

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-94-99

УДК 615.371:616.988

А.И. Терентьев¹, В.А. Жуков¹, Ар.А. Сергеев², С.Б. Пастушенко¹, С.В. Рогожкина¹, С.В. Борисевич¹,
В.А. Максимов¹, Ал.А. Сергеев², К.А. Титова², Д.О. Галахова²

ОПЫТ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ «РЕВАКС ВЗТ»

¹ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад, Российская Федерация; ²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Российская Федерация

Целью работы явилось получение таблетированной формы рекомбинантной вакцины «Ревакс ВЗТ» против гепатита В и патогенных для человека ортопоксвирусов для проведения клинических исследований. **Материалы и методы.** В качестве активного материала использовали рекомбинантный вирус вакцины, штамм b7.5S2-S, в ген тимидинкиназы которого встроен фрагмент ДНК вируса гепатита В. В работе использовали микробиологические, вирусологические, физические, физико-химические и биотехнологические методы исследований качества препарата и технологических процессов. **Результаты и обсуждение.** Результаты технологического контроля получения полуфабрикатов и готовой продукции вакцины «Ревакс ВЗТ» подтвердили возможность использования аттестованной аппаратно-технологической линии «ТЭОВак» для ее производства. Аналогичная технология может также использоваться при производстве других живых эмбриональных таблетированных оспенных вакцин. Для получения вакцинного препарата «Ревакс ВЗТ» со специфической активностью не менее $1,0 \cdot 10^7$ ООЕ/табл. необходим сухой вирусосодержащий материал с активностью не менее $2,0 \cdot 10^8$ ООЕ/г при сублимационном высушивании жидкого вирусосодержащего материала с активностью не менее $1,0 \cdot 10^8$ ООЕ/г и преимущественном использовании хорионаллантоисной оболочки куриных эмбрионов в качестве субстрата накопления вирусной биомассы.

Ключевые слова: рекомбинантный штамм вируса вакцины, гепатит В, патогенные для человека ортопоксвирусы, таблетированная оспенная вакцина, технология, аппаратно-технологическая линия.

Корреспондирующий автор: Терентьев Александр Иванович, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Для цитирования: Терентьев А.И., Жуков В.А., Сергеев Ар.А., Пастушенко С.Б., Рогожкина С.В., Борисевич С.В., Максимов В.А., Сергеев Ал.А., Титова К.А., Галахова Д.О. Опыт получения рекомбинантной таблетированной вакцины «Ревакс ВЗТ». *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 3:94–99. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-94-99

A.I. Terent'ev¹, V.A. Zhukov¹, Ar.A. Sergeev², S.B. Pastushenko¹, S.V. Rogozhkina¹, S.V. Borisevich¹,
V.A. Maksimov¹, Al.A. Sergeev², K.A. Titova², D.O. Galakhova²

Experience in the Design and Production of Recombinant Oral Vaccine «Revax VZT»

¹48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation;
²State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», Kol'tsovo, Russian Federation

Abstract. Objective of the work was the production of recombinant vaccine «RevaxVZT» in tablet dosage form against hepatitis B and pathogenic for humans orthopoxviruses for further clinical trials. **Materials and methods.** Recombinant strain b7.5S2-S of vaccinia virus carrying a DNA fragment of hepatitis B virus inserted into thymidinekinase gene was used as an active component of the vaccine. Microbiological, virological, physical, physical and chemical, and biotechnological methods were used for studying the quality of the drug and technological processes. **Results and discussion.** Results of technological control for semi-finished products and final products of the vaccine “Revax VZT” showed the possibility of using certified hardware-processing line of “TEOVac” for its manufacturing. Same technology can be potentially used with other live tableted embryo smallpox vaccines too. For the development of the vaccine “Revax VZT” with the specific activity of not less than $1.0 \cdot 10^7$ PFU/tablet, it is necessary to use a dry virus-containing material with activity not less than $2.0 \cdot 10^8$ PFU/g which is produced by freeze-drying of liquid virus-containing preparation with the activity of not less than $1.0 \cdot 10^8$ PFU/g, preferentially propagated from chorionic allantoic membranes of chicken embryos as a substrate for viral biomass accumulation.

Key words: recombinant strain of vaccinia virus, hepatitis B, orthopoxviruses pathogenic for humans, smallpox vaccine in tablets, technology, hardware-processing line.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Alexander I. Terent'ev, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Citation: Terent'ev A.I., Zhukov V.A., Sergeev Ar.A., Pastushenko S.B., Rogozhkina S.V., Borisevich S.V., Maksimov V.A., Sergeev Al.A., Titova K.A., Galakhova D.O. Experience in the Design and Production of Recombinant Oral Vaccine «Revax VZT». *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:94–99. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-94-99
Received 19.07.19. Revised 13.08.19. Accepted 23.09.19.

Разработка средств медицинской защиты от опасных и особо опасных инфекционных заболеваний, а также создание их производств представляет собой одно из приоритетных направлений био-

логической безопасности населения Российской Федерации [1].

Повсеместное распространение вируса гепатита В делает эту инфекцию значительной проблемой

для здравоохранения России и показывает недостаточную защищенность населения, особенно в эндемичных регионах, что требует отечественного недорогого и эффективного профилактического препарата и тактики его применения.

Другой немаловажной проблемой является иммунопрофилактика ортопоксвирусных инфекций. Однако в условиях отмены оспопрививания и постоянно снижающегося противооспенного популяционного иммунитета следует ожидать большого количества поствакцинальных осложнений при проведении такого рода мероприятий. Кроме того, использование парентеральных как оспенных, так и гепатитных вакцин существенно увеличивает риск заражения прививаемых [2].

Одним из способов оптимизации прививочной кампании, снижения частоты поствакцинальных осложнений и удешевления стоимости вакцинных препаратов является использование поливалентных рекомбинантных вакцин [3, 4]. Успехи в биотехнологии и генной инженерии позволили получать рекомбинантные вакцинные штаммы, в ДНК которых встроены гены протективных белков различных возбудителей. Иммунизация этими рекомбинантами приводит к формированию иммунитета как к вектору, так и к экспрессируемым чужеродным антигенам [5–7]. Одним из наиболее изученных является использование вируса осповакцины (далее по тексту – вируса вакцины) в качестве вектора для экспрессии протективных белков вируса гепатита В [8, 9].

В ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», сконструирован рекомбинантный штамм «Ревакс В» на основе вируса вакцины, штамм Л-ИВП, в ген которого встроены фрагмент ДНК вируса гепатита В [10]. В ходе исследований специалистами ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России выявлена контаминация «Ревакс В» исходным штаммом Л-ИВП. В дальнейшем штамм «Ревакс В» реклонирован с целью освобождения его от популяции родительского штамма Л-ИВП. В результате отбора нескольких клонов, не содержащих ген тимидинкиназы (ТК) вируса вакцины и экспрессирующих НВsAg, получен генетически однородный ТК-минус штамм. По результатам репродуктивной активности отобран клон 3 этого штамма (вакцинный штамм b7,5S2-S, условно получивший название «Ревакс В3»). Данные исследования подтверждены рестрикционным анализом, а также методами ИФА и ПЦР. На основе этого штамма разработана живая рекомбинантная вакцина для профилактики гепатита В и натуральной оспы, лиофилизат для накожного применения [11].

При конструировании экспериментальной таблетированной формы вакцины на основе штамма «Ревакс В3», адаптированного к куриным эмбрионам (КЭ) пассажами на хорионаллантоисной оболочке (ХАО), обоснована принципиальная возможность пероральной иммунизации против гепатита В и патогенных для человека ортопоксвирусов [12, 13].

Целью работы явилось получение таблетированной формы рекомбинантной вакцины «Ревакс В3Т» против гепатита В и патогенных для человека ортопоксвирусов для проведения клинических исследований.

Материалы и методы

Исследования проводили с использованием рекомбинантного вируса вакцины (штамм b7,5S2-S), в ген тимидинкиназы которого встроены фрагмент ДНК вируса гепатита В, кодирующий синтез белков НВsAg и pre-S2-Ag. В качестве основного продуцента биологического активного материала для производства использовали КЭ 12-суточного возраста (куры породы «Радонеж»).

Для определения чувствительности КЭ к вирусу вакцины параллельно с определением специфической активности испытуемого образца на той же партии КЭ проводили титрование отраслевого стандартного образца ОСО 42-28-113-07П, полученного из Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития РФ (паспорт серии № 130406).

Для оценки качества полупродуктов и готовой продукции использовали утвержденные нормативными документами вирусологические, микробиологические и физико-химические методы контроля.

Наработку препарата рекомбинантной таблетированной вакцины «Ревакс В3Т» проводили на лицензированной производственной базе ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России по технологии, основанной на получении таблетированной эмбриональной живой оспенной вакцины «ТЭОВак» и практически ей идентичной (промышленный регламент ПР 08534994-01-08) [14].

Результаты и обсуждение

Исследования в области пероральной иммунизации свидетельствуют о том, что введение различных штаммов вируса вакцины (Л-ИВП, Б-51 и др.) в дозе от $1,0 \cdot 10^6$ до $1,0 \cdot 10^7$ оспинообразующих единиц (ОЕ) приводит к формированию полноценного иммунного ответа у людей, а также у чувствительных к вирусу вакцины лабораторных животных [4]. Однако результаты изучения свойств рекомбинантных штаммов вируса вакцины, «ущербных» по ТК-минус гену, свидетельствуют о более низкой, по сравнению с ТК-плюс родительскими штаммами, реактогенности, нейровирулентности, и, как правило, более высокой дозе вируса, необходимой для индукции полноценного вакцинального процесса [15, 16]. Согласно этим данным, иммунизирующая доза для рекомбинантов вируса вакцины возрастает в среднем в 10–100 раз, в зависимости от методики вакцинации. Следовательно, для производства эффективной таблетированной вакцины необходимо получение биоматериала с повышенной концентрацией вируса.

Таблица 1 / Table 1

Результаты технологического контроля оценки качества жидкого вирусосодержащего материала
The results of technological control of liquid virus-containing material quality assessment

Наименование показателя, ед. измерения Name of indicator, measuring units	Требования НД Normative requirements	Результаты анализа* партий Results of analysis* of batches		
		№ 10	№ 11	№ 12
Инфицирующая доза, ООЕ в 0,2 мл Infectious Dose, PFU in 0.2 ml	$1,0 \cdot 10^4 - 1,0 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^4$
Специфическая активность жидкого вирусосодержащего материала, ООЕ/г Specific activity of liquid virus-containing material, PFU/g	$\geq 3,0 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^8$
Микробиологическая чистота: Microbiological purity:				
- содержание аэробных непатогенных бактерий, КОЕ/г the content of aerobic non-pathogenic bacteria, CFU/g	≤ 1000	810	850	575
- содержание дрожжевых и плесневых грибов (суммарно), КОЕ/г the content of yeast and mould content (total), CFU/g	≤ 100	<10	<10	<10
- содержание <i>Enterobacteriaceae: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus</i> the content of <i>Enterobacteriaceae: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus</i>	Отсутствие Absence	Отсутствие Absence	Отсутствие Absence	Отсутствие Absence

Примечание: *средние данные трех измерений.

Note: *average of three measurements.

Технологическая схема получения вакцины «Ревакс ВЗТ» состояла из следующих стадий: получение жидкого вирусосодержащего материала, получение сухого вирусосодержащего материала, приготовление таблеточной массы, приготовление готового препарата (таблеток жевательных), упаковка и маркировка готовой продукции.

Для достижения сравнительных величин показателя специфической активности таблеток по количеству оспинообразующих единиц при вскрытии кондиционных инфицированных КЭ в асептических условиях использовали всю ХАО (партия 10), ХАО и плодики КЭ (партия 11) и часть ХАО (зону с максимальной интенсивностью воспаления и площадью поражения – партия 12). Анализ результатов технологического контроля оценки качества жидкого вирусосодержащего материала, представленных в табл. 1, свидетельствует о том, что при одинаковой заражающей дозе штамма «Ревакс ВЗ» активность гомогената ХАО на порядок выше, по сравнению с гомогенатом ХАО и плодиков (партия 11), что может указывать на избирательность репродукции рекомбинантного вируса вакцины в тканях и органах КЭ в пользу ХАО.

По полученным данным, для производства вакцины «Ревакс ВЗТ» целесообразно проводить отбор только ХАО, учитывая факт более сниженной репродуктивной способности и иммуногенности у рекомбинантного штамма, чем у родительского. Поэтому наработка серий вакцины с активностью более $3,0 \cdot 10^6$ ООЕ/табл., при активности жидкого вирусосодержащего материала не выше $1,5 \cdot 10^7$ ООЕ/г и даже максимальном содержании сухого вирусосодержащего материала в таблеточной массе (30 %), потребует формирования таблеток массой более 1 г и диаметром 15 мм и выше. Это не отвечает требованиям нормативной документации (диаметр таблеток до 12 мм).

С учетом степени инаktivации вируса при сублимационном высушивании жидкого биопрепарата за счет изменения фазового состояния материала, активность сухого вирусосодержащего материала $1,0 \cdot 10^8$ ООЕ/г и более, достигается при активности жидкого вирусосодержащего материала не менее $1,0 \cdot 10^8$ ООЕ/г. Последнее возможно лишь при условии выделения из зараженных КЭ только ХАО, желательнее даже тех ее участков, где наблюдается максимальная интенсивность скопления оспин. Показатели качества партий 10 и 12 жидкого вирусосодержащего материала не выходят за пределы установленных нормативной документацией требований.

Сухой вирусосодержащий материал получали на сублимационной сушильной установке модели FD5518 фирмы «Skadi® Europe» (Нидерланды). Анализ результатов технологического контроля оценки качества полученных партий сухого вирусосодержащего материала, приведенных в табл. 2, иллюстрирует то, что специфическая активность партий сухого вирусосодержащего материала варьировала в пределах $(3,2 \pm 0,1) \cdot 10^8$ ООЕ/г, что определяло возможность их использования по данному показателю для приготовления серий таблеток с требуемой активностью.

Согласно прописи, в состав таблетированного препарата «Ревакс ВЗТ» входят сухой вирусосодержащий материал до 30 % и ингредиенты наполнителя от 70 %.

Расчет приготовления таблеточной массы для наработки серий вакцины с требуемой активностью и параметров таблеток при прессовании производили согласно регламенту ПР 08534994-01-08. Приготовление таблеточной массы, прессование таблеток, их обеспыливание проводили на оборудовании, входящем в состав аппаратно-технологической линии.

Результаты операционного контроля процесса

Таблица 2 / Table 2

Результаты технологического контроля оценки качества сухого вирусосодержащего материала
The results of the technological control of dry virus-containing material quality assessment

Наименование показателя, ед. измерения Name of indicator, measuring units	Требования НД Normative requirements	Результаты анализа* партий Results of analysis* of batches	
		№ 10	№ 12
Выход материала после сушки (по массе), процент The yield after drying (by weight), percent	≥20,0	24,5	23,9
Потеря в массе при высушивании, процент Mass loss on drying, percent	≤3,0	2,8	2,6
Специфическая активность сухого вирусосодержащего материала, ООЕ/г The specific activity of the dry virus-containing material, PFU/g	≥3,0·10 ⁷	3,1·10 ⁸	3,3·10 ⁸
Выход материала после сушки (по суммарной активности), процент The yield after drying (total activity), percent	≥20,0	27,4	28,1

Примечание: *средние данные трех измерений.
 Note: *average of three measurements.

приготовления таблеток и анализа проб (выборки), представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что качество наработанных серий препарата по всем показателям соответствует требованиям норматив-

ной документации.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что технологический контроль за процессом получения полуфабрикатов и го-

Таблица 3 / Table 3

Показатели качества серий таблеток вакцины «Ревакс ВЗТ»
Quality indicators of series of “Revax VZT” vaccine tablets

Наименование показателя, ед. измерения Name of indicator, measuring units	Требования НД Normative requirements	Результаты анализа* серии Results of analysis* of series	
		№ 10	№ 12
Средняя масса, г Average weight, g	0,1000–1,0000	0,6366	0,3972
Диаметр (D _т), мм Diameter (D _t), Mm	6–12	12	10
Отклонение от средней массы, % Deviation from the average weight,% - среднее (для таблеток массой 0,3 г и более) average (for tablets weighing 0.3 g or more) - макс. превышение max. excess	±5,0	2,6 Max ⁺ = 5,0	3,8 Max ⁺ = 4,7
Потеря в массе при высушивании, % Mass loss on drying, %	≥3,0	1,8	2,0
Прочность на истирание, % Abrasion resistance, %	≥97,0	98,7	99,8
Распадаемость, мин Disintegration, min	30,0	25,0	22,0
Микробиологическая чистота: Microbiological purity: - содержание аэробных непатогенных бактерий, КОЕ/табл. the content of aerobic non-pathogenic bacteria, CFU/tablet - содержание дрожжевых и плесневых грибов (суммарно), КОЕ/табл. the content of yeast and mould content (total), CFU/tablet - содержание <i>Enterobacteriaceae: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus</i> the content of <i>Enterobacteriaceae: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus</i>	≥1000 ≥100 Отсутствие Absence	566 < 10 Отсутствие Absence	200 <10 Отсутствие Absence
Подлинность (содержание на ХАО КЭ однотипных оспин диаметром от 0,5 до 3,0 мм), % Authenticity (presence of one type pock, 0,5–3,0 in diameter), %	100	100	100
Специфическая активность выборки, ООЕ/табл. Specific activity of the panel, PFU/tablet	1,0·10 ⁶ – 4,0·10 ⁷	2,7·10 ⁷	2,4·10 ⁷

Примечание: *средние данные трех измерений.
 Note: *average of three measurements.

товой продукции «Ревакс ВЗТ» продемонстрировал возможность использования имеющейся аттестованной аппаратно-технологической линии производства «ТЭОВак» для наработки живых эмбриональных таблетированных оспенных вакцин по аналогичной технологии.

Сниженная репродуктивная способность рекомбинантного вируса вакцины (штамм «Ревакс ВЗ»), культивируемого в куриных эмбрионах обуславливает целесообразность преимущественного использования хорионаллантоисной оболочки в качестве субстрата накопления вирусной биомассы даже при получении вакцины с более низкой активностью.

Для получения препарата «Ревакс ВЗТ» со специфической активностью не менее $1,0 \cdot 10^7$ ООЕ/табл. необходим сухой вирусодержащий материал с активностью не менее $2,0 \cdot 10^8$ ООЕ/г при сублимационном высушивании жидкого вирусодержащего материала с активностью не менее $1,0 \cdot 10^8$ ООЕ/г.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Основы государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу: указ Президента Российской Федерации от 11.03.2019 г. № 97 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72092478/> (дата обращения 11.03.2019).
2. Buonaguro F.M., Tornesello M.L., Buonaguro L. The XIX century smallpox prevention in Naples and the risk of transmission of human blood related pathogens. *J. Transl. Med.* 2015; 13:33. DOI: 10.1186/s12967-015-0400-9.
3. Okoli A., Okeke M.I., Tryland M., Moens U. CRISPR/Cas9 – advancing orthopoxvirus genome editing for vaccine and vector development. *Viruses.* 2018; 10(1). pii: E50. DOI: 10.3390/v10010050.
4. Подкуйко В.Н., Воробьев А.А., Краснянский В.П., Патрикеев Г.Т., Михайлов В.В., Дорохина Т.В., Махлай А.А., Дыканов Г.А. Пероральная иммунизация – способ повышения безопасности рекомбинантного вектора (вируса вакцины). *Вестник Российской академии медицинских наук.* 1993; 2:39–45.
5. Pavot V., Sebastian S., Turner A.V., Matthews J., Gilbert S.C. Generation and production of modified vaccinia virus Ankara (MVA) as a vaccine vector. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1581:97–119. DOI: 10.1007/978-1-4939-6869-5_6.
6. Omura N., Yoshikawa T., Fujii H., Shibamura M., Inagaki T., Kato H., Egawa K., Harada S., Yamada S., Takeyama H., Saijo M. A novel system for constructing a recombinant highly-attenuated vaccinia virus strain (LC16m8) expressing foreign genes and its application for the generation of LC16m8-based vaccines against Herpes Simplex virus 2. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2018; 71(3):229–33. DOI: 10.7883/yoken.JIID.2017.458.
7. Li Y., Chen S., Fang J., Zhu Y., Bai B., Li W., Yin X., Wang J., Liu X., Han J., Li X., Sun L., Jin N. Construction of an attenuated Tian Tan vaccinia virus strain by deletion of TA35R and TJ2R genes. *Virus Res.* 2018; 256:192–200. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.06.017.
8. Cavanaugh J.S., Awi D., Mendy M., Hill A.V., Whittle H., McConkey S.J. Partially randomized, non-blinded trial of DNA and MVA therapeutic vaccines based on hepatitis B virus surface protein for chronic HBV infection. *PLoS One.* 2011; 6(2):e14626. DOI: 10.1371/journal.pone.0014626.
9. Backes S., Jäger C., Dembek C.J., Kosinska A.D., Bauer T., Stephan A.S., Dislers A., Mutwiri G., Busch D.H., Babiuk L.A., Gasteiger G., Protzer U. Protein-prime/modified vaccinia virus Ankara vector-boost vaccination overcomes tolerance in high-antigenic HBV-transgenic mice. *Vaccine.* 2016; 34(7):923–32. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.12.060.
10. Муратов П.Ю., Беляев А.С., Дмитриев И.П., Нетесов С.В., Рукавишников М.Ю. Живая рекомбинантная вакцина для профилактики гепатита В и натуральной оспы для кожного применения и способ ее получения. Патент РФ на изобретение № 2073524(13) от 13.05.1999 г.
11. Павлова Л.И., Горбунов М.А., Борисова В.Н., Красильников И.В., Носкова А.В., Лыцарь Б.Н., Скворцов С.В.,

Беляева Е.А., Яковлева И.М., Коровин Ю.П., Бельченко А.В., Титов И.А., Буданов М.В. Отечественная рекомбинантная вакцина против гепатита В (результаты контролируемых испытаний). *Вопросы вирусологии.* 1996; 41(4):170–2.

12. Ведерников Б.Ф., Генералов В.М., Евтин Н.К., Кочнева Г.В., Михеев М.В., Нетесов С.В., Петриченко В.А., Пьянков О.В., Сандахчиев Л.С., Сафатов А.С., Сергеев А.А., Сергеев А.Н., Шишкин А.В., Шишкина Л.Н. Таблетированная живая рекомбинантная бивакцина «Ревакс ВКТ» против натуральной оспы и гепатита В и способ ее получения. Патент РФ № 2242246 от 15.02.2002 г.

13. Плясунов И.В., Сергеев А.А., Сергеев Ал.А., Петриченко В.А., Шишкина Л.Н., Генералов В.В., Сафатов А.С., Сандахчиев Л.С., Удут В.В., Мельников С.А., Подкуйко В.Н. Клинические исследования рекомбинантной бивакцины против оспы и гепатита В для орального применения в условиях двукратной вакцинации. *Вопросы вирусологии.* 2006; 51(2):31–5.

14. Бондарев В.П., Терентьев А.И., Мельников С.А., Бондарева Т.А. Внедрение таблетированной оспенной вакцины ТЭОВак в серийное производство для обеспечения биологической безопасности населения Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2010; 2:66–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-2(104)-66-68.

15. Чернос В.И., Челяпов Н.В., Антонова Т.П., Ралихина Л.Е., Унанов С.С., Альтштейн А.Д., Захарова Л.Г., Фодор И.И., Бендукидзе К.А., Комаров Ф.И., Бельшев Б.П., Дмитриев А.В., Анджапаридзе О.Г. Проверка безопасности, прививаемости, реактогенности и антигенных свойств живой рекомбинантной оспенно-гепатитной В-вакцины в опыте на добровольцах. *Вопросы вирусологии.* 1990; 35(2):132–5.

16. Graham B.S., Belshe R.B., Clements M.L., Dolin R., Corey L., Wright P.F., Gorse G.J., Midthun K., Keefer M.C., Roberts N.J., Schwartz D.H., Agosti J.M., Fernie B.F., Stablein D.M., Montefiori D.C., Lambert J.S., Hu S.-L., Esterlitz J.R., Lawrence D.N., Koff W.C. Vaccination of vaccinia-naïve adults with human immunodeficiency virus type 1 gp160 recombinant vaccinia virus in a blinded, controlled, randomized clinical trial. *J. Infect. Diseases.* 1992; 166(2):244–52. DOI: 10.1093/infdis/166.2.244.

References

1. Fundamentals of the state policy of the Russian Federation in the field of ensuring chemical and biological safety for the period up to 2025 and beyond: Decree of the President of the Russian Federation of March 11, 2019 No. 97. (Cited 11 Mar 2019). [Internet]. Available from: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72092478/>.
2. Buonaguro F.M., Tornesello M.L., Buonaguro L. The XIX century smallpox prevention in Naples and the risk of transmission of human blood related pathogens. *J. Transl. Med.* 2015; 13:33. DOI: 10.1186/s12967-015-0400-9.
3. Okoli A., Okeke M.I., Tryland M., Moens U. CRISPR/Cas9 – advancing orthopoxvirus genome editing for vaccine and vector development. *Viruses.* 2018; 10(1). pii: E50. DOI: 10.3390/v10010050.
4. Podkuyko V.N., Vorobyov A.A., Krasnyansky V.P., Patrikeev G.T., Mikhailov V.V., Dorokhina T.V., Makhlay A.A., Dykanov G.A. Oral immunization is a way to increase the safety of a recombinant vector (vaccine virus). [*Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*]. 1993; 2:39–45.
5. Pavot V., Sebastian S., Turner A.V., Matthews J., Gilbert S.C. Generation and production of modified vaccinia virus Ankara (MVA) as a vaccine vector. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1581:97–119. DOI: 10.1007/978-1-4939-6869-5_6.
6. Omura N., Yoshikawa T., Fujii H., Shibamura M., Inagaki T., Kato H., Egawa K., Harada S., Yamada S., Takeyama H., Saijo M. A novel system for constructing a recombinant highly-attenuated vaccinia virus strain (LC16m8) expressing foreign genes and its application for the generation of LC16m8-based vaccines against Herpes Simplex virus 2. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2018; 71(3):229–33. DOI: 10.7883/yoken.JIID.2017.458.
7. Li Y., Chen S., Fang J., Zhu Y., Bai B., Li W., Yin X., Wang J., Liu X., Han J., Li X., Sun L., Jin N. Construction of an attenuated Tian Tan vaccinia virus strain by deletion of TA35R and TJ2R genes. *Virus Res.* 2018; 256:192–200. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.06.017.
8. Cavanaugh J.S., Awi D., Mendy M., Hill A.V., Whittle H., McConkey S.J. Partially randomized, non-blinded trial of DNA and MVA therapeutic vaccines based on hepatitis B virus surface protein for chronic HBV infection. *PLoS One.* 2011; 6(2):e14626. DOI: 10.1371/journal.pone.0014626.
9. Backes S., Jäger C., Dembek C.J., Kosinska A.D., Bauer T., Stephan A.S., Dislers A., Mutwiri G., Busch D.H., Babiuk L.A., Gasteiger G., Protzer U. Protein-prime/modified vaccinia virus Ankara vector-boost vaccination overcomes tolerance in high-antigenic HBV-transgenic mice. *Vaccine.* 2016; 34(7):923–32. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.12.060.
10. Muratov P.Yu., Belyaev A.S., Dmitriev I.P., Netesov S.V., Rukavishnikov M.Yu. Live recombinant vaccine for the preven-

tion of hepatitis B and smallpox for cutaneous use and method for its preparation. RF patent for the invention No. 2073524(13) dated 13.05.1999.

11. Pavlova L.I., Gorbunov M.A., Borisova V.N., Krasilnikov I.V., Noskova A.V., Lytsar B.N., Skvortsov S.V., Belyakova E.A., Yakovleva I. M., Korovin Yu.P., Belchenko A.V., Titov I.A., Budanov M.V. Domestic recombinant hepatitis B vaccine (results of controlled trials). *Voprosy virusologii [Problems of virology]*. 1996; 41(4):170–2.

12. Vedernikov B.F., Generalov V.M., Evtin N.K., Kochneva G.V., Mikheev M.V., Netesov S.V., Petrishchenko V.A., Pyankov O.V., Sandakhchiev L. S., Safatov A.S., Sergeev A.A., Sergeev A.N., Shishkin A.V., Shishkina L.N. Tableted live recombinant bivalent vaccine “Revax VKT” against smallpox and hepatitis B and the method for its preparation. RF patent No. 2242246 of 15.02.2002.

13. Plyasunov I.V., Sergeev A.A., Sergeev A.I., Petrishchenko V.A., Shishkina L.N., Generalov V.V., Safatov A.S., Sandakhchiev L.S., Udut V. V., Melnikov S.A., Podkuyko V.N. Clinical studies of recombinant bi-vaccine against smallpox and hepatitis B for oral administration in conditions of double vaccination. *Voprosy virusologii [Problems of virology]*. 2006; 51(2):31–5.

14. Bondarev V.P., Terentyev A.I., Melnikov S.A., Bondareva T.A. The introduction of TEOVac smallpox vaccine into serial production to ensure the biological safety of the population of the Russian Federation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2010; 2:66–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-2(104)-66-68.

15. Chernos V.I., Chelyapov N.V., Antonova T.P., Ralikhina L.E., Unanov S.S., Altstein A.D., Zakharova L.G., Fodor I.I., Bendukidze K. A., Komarov F.I., Belyshev B.P., Dmitriev A.V., Andzhaparidze O.G. Testing the safety, vaccination, reactogenicity and antigenic properties of a live recombinant smallpox and hepatitis B vaccine in a volunteer experiment. *Voprosy virusologii [Problems of virology]*. 1990; 35(2):132–5.

16. Graham B.S., Belshe R.B., Clements M.L., Dolin R., Corey L., Wright P.F., Gorse G.J., Midthun K., Keefer M.C., Roberts N.J.,

Schwartz D.H., Agosti J.M., Fernie B.F., Stablein D.M., Montefiori D.C., Lambert J.S., Hu S.-L., Esterlitz J.R., Lawrence D.N., Koff W.C. Vaccination of vaccinia-naïve adults with human immunodeficiency virus type 1 gp160 recombinant vaccinia virus in a blinded, controlled, randomized clinical trial. *J. Infect. Diseases*. 1992; 166(2):244–52. DOI: 10.1093/infdis/166.2.244.

Authors:

Terent'ev A.I., Zhukov V.A., Pastushenko S.B., Rogozhkina S.V., Borisevich S.V., Maksimov V.A. 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Sergiev Possad, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru.

Sergeev A.A., Sergeev A.I., Titova K.A., Galakhova D.O. State Scientific Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Об авторах:

Терентьев А.И., Жуков В.А., Пастушенко С.Б., Рогожкина С.В., Борисевич С.В., Максимов В.А. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 141306, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11. E-mail: 48cnii@mil.ru.

Сергеев А.А., Сергеев А.И., Титова К.А., Галахова Д.О. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Поступила 19.07.19.

Отправлена на доработку 13.08.19.

Принята к публ. 23.09.19.