в репликации вируса; 3) для культивирования в культуре клеток HEK293 открытая рамка считывания 6/7 (ORF6/7) E4-области заменена на аналогичную рамку, полученную из генома аденовируса человека 5 серотипа (рис. 1А). Бустующий компонент (2-й компонент) представлен вектором на основе аденовируса человека 5-го серотипа подгруппы C (rAd5-GPC-LasV). Геном rAd5-GPC-LasV не-

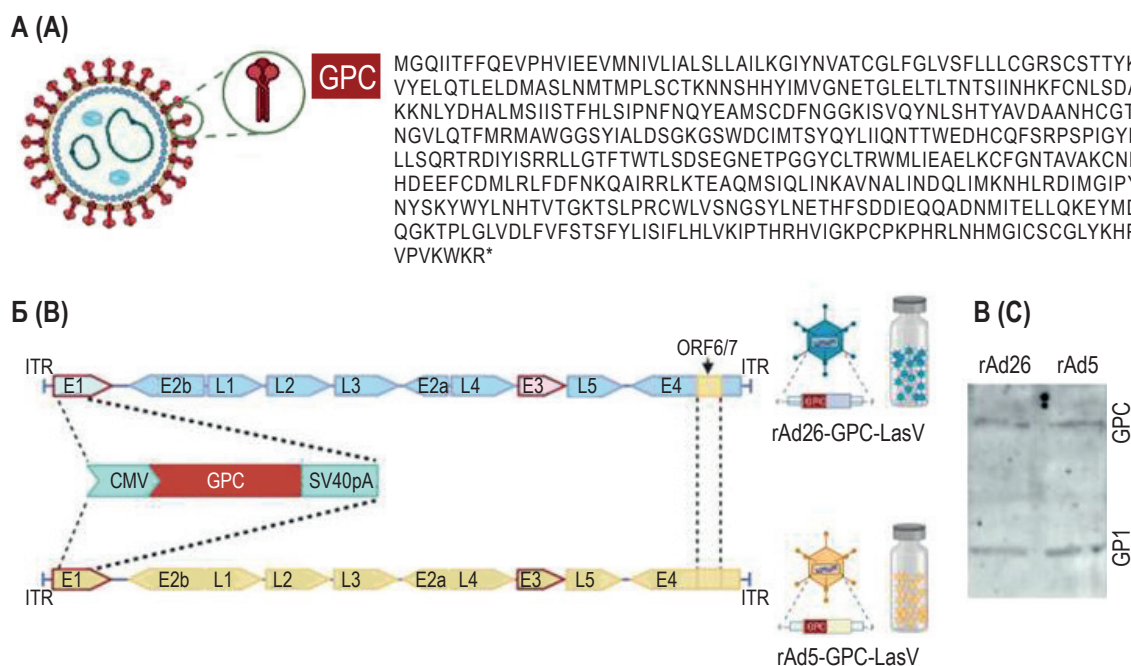


Рисунок 1. Конструирование кандидатной вакцины для профилактики ГЛЛ

Примечание. А – схематическое изображение вириона вируса Ласса и аминокислотная последовательность GPC. Б – схематическое изображение структуры генома рекомбинантных аденовирусов, несущих последовательность гликопротеина вируса Ласса. В – оценка экспрессии GPC в культуре клеток A549, трансдуцированных rAd26-GPC-LasV и rAd5-GPC-LasV.

Figure 1. Construction of a candidate vaccine for the prevention of LHF

Note. A, a schematic representation of the Lassa virus and the GPC amino acid sequence. B, a schematic representation of the genome structure of recombinant adenoviruses carrying the Lassa virus glycoprotein sequence are presented. C, an evaluation of GPC expression in A549 cell culture induced by rAd26-GPC-LasV and rAd5-GPC-LasV.

ТАБЛИЦА 1. ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СЕРИЙ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ «ГамЛассаВак» НА СООТВЕТСТВИЕ ТРЕБОВАНИЯМ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫМ К ВИРУСНЫМ ВЕКТОРНЫМ ВАКЦИНАМ

TABLE 1. STUDIES OF THE EXPERIMENTAL SERIES OF THE "GamLassaVac" CANDIDATE VACCINE ON COMPLIANCE WITH THE REQUIREMENTS FOR VIRAL VECTOR VACCINES

Показатель Indicator	Требования проекта НД Requirements of the ND project	Серия № 1 Batch No. 1		Серия № 2 Batch No. 2	
		компонент 1 component 1	компонент 2 component 2	компонент 1 component 1	компонент 2 component 2
Общие тесты General tests					
Описание Description	Раствор замороженный беловатого цвета. После размораживания: однородный бесцветный слегка опалесцирующий раствор Frozen solution of whitish color. After defrosting: homogeneous colorless slightly opalescent solution	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass
Стерильность Sterility	Должна быть стерильна Must be sterile	стерильна sterile	стерильна sterile	стерильна sterile	стерильна sterile
Микоплазмы Mycoplasma	Не должна содержать Must not contain	не содержит not contain	не содержит not contain	не содержит not contain	не содержит not contain
Бактериальные эндотоксины Bacterial endotoxins	Не более 100 единиц эндотоксина/дозу No more than 100 units of endotoxin/dose	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass
Основные тесты Basic tests					
Подлинность Identity	Должен присутствовать ген гексона аденовируса (ПЦР-РВ) The adenovirus hexon gene must be present (RT-qPCR)	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass
	Должен присутствовать ген GPC (ПЦР-РВ) The GPC gene must be present (RT-qPCR)	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass
	Должна вызывать образование специфических антител к GPC в титре не менее 1:200 Should induce the production of antibodies specific for GPC in a titer of at least 1:200	1:800	1:800	1:400	1:800
Общий белок Total protein	Не более 100 мкг/дозу No more than 100 mcg/dose	34,7	30,2	30,2	27,9
Остаточный белок Host cell protein	Не более 100 нг/дозу No more than 100 ng/dose	0	67,5	5	30
Остаточная ДНК Host cell DNA	Не более 10 нг/дозу No more than 10 ng/dose	0	0,39	0, 42	0,12

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатель Indicator	Требования проекта НД Requirements of the ND project	Серия № 1 Batch No. 1		Серия № 2 Batch No. 2	
		компонент 1 component 1	компонент 2 component 2	компонент 1 component 1	компонент 2 component 2
Специфические тесты Specific tests					
Количество вирусных частиц Virus particle concentration	(2,5±1,25) × 10 ¹¹ в. ч./дозу (2.5±1.25) × 10 ¹¹ vp/dose	3,20 × 10 ¹¹	2,7 × 10 ¹¹	2,5 × 10 ¹¹	2,2 × 10 ¹¹
Специфическая активность Specific activity	Не менее 1 × 10 ⁷ ТЦД ₅₀ /мл At least 1 × 10 ⁷ TCID ₅₀ /mL	4,22 × 10 ⁸	5,62 × 10 ⁸	2,37 × 10 ⁸	3,16 × 10 ⁸
Безопасность Safety	Не более 100 РКА × на дозу (для компонента 2) No more than 100 RCA × per dose (for component 2)		соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass

Примечание. * – репликативно-компетентный аденовирус.

Note. *, replication-competent adenovirus.

сет аналогичные модификации E1 и E3-областей (рис. 1А).

В качестве протективного антигена выбрали поверхностный белок вируса Ласса – гликопротеин GPC, отвечающий за связывание с рецепторами и слияние с клеточной мембраной (рис. 1Б). Нуклеотидная последовательность антигена была оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих. Замена редких кодонов синонимичными триплетами с учетом частоты встречаемости обеспечивает более эффективную трансляцию мРНК в трансдуцированных клетках, усиливая, тем самым, иммунологический потенциал антигена. Экспрессию гена GPC в составе аденовирусных векторов подтверждали трансдукцией клеток A549 с последующим вестерн-блот анализом (рис. 1В).

Для проведения доклинических исследований были произведены 2 экспериментальные серии вакцины. Основные показатели качества серий вакцины представлены в таблице 1.

Кандидатная вакцина индуцирует специфический гуморальный иммунный ответ у мышей

Для определения уровня антиген-специфического иммунного ответа мыши линии BALB/c были иммунизированы однократно одним из компонентов кандидатной вакцины или в режиме прайм-буст с интервалом в 21 день (рис. 2А). Сыворотки крови мышей, отобранные на 42-й день после первой иммунизации, анализировали методом ИФА. Результаты демонстрируют, что оба компонента вакцины являются иммуноген-

ными (1-й компонент СГТ = 366,8; 2-й компонент СГТ = 616,9), а наиболее выраженный гуморальный ответ развивается при введении двух компонентов в режиме прайм-буст (СГТ = 1131) (рис. 2Б).

Динамику развития гуморального ответа изучали на мышах, иммунизированных двумя компонентами с интервалом в 21 день. Уровень антител, специфических к гликопротеину вируса Ласса, оценивали через 42, 77, 119 и 147 дней после праймирующей иммунизации (рис. 3А). Согласно полученным данным, кандидатная вакцина индуцирует формирование стойкого гуморального иммунного ответа, специфические антитела циркулируют в крови грызунов на протяжении не менее 4 месяцев (рис. 3Б).

Детекцию вируснейтрализующих антител осуществляли в реакции с рекомбинантным вирусом везикулярного стоматита, псевдотипированным GPC вируса Ласса. Несмотря на 100%-ную сероконверсию, вируснейтрализующие антитела (ВНА) не были обнаружены ни в одном из образцов.

Биораспределение кандидатной вакцины в органах и тканях

Исследование биораспределения аденовирусных векторов при внутримышечном введении проводили на мышах. Было сформировано три экспериментальные группы животных, которым внутримышечно вводили по 100 мкл ($2,5 \times 10^{10}$ в. ч.) исследуемых аденовирусных векторов, контрольной группе вводили раствор пла-

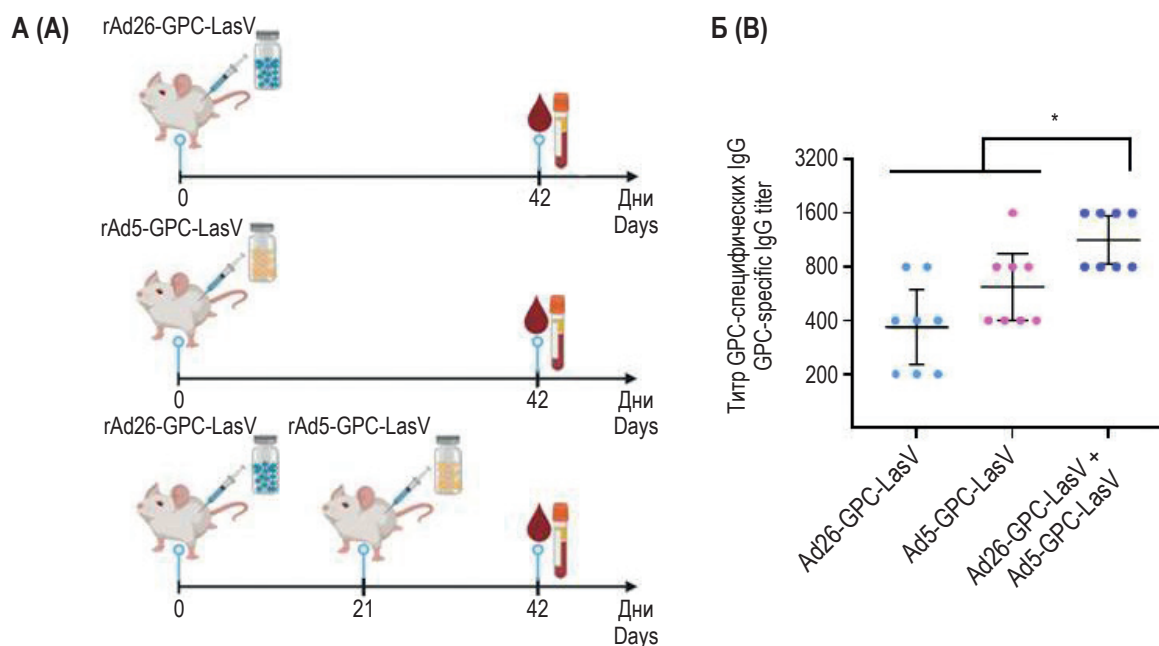


Рисунок 2. Оценка индукции гуморального иммунного ответа у мышей

Примечание. А – дизайн эксперимента. Б – титры GPC-специфических IgG в сыворотках крови мышей при однократном введении компонентов вакцины либо двукратном введении в режиме прайм-буст; на графике отмечены СГТ и 95% доверительный интервал (ДИ), * $p < 0,05$, тест Манна–Уитни.

Figure 2. Evaluation of the induction of the humoral immune response in mice

Note. A, the design of the experiment. B, titers of GPC-specific IgG in mouse serum after a single administration of vaccine components or a double administration in prime-boost regimen; the graph shows the AGT and 95% confidence interval (CI), * $p < 0.05$, Mann–Whitney test.

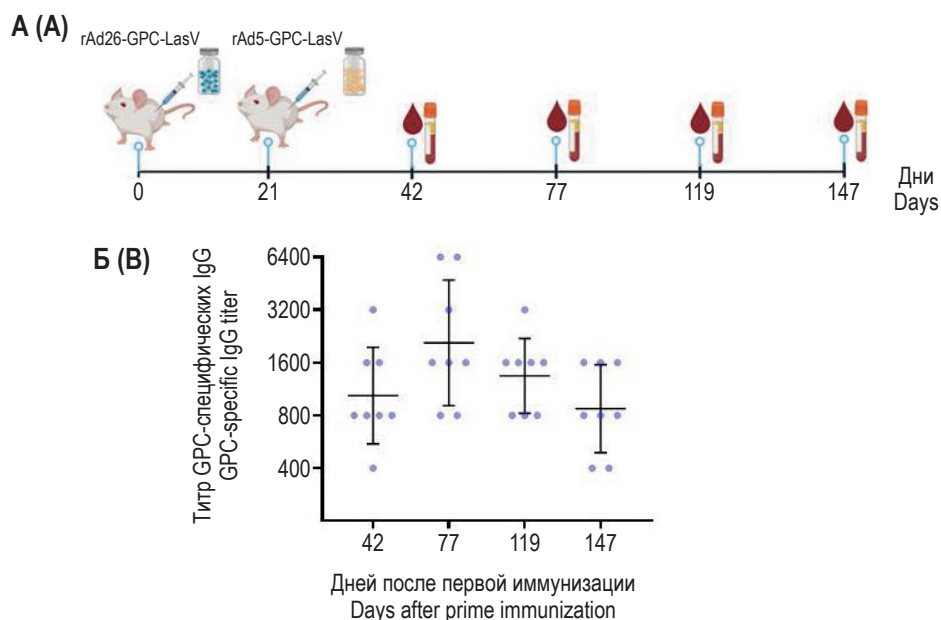


Рисунок 3. Динамика развития гуморального иммунного ответа у мышей

Примечание. А – дизайн эксперимента. Б – титры GPC-специфических IgG в сыворотках крови мышей, иммунизированных кандидатной вакциной в режиме прайм-буст; на графике отмечены СГТ и 95% доверительный интервал (ДИ).

Figure 3. Dynamic of the development of the humoral immune response in mice

Note. A, the design of the experiment. B, titers of GPC-specific IgG in the sera of mice immunized with the candidate vaccine in the prime-boost regimen; the graph shows the AGT and 95% confidence interval (CI).

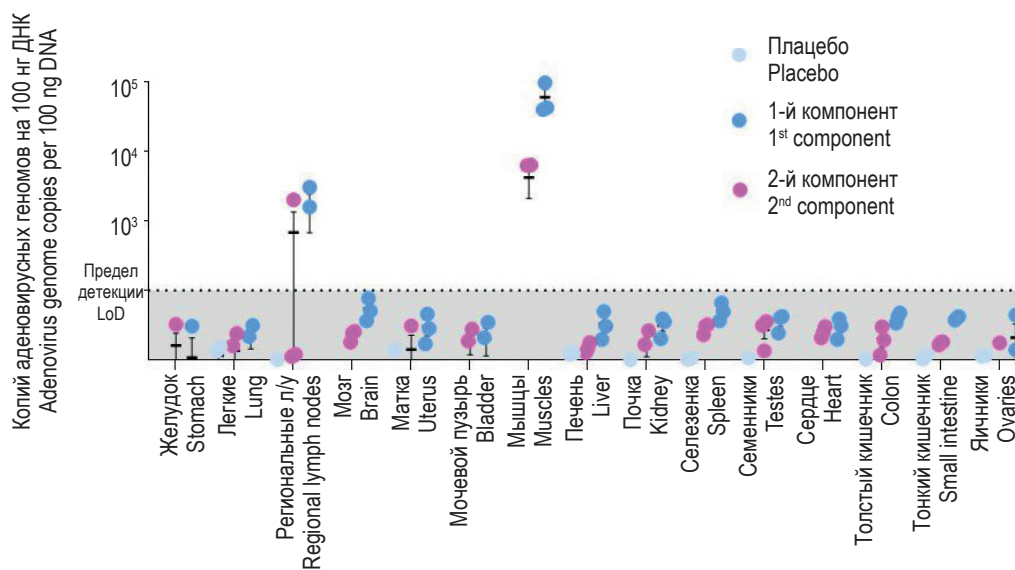


Рисунок 4. Биораспределение компонентов кандидатной вакцины в органах и тканях мышей при однократном внутримышечном введении

Figure 4. Biodistribution of the candidate vaccine components in the organs and tissues of mice after a single intramuscular injection

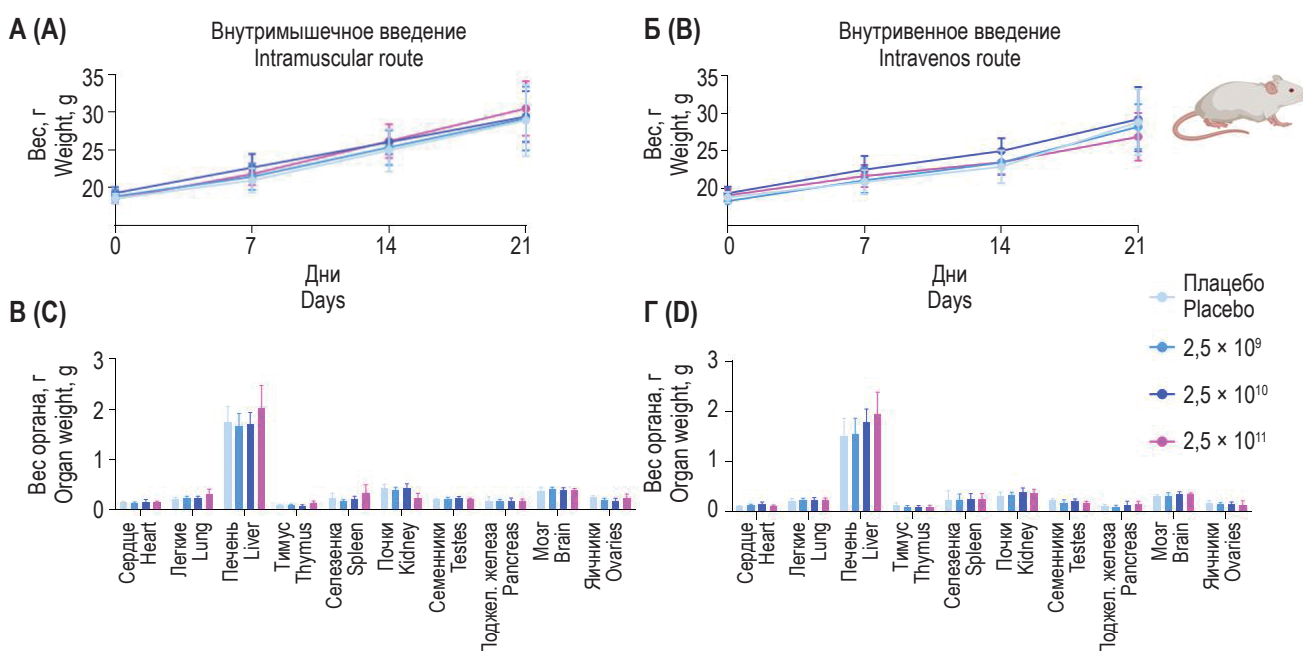


Рисунок 5. Изучение острой токсичности кандидатной вакцины на мышах

Примечание. А, Б – график изменения массы тела экспериментальных животных при внутримышечном либо внутривенном введении. В, Г – вес внутренних органов экспериментальных животных на 14-е сутки после внутримышечного либо внутривенного введения.

Figure 5. Study of the acute toxicity of the candidate vaccine in mice

Note. A,B, graph of body weight changes in experimental animals with intramuscular or intravenous administration. C, D, weight of the organs of experimental animals on the 14th day after intramuscular or intravenous administration.

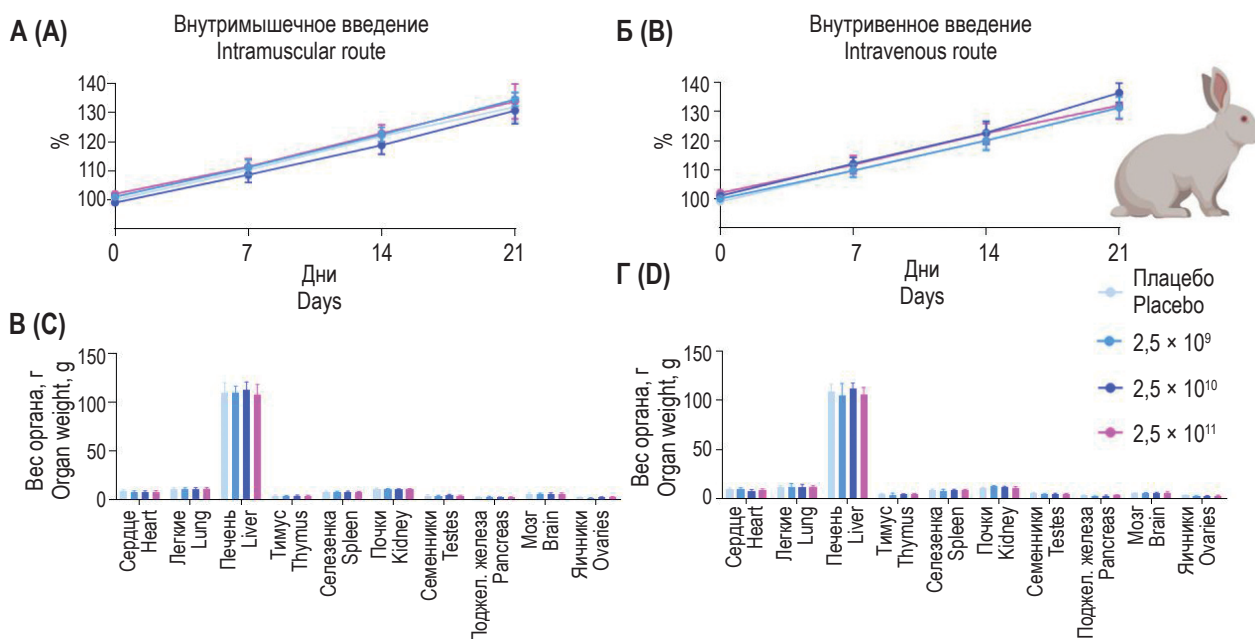


Рисунок 6. Изучение острой токсичности кандидатной вакцины на кроликах

Примечание. См. примечание к рисунку 5.

Figure 6. Study of the acute toxicity of the candidate vaccine in rabbits

Note. As for Figure 5.

цебо в том же объеме. Через 24 производили отбор органов для выделения тотальной ДНК. Как показано на рисунке 4, для аденовирусных векторов характерно распределение в месте введения (мышцы) — rAd5-GPC-LasV — 6307,97 копий геномов на 100 нг тотальной ДНК, rAd26-GPC-LasV — 59794,04 копий геномов на 100 нг тотальной ДНК. Также ДНК векторов детектировалась в нижних лимфатических узлах — rAd5-GPC-LasV — 2006,01 копий геномов на 100 нг тотальной ДНК, rAd26-GPC-LasV — 2312,15 копий геномов на 100 нг тотальной ДНК. В других образцах количество геномов рекомбинантных аденовирусов было ниже предела обнаружения ПЦР-системы.

Исследование безопасности кандидатной вакцины для профилактики лихорадки Ласса

В ходе доклинических исследований безопасности проведена оценка токсичности кандидатной вакцины при однократном введении в режиме прайм-буст (последовательно компоненты 1 и 2 с сокращенным интервалом введения относительно планируемого клинического применения) на мышах и кроликах (самцы и самки). Вакцину вводили внутримышечно или внутривенно в возрастающих дозах: $2,5 \times 10^9$, $2,5 \times 10^{10}$ и $2,5 \times 10^{11}$ в. ч. Через 7 дней после введения 1-го компонента экспериментальным животным вводили 2-й компонент вакцины. Животные контрольной группы получали раствор плацебо.

Тестируемые животные (мыши и кролики) хорошо перенесли как внутримышечное, так и внутривенное введение аденовирусных препаратов во всех дозах. За время наблюдения ни одно животное не пало, клинических признаков интоксикации не наблюдали. Интегральные показатели состояния животных не отличались между опытными и контрольными группами. Отмечена положительная динамика изменения массы тела животных во всех группах (рис. 5, 6). На 21-е сутки после введения 1-го компонента кандидатной вакцины все животные подвергались некропии. При макроскопическом исследовании не установлено влияния вакцины на состояние внутренних органов мышей и кроликов, различий между контрольными и опытными группами не обнаружено (рис. 5, 6).

Также в ходе доклинических исследований были изучены следующие показатели безопасности: хроническая токсичность при повторном введении на кроликах и крысах, иммунотоксичность на мышах гибридах F1 (CBAx C57Bl/6) и мышах линий CBA и C57Bl/6, аллергизирующие свойства при повторном введении на морских свинках альбиносах, репродуктивная токсичность на крысах. Некоторые отклонения от контрольных групп были выявлены только в тестах по оценке иммунологической токсичности. Показано умеренное влияние компонентов вакцины, введенных в высоких дозах, на активность

перитонеальных макрофагов, массу селезенки и клеточность иммунокомпетентных органов. Выявленные эффекты свидетельствуют об иммунологической активности препарата. Результаты остальных исследований демонстрировали полное отсутствие нежелательных реакций, связанных с введением препарата. По результатам проведенных исследований было получено разрешение на проведение клинических исследований кандидатной вакцины для профилактики ГЛЛ (№ 607 от 20.10.2022).

Обсуждение

Несмотря на то, что ГЛЛ остается эндемичной для стран Западной Африки, она представляет угрозу для всего мира. Наиболее рентабельный и эффективный способ контроля подобных заболеваний — вакцинопрофилактика. На сегодняшний день на разных стадиях разработки находятся более 30 кандидатных вакцин для профилактики ГЛЛ [5]. Три из них вступили в фазу клинических исследований: ДНК-вакцина INO-4500, кодирующая ген GPC; а также две вакцины на основе вирусных векторов: rVSVΔG-LASV-GPC (рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, несущий ген гликопротеина) и MV-LASV (рекомбинантная живая аттенуированная вакцина на основе вируса кори с двумя антигенами вируса Ласса — GPC и NP) [2, 3, 11, 25]. Опубликованные в 2023 году результаты I фазы клинических исследований MV-LASV свидетельствуют о хорошей переносимости и индукции гуморального ответа у людей [26].

Целевой профиль продукта, составленный ВОЗ для кандидатных вакцин для профилактики ГЛЛ, включает следующие критерии: безопасность для людей всех возрастов и беременных женщин, эффективность после однократной иммунизации, длительная защита, кросс-протекция против разных штаммов вируса, термостабильность и возможность быстрого производства в экстренной ситуации [28]. Мы ожидаем, что вакцина на основе рекомбинантных аденовирусных векторов может соответствовать данным параметрам. Аденовирусные векторы вызывают длительную экспрессию трансгена, являются мощными индукторами гуморального и клеточного иммунного ответа, которые усиливаются благодаря гетерологичной иммунизации в режиме прайм-буст. Аденовекторы являются репликативно-дефектными и, как следствие, менее реактогенными и более безопасными в сравнении с живыми вакцинами, что позволяет применять их для иммунизации в разных группах популяции,

включая людей с различными формами иммуносупрессии.

Нами была сконструирована и охарактеризована кандидатная комбинированная вакцина «ГамЛассаВак» для введения в режиме прайм-буст на основе рекомбинантных аденовирусных векторов человека 26-го и 5-го серотипов. В GMP-условиях были произведены и проанализированы на соответствие требованиям, предъявляемым к качеству вирусных векторных вакцин, 2 экспериментальные серии.

На этапе изучения иммуногенных свойств кандидатной вакцины показано, что GPC-специфические IgG формируются при введении каждого компонента, а при применении иммунизации в режиме прайм-буст титры антител достоверно увеличиваются и циркулируют в крови на протяжении не менее 4 месяцев. При этом антитела не проявляют нейтрализующую активность в реакции с псевдовирioнами. Обеспечивают ли нейтрализующие антитела вклад в протекцию при ГЛЛ до конца не ясно. Существующие данные по этой теме достаточно противоречивы. На сегодняшний день разработано несколько перспективных вакцин, для которых показана протективная активность на разных животных моделях летальной инфекции. Однако большинство из них индуцируют формирование только ненейтрализующих GPC-специфических IgG [4, 7, 22]. В то же время у людей, перенесших ГЛЛ, ВНА начинают детектироваться в низких титрах (1:10–1:100) через 4–8 месяцев после выздоровления [17]. В пользу того, что нейтрализующие антитела могут опосредовать защиту, приводят успешные экспериментальные результаты терапии морских свинок и приматов моноклональными антителами и сообщения об использовании реконвалесцентной сыворотки для лечения людей [8, 9, 14, 24]. В любом случае данный вопрос требует более глубокого изучения. Возможно, результаты исследований иммуногенных свойств кандидатных вакцин на клиническом уровне внесут большую ясность.

Было изучено биораспределение векторов для определения потенциальных тканей-мишеней, в которые могут диссеминировать рекомбинантные вирусные частицы при внутримышечном введении. Через 24 часа после введения компонентов кандидатной вакцины ДНК аденовирусных векторов детектировалась в месте инъекции и в региональных лимфатических узлах. Положительный сигнал в образцах лимфатических узлов свидетельствует о том, что рекомбинантные векторы были распознаны и захвачены иммунными клетками. Важно отметить, что результаты

анализа основаны на детекции фрагментов ДНК аденовирусных векторов. Данный метод не позволяет дифференцировать инфекционно-активные вирусные частицы от фрагментов генома разрушенных векторов.

На этапе доклинического изучения токсических свойств показано, что как внутримышечное, так и внутривенное введение компонентов кандидатной вакцины не влияет на интегральные показатели состояния экспериментальных животных (мышей и кроликов). Колебания индивидуальных и средних групповых значений массы тела животных находились в пределах нормального диапазона изменчивости. Некропсия не выявила патоморфологических изменений, связанных с введением препарата. Умеренные отклонения от контрольных групп были зафиксированы при изучении иммунологической токсичности, что, однако, не влияло на развитие гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у экспериментальных животных. В исследованиях по оценке аллергизирующих свойств, хрониче-

ской токсичности и репродуктивной токсичности не было выявлено негативного воздействия препарата. Также стоит иметь в виду, что минимальная доза аденовирусных частиц ($2,5 \times 10^{10}$), введенная мышам, по меньшей мере, в 100 раз превышает потенциальную человеческую дозу в пересчете на массу тела.

Заключение

В совокупности наши результаты демонстрируют, что кандидатная вакцина для профилактики ГЛЛ на основе рекомбинантных аденовирусных векторов 26-го и 5-го серотипов является перспективным препаратом для специфической иммунопрофилактики. В будущем планируется более детальное изучение гуморального иммунного ответа, в частности эффекторных свойств антител (антител-зависимая цитотоксичность, антител-зависимый фагоцитоз); оценка индукции специфического Т-клеточного иммунного ответа и анализ перекрестной активности против гетерологичных штаммов вируса Ласса.

Список литературы / References

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. 7019 с. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed.] Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation, 2018. 7019 p.
2. A Clinical Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of rVSVΔG-LASV-GPC Vaccine in Adults in Good General Health. ClinicalTrials.gov. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04794218>.
3. A Trial to Evaluate the Optimal Dose of MV-LASV (V182-001). ClinicalTrials.gov. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04055454>.
4. Abreu-Mota T., Hagen K.R., Cooper K., Jahrling P.B., Tan G., Wirblich C., Johnson R.F., Schnell M.J. Non-neutralizing antibodies elicited by recombinant Lassa-Rabies vaccine are critical for protection against Lassa fever. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, no. 1, 4223. doi: 10.1038/s41467-018-06741-w.
5. Ademusire B.I., Wiczorek K., Alonge A.T., Rajen A., Egbe J., Adebambo D., Offorbuike C.B., Trojan F., Przypański Z., Oduguwa I.O., Omitoyin O., Balogun T.G. Prospects of Lassa Fever candidate vaccine. *Afr. J. Infect. Dis.*, 2022, Vol. 16, no. 2, pp. 46-58.
6. Basinski A.J., Fichet-Calvet E., Sjodin A.R., Varrelman T.J., Remien C.H., Layman N.C., Bird B.H., Wolking D.J., Monagin C., Ghersi B.M., Barry P.A., Jarvis M.A., Gessler P.E., Nuismer S.L. Bridging the gap: Using reservoir ecology and human serosurveys to estimate Lassa virus spillover in West Africa. *PLoS Comput. Biol.*, 2021, Vol. 17, no. 3, e1008811. doi: 10.1371/journal.pcbi.1008811.
7. Cai Y., Ye C., Cheng B., Nogales A., Iwasaki M., Yu S., Cooper K., Liu D.X., Hart R., Adams R., Brady T., Postnikova E.N., Kurtz J., St. Claire M., Kuhn J.H., de la Torre J.C., Martínez-Sobrido L. A Lassa Fever live-attenuated vaccine based on codon deoptimization of the viral glycoprotein gene. *mBio*, 2020, Vol. 11, no. 1, e00039-20. doi: 10.1128/mBio.00039-20.
8. Cross R.W., Fenton K.A., Woolsey C., Prasad A.N., Borisevich V., Agans K.N., Deer D.J., Dobias N.S., Fears A.C., Heinrich M.L., Geisbert J.B., Garry R.F., Branco L.M., Geisbert T.W. Monoclonal antibody therapy protects nonhuman primates against mucosal exposure to Lassa virus. *Cell Rep. Med*, 2024, Vol. 5, no. 2, 101392. doi: 10.1016/j.xcrm.2024.101392.
9. Cross R.W., Mire C.E., Branco L.M., Geisbert J.B., Rowland M.M., Heinrich M.L., Goba A., Momoh M., Grant D.S., Fullah M., Khan S.H., Robinson J.E., Geisbert T.W., Garry R.F. Treatment of Lassa virus infection in outbred guinea pigs with first-in-class human monoclonal antibodies. *Antivir. Res.*, 2016, Vol. 133, pp. 218-222.

10. Dan-Nwafor C.C., Furuse Y., Ilori E.A., Ipadeola O., Akabike K.O., Ahumibe A., Ukponu W., Bakare L., Okwor T.J., Joseph G., Mba N.G., Akano A., Olayinka A.T., Okoli I., Okea R.A., Makava F., Ugbogulu N., Oladele S., Namara G., Muwanguzi E.N., Naidoo D., Mutbam S.K., Okudo I., Woldetsadik S.F., Lasuba C.L., Ihekweazu C. Measures to control protracted large Lassa fever outbreak in Nigeria, 1 January to 28 April 2019. *Euro Surveill.*, 2019, Vol. 24, no. 20. 1900272. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.20.1900272.
11. Dose-ranging Study: Safety, Tolerability and Immunogenicity of INO-4500 in Healthy Volunteers in Ghana. ClinicalTrials.gov. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04093076>.
12. Fichet-Calvet E. Lassa Fever: A rodent-human interaction. In: Johnson N. (ed.). The role of animals in emerging viral diseases. Academic Press, 2014, pp. 89-123.
13. Flórez-Álvarez L., de Souza E.E., Botosso V.F., de Oliveira D.B.L., Ho P.L., Taborda C.P., Palmisano G., Capurro M.L., Pinho J.R.R., Ferreira H.L., Minoprio P., Arruda E., de Souza Ferreira L.C., Wrenger C., Durigon E.L. Hemorrhagic fever viruses: Pathogenesis, therapeutics, and emerging and re-emerging potential. *Front. Microbiol.*, 2022, Vol. 13, 1040093. doi.org/10.3389/fmicb.2022.1040093.
14. Frame J.D., Verbrugge G.P., Gill R.G., Pinneo L. The use of Lassa fever convalescent plasma in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1984, Vol. 78, no. 3, pp. 319-324.
15. Godakova S.A., Noskov A.N., Vinogradova I.D., Ugriumova G.A., Solovyev A.I., Esmagambetov I.B., Tukhvatulin A.I., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Shcheblyakov D.V., Gintsburg A.L. Camelid VHHs Fused to Human Fc Fragments Provide Long Term Protection Against Botulinum Neurotoxin A in Mice. *Toxins*, 2019, Vol. 11, no. 8, 464. doi: 10.3390/toxins11080464.
16. Hallam H.J., Hallam S., Rodriguez S.E., Barrett A.D.T., Beasley D.W.C., Chua A., Ksiazek T.G., Milligan G.N., Sathiyamoorthy V., Reece L.M. Baseline mapping of Lassa fever virology, epidemiology and vaccine research and development. *NPJ Vaccines*, 2018, Vol. 3, 11. doi: 10.1038/s41541-018-0049-5.
17. Jahrling P.B., Frame J.D., Rhoderick J.B., Monson M.H. Endemic Lassa fever in Liberia. IV. Selection of optimally effective plasma for treatment by passive immunization. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1985, Vol. 79, no. 3, pp. 380-384.
18. Kanegae Y., Makimura M., Saito I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn. J Med. Sci. Biol.*, 1994, Vol. 47, no. 3, pp. 157-166.
19. Klitting R., Mehta S.B., Oguzie J.U., Oluniyi P.E., Pauthner M.G., Siddle K.J., Andersen K.G., Happi C.T., Sabeti P.C. Lassa Fever: epidemiology, immunology, diagnostics, and therapeutics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2023, Vol. 440, pp. 23-65.
20. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10275, pp. 671-681.
21. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Morozova L.F., Smolyarchuk E.A., Kryukov E.V., Babira V.F., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*, 2020, Vol. 396, no. 10255, pp. 887-897.
22. Maruyama J., Mateer E.J., Manning J.T., Sattler R., Seregin A.V., Bukreyeva N., Jones F.R., Balint J.P., Gabitzsch E.S., Huang C., Paessler S. Adenoviral vector-based vaccine is fully protective against lethal Lassa fever challenge in Hartley guinea pigs. *Vaccine*, 2019, Vol. 37, no. 45, pp. 6824-6831.
23. Mehand M.S., Al-Shorbaji F., Millett P., Murgue B. The WHO R&D Blueprint: 2018 review of emerging infectious diseases requiring urgent research and development efforts. *Antivir. Res.*, 2018, Vol. 159, pp. 63-67.
24. Mire C.E., Cross R.W., Geisbert J.B., Borisevich V., Agans K.N., Deer D.J., Heinrich M.L., Rowland M.M., Goba A., Momoh M., Boisen M.L., Grant D.S., Fullah M., Khan S.H., Fenton K.A., Robinson J.E., Branco L.M., Garry R.F., Geisbert T.W. Human-monoclonal-antibody therapy protects nonhuman primates against advanced Lassa fever. *Nat. Med.*, 2017, Vol. 23, no. 10, pp. 1146-1149.

25. Safety, Tolerability and Immunogenicity of INO-4500 in Healthy Volunteers. ClinicalTrials.gov. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03805984>.
26. Tschismarov R., Van Damme P., Germain C., de Coster I., Mateo M., Reynard S., Journeaux A., Tomberger Y., Withanage K., Haslwanter D., Terler K., Schrauf S., Müllner M., Tauber E., Ramsauer K., Baize S. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-vectored Lassa fever vaccine: a randomised, placebo-controlled, first-in-human trial. *Lancet*, 2023, Vol. 401, no. 10384, pp. 1267-1276.
27. Whitt M.A. Generation of VSV pseudotypes using recombinant ΔG-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines. *J. Virol. Met.*, 2010, Vol. 169, no. 2, pp. 365-374.
28. WHO Target Product Profile for Lassa virus Vaccine. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/who-target-product-profile-for-lassa-virus-vaccine>.

Авторы:

Попова О. — младший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Зубкова О.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Ожаровская Т.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Зрелкин Д.И. — младший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Воронина Д.В. — младший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Голдовская П.П. — лаборант-исследователь лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Кан В.Ю. — лаборант-исследователь лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Должилова И.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории Государственной коллекции вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Authors:

Popova O., Junior Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Zubkova O.V., PhD, Leading Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Ozharovskaya O.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Zrelkin D.I., Junior Research Associate, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Voronina D.V., Junior Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Goldovskaya P.P., Laboratory Researcher, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Kan V.Yu., Laboratory Researcher, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Dolzhikova I.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of the State Virus Collection, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Гроусова Д.М. — научный сотрудник лаборатории Государственной коллекции вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Ковыршина А.В. — научный сотрудник лаборатории клеточной микробиологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Ермолова И.А. — лаборант-исследователь лаборатории Государственной коллекции вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Щебляков Д.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Логунов Д.Ю. — д.б.н., академик РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Гинцбург А.Л. — д.б.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Grousova D.M., Research Associate, Laboratory of the State Virus Collection, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Kovyrshina A.V., Research Associate, Laboratory of Cellular Microbiology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Ermolova I.A., Laboratory Researcher, Laboratory of the State Virus Collection, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Shcheblyakov D.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Logunov D. Yu., PhD, MD (Biology), Full Member, Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Research, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Gintsburg A.L., PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 09.04.2024
Отправлена на доработку 23.05.2024
Принята к печати 14.09.2024

Received 09.04.2024
Revision received 23.05.2024
Accepted 14.09.2024