

И.В.Плясунов, А.А.Сергеев, Л.Н.Шишкина, Ал.А.Сергеев, К.А.Титова,  
А.П.Агафонов, Н.К.Евтин, Е.А.Ставский, И.Г.Дроздов

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ОСПЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ОСПОВАКЦИНЫ В7,5S2-S В УСЛОВИЯХ ДВУКРАТНОЙ ОРАЛЬНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

ФГУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

У ранее привитых (в детском возрасте) против оспы добровольцев при проведении оральной иммунизации вакциной «Ревакс-ВТ» сначала малой дозой и через 7, 14, 30, 90 и 180 дней большой иногда наблюдалась слабая реактогенность после первой вакцинации малой дозой, тогда как ревакцинация большой дозой не давала каких-либо клинических проявлений. При этом наиболее эффективным был метод двукратной иммунизации этим препаратом с интервалом в 1–2 недели, что приводило к формированию у 90–100 % добровольцев защитного уровня вируснейтрализующих антител к вирусу осповакцины (ВОВ) через месяц после вакцинации, в то время как через 6 мес. этот показатель снизился до 70 %. Ни в одном случае при двукратной иммунизации добровольцев вакциной не зарегистрировано наличие рекомбинантного ВОВ в исследуемых от них пробах крови, слюны, мочи.

*Ключевые слова:* рекомбинантный вирус осповакцины, натуральная оспа, гепатит В, таблетированная вакцина, оральное применение, клинические испытания, двукратная вакцинация, клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет, реактогенность, безопасность.

Все вакцины против натуральной оспы (НО), которые разрабатываются на сегодняшний день за рубежом, в основном нацелены на парентеральное применение (скарификационное, внутрикожное) [6, 14, 15 и др.], которое имеет ряд существенных недостатков: низкая производительность при массовой вакцинации людей, риск попутного инфицирования в процессе вакцинации другими вирусными агентами (ВИЧ, вирус Т-клеточного лейкоза, вирус гепатита С и др.), выделение вируса осповакцины (ВОВ) в окружающую среду (неконтролируемая передача его непривитым людям). В связи с этим на основе ранее полученного в ГНЦ ВБ «Вектор» рекомбинантного штамма b7,5S2-S ВОВ [2] в настоящее время нами разрабатывается эмбриональная живая вакцина против НО орального применения («Ревакс-ВТ»), которая будет лишена этих недостатков за счет создания ее таблетированной формы [8]. Увеличение безопасности такой вакцины для организма по сравнению с накожной оспенной вакциной связано с использованием в ее основе штамма b7,5S2-S ВОВ, полученного путем выключения одного из генов вирулентности (ген-тимидинкиназы) штамма ЛИВП ВОВ за счет встройки фрагмента ДНК вируса гепатита В (ГВ), кодирующего синтез белков HBs и preS2 [13].

В проведенных нами ранее исследованиях [9, 10] в рамках клинических испытаний препарата «Ревакс-ВТ» была отмечена значительная его реактогенность при однократном применении в больших дозах ( $3,9 \cdot 10^7$  оспообразующих единиц – ООЕ) на добровольцах, ранее невакцинированных и вакцинированных против НО (в 50 и 40 % случаев соответственно). Тогда как волонтеры, ранее вакцинированные против оспы и привитые малой дозой вакцины «Ревакс-ВТ» ( $7,6 \cdot 10^6$ ), имели лишь слабую местную и общую реакции [9]. Учитывая это обстоятельство и то, что в малой дозе данный препарат оказался сла-

боиммуногенным, нами была предпринята попытка двукратной вакцинации вакциной «Ревакс-ВТ» (малой дозой и через 7, 14, 30, 90 и 180 дней большой) добровольцев, ранее (в детстве) привитых против оспы, чему и посвящена данная работа.

### Материалы и методы

*Вакцина.* Использовали две серии вакцины «Ревакс-ВТ» с иммунизирующими дозами  $7,6 \cdot 10^6$  и  $3,9 \cdot 10^7$  ООЕ, приготовленные в соответствии с ранее описанным методом [8].

*Пробы.* От каждого добровольца ежедневно в течение 14 сут производили отбор слюны и мочи и один раз в неделю в течение 4 недель отбирали пробы плазмы и сыворотки для вирусологических и серологических исследований.

*Вирусологические исследования.* Полученные от привитых добровольцев пробы (моча, слюна, плазма) анализировали на наличие в них рекомбинантного ВОВ. Для предупреждения бактериального и грибкового пророста в пробы слюны и мочи добавляли нистатин (20 ед./мл), стрептомицина сульфат (100 мкг/мл) и бензилпенициллина натриевую соль (100 ед./мл) и проводили центрифугирование при 2000 оборотах в течение 10 мин. Полученный таким образом супернатант титровали на культуре клеток 4647 по методу бляшек [4] с той лишь разницей, что инфицированные клетки инкубировали в течение 3 сут и в качестве красителя использовали 0,001 % раствор генциана фиолетового, приготовленного на фиксирующем растворе.

*Серологические исследования.* Сыворотки крови людей исследовали с целью определения уровня антител к вирусу ВОВ (штамм ЛИВП), HBs Ag и HBcAg и выявления в них HBs Ag. Титры антител к ВОВ оценивали в реакции нейтрализации (РН)

на культуре клеток 4647 по методу бляшек по общепринятой методике, используя при этом разведения исследуемых сывороток 1:5, 1:25, 1:125 [15]. При этом за титр сыворотки принимали максимальное ее разведение, которое вызывало снижение количества бляшкообразующих единиц (БОЕ) более чем в два раза по сравнению с контролем. За рабочее разведение вируса принимали такое его разведение, которое при подсчете БОЕ давало образование от 40 до 60 бляшек. Общепринято, что защитные титры антител к ВОВ, определяемые в РН, в сыворотке крови человека составляют  $\geq 1:25$ .

Выявление антител к НВsAg и НВсAg и наличия НВsAg в сыворотках крови людей проводили с помощью сертифицированных в МЗ России иммуноферментных тест-систем «Векто НВs Ag-антитела-стрип», «Векто НВс Ag-антитела-стрип» и «Рекоматгеп В-стрип» соответственно (производство ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирская область, п. Кольцово). Чувствительность последней тест-системы по ОСО ГИСК – 0,2 нг/мл. Общепринято, что защитные концентрации антител к НВsAg, определяемые методом иммуноферментного анализа, в сыворотках крови человека составляют  $\geq 10$  мМЕ/мл.

*Исследования клеточного иммунитета.* Оценку реакции эффекторов гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ-эффекторов) на специфические антигены (Аг) к ВОВ и ГВ проводили согласно описанной методике с помощью определения изменения интенсивности миграции лейкоцитов *in vitro* [7]. Предварительно была исследована активность ГЗТ-эффекторов у здоровых доноров и у вакцинированных ВОВ и НВsAg. На основании полученных данных была выбрана доза, ингибирующая миграцию лейкоцитов, для каждого антигена (АгВОВ и НВsAg) и рассчитаны соответствующие параметры нормы для индекса ингибирования миграции (ИИМ) лейкоцитов крови. Оценку активности специфических ГЗТ-эффекторов *in vitro* у каждого человека, вакцинированного вакциной, проводили по ИИМ, характеризующему активность ГЗТ-эффекторов, по формуле:  $ИИМ = Б/А$ , где А – количество клеток в контрольных лунках, Б – количество клеток в опытных лунках с ингибирующей дозой соответствующего Аг. Данный показатель для каждого вакцинированного сравнивали с соответствующими параметрами нормы и со своим исходным показателем. Таким образом, чем выше активность ГЗТ-эффекторов, тем ниже ИИМ для соответствующего Аг после вакцинации вакциной. В случае выраженного специфического клеточного иммунного ответа на НВsAg или АгВОВ ИИМ должен быть ниже параметров нормы и своего исходного показателя. Пробы цельной крови для постановки этой реакции использовали сразу после ее взятия.

*Общее и лабораторное обследование добровольцев.* Оценку общего состояния здоровья и лабораторных показателей проб от добровольцев до и после их иммунизации вакциной проводили общепринятыми методами в условиях клиники, сертифицированной

для проведения соответствующих клинических исследований (ежедневный мониторинг клинического состояния испытуемых с ежедневной двукратной термометрией, ежедневными осмотрами узкими специалистами и еженедельным биохимическим и клиническим анализом периферической крови и мочи).

Исследования проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законами РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 Т2288, Федеральные законы N 30-ФЗ от 02.03.98, N 214-ФЗ от 20.12.99). Опрос респондентов и взятие крови проводили после получения письменного информированного согласия. Порядок проведения исследований одобрен этическим комитетом ИРВ 00001360.

*Статистическая обработка результатов.* Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами [1].

## Результаты и обсуждение

После получения из МЗ России разрешения на проведение клинических испытаний вакцины «Ревакс-ВТ» на первом этапе при двукратном применении проводили подбор добровольцев, ранее вакцинированных против оспы.

Критериями отбора претендентов в добровольцы являлись: наличие оспенных вакцинальных знаков при визуальном осмотре и анамнестические данные (возраст претендентов – старше 26 лет, отсутствие заболеваний вирусными гепатитами и вакцинации против ГВ).

На основании предварительного медицинского обследования претендентов в добровольцы комиссия в составе: руководитель исследования, врач-терапевт, врач-стоматолог, врач-кардиолог, ЛОР-врач, врач-невропатолог проводила отбор добровольцев, у которых не выявлено соматических и других заболеваний, являющихся противопоказанием к проведению вакцинации.

По результатам проведенных серологических исследований на наличие маркеров ГВ и антител к ВОВ были сформированы 4 группы добровольцев (А, Б, В, Г) для проведения клинического испытания вакцины. При этом отмечено, что титры противоспепных антител, выявленные в сыворотках крови ранее (в детстве) вакцинированных против оспы добровольцев на начало проведения исследований, были достаточно низкими ( $\leq 1:5$ ), не достигающие защитной величины (1:25).

В группу А вошли 10 волонтеров в возрасте 34–40 лет. Эти добровольцы были иммунизированы малой дозой вакцины ( $7,6 \cdot 10^6$  ООЕ) и через 1 неделю – большой ( $3,9 \cdot 10^7$  ООЕ).

В группу Б вошли 10 волонтеров в возрасте 31–38 лет. Эти добровольцы были иммунизированы малой дозой вакцины ( $7,6 \cdot 10^6$  ООЕ) и через 2 недели – большой ( $3,9 \cdot 10^7$  ООЕ).

В группу В вошли 11 волонтеров в возрасте 28–34 года. Эти добровольцы были иммунизированы малой дозой вакцины ( $7,6 \cdot 10^6$  ООЕ) и через 1 месяц – большой ( $3,9 \cdot 10^7$  ООЕ).

В группу Г вошли 4 волонтера в возрасте 32 – 35 лет. Они были иммунизированы малой дозой вакцины ( $7,6 \cdot 10^6$  ООЕ) и через 3–6 месяцев – большой ( $3,9 \cdot 10^7$  ООЕ).

Обобщенные результаты проведенных исследований представлены в табл. 1. Исследования реактогенности вакцины у двукратно вакцинированных волонтеров показали наличие только слабых местных и общих реакций у волонтеров после введения препарата лишь в малой дозе. Ревакцинация же большой дозой вакцины во всех исследованных группах не вызывала какой-либо реактогенности. Отсутствие реактогенности при оральной ревакцинации противооспенными вакцинами отмечали ранее и другие авторы [3].

Выраженный гуморальный иммунный ответ к ВОВ был получен у волонтеров из групп А и Б через 1 месяц после двукратной иммунизации вакциной с интервалом между введениями 7 и 14 дней, и при этом уровень сероконверсии составил 100 и 90 % соответственно. В то время как двукратная иммунизация вакциной с интервалом 1 или 3–6 месяцев вызвала формирование иммунной прослойки к ВОВ лишь у 55 и 50 % привитых в группах В и Г соответственно. Факт формирования низкого уровня иммунной прослойки к ВОВ среди двукратно вакцинированных препаратом добровольцев этих двух групп может

быть, скорее всего, обусловлен использованием относительно невысокой дозы вакцины при повторном введении (всего лишь в пять раз большая, чем при первичной вакцинации). Вероятно, такая доза вакцины была практически полностью нейтрализована сформировавшимся базовым иммунным ответом, полученным (к моменту повторной вакцинации) через 1 или 3–6 месяцев после первичной вакцинации малой дозой препарата. В то же время потенциальной возможности получать таблетки с существенно более высоким содержанием рекомбинантного ВОВ для ревакцинации практически не существует, если не вводить в технологию приготовления этого препарата дополнительных трудоемких и дорогостоящих процедур по концентрированию рекомбинантного ВОВ. В случае же двукратного введения препарата с интервалом 1–2 недели полного формирования базового иммунного ответа после первичной иммунизации малой дозой вакцины не успело произойти к моменту повторной вакцинации большой дозой препарата. Поэтому, вероятно, действующее начало вакцины «Ревакс-ВТ» при повторном введении существенно в меньшей степени (чем в группах В и Г) было нейтрализовано антителами, сформировавшимися после первичной вакцинации, что и привело к более активной стимуляции гуморального звена иммунитета у добровольцев групп А и Б на ВОВ. Факт повышения титров противооспенных антител при ревакцинации у людей, иммунизированных аналогичной вакциной только накожного применения, также был показан и

Таблица 1

Обобщенные результаты клинических испытаний вакцины «Ревакс-ВТ» при двукратной оральной вакцинации малой дозой ( $7,6 \cdot 10^6$  ООЕ) и затем большой ( $3,9 \cdot 10^7$  ООЕ) добровольцев (группы А, Б, В и Г), в детском возрасте привитых против оспы

Оцениваемый показатель		Группа добровольцев / Количество испытуемых				
		А / 10	Б / 10	В / 11	Г / 4	
		Иммунизирующая доза, ООЕ				
		7,6·10 <sup>6</sup> и через 1 неделю 3,9·10 <sup>7</sup>	7,6·10 <sup>6</sup> и через 2 недели 3,9·10 <sup>7</sup>	7,6·10 <sup>6</sup> и через 1 месяц 3,9·10 <sup>7</sup>	7,6·10 <sup>6</sup> и через 3–6 месяцев 3,9·10 <sup>7</sup>	
Введение малой дозы (первичная иммунизация)	Местные реакции в максимальном варианте <sup>1</sup> :	число	2	2	1	1
	выраженность	Слабая <sup>2</sup>	Слабая <sup>2</sup>	Слабая <sup>2</sup>	Слабая <sup>2</sup>	
	Общие реакции в максимальном варианте <sup>1</sup> :	число	2	2	2	0
	выраженность	Слабая <sup>3</sup>	Слабая <sup>3</sup>	Слабая <sup>3</sup>	Слабая <sup>3</sup>	Слабая <sup>3</sup>
Введение большой дозы (вторичная иммунизация)	Местные реакции в максимальном варианте:	число	0	0	0	0
	выраженность	-	-	-	-	
	Общие реакции в максимальном варианте:	число	0	0	0	0
	выраженность	-	-	-	-	
Наличие вируса в пробах в течение 14 сут наблюдения после вакцинации:	слюна	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
	плазма	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
	моча	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Процент добровольцев, имеющих значимый гуморальный иммунный ответ через месяц после вакцинации на вирус:	вакцины	100	90,0	55,6	50	
	гепатита В	0	204	0	254	
Процент добровольцев с выраженными показателями клеточного иммунитета через месяц после вакцинации к вирусу:	вакцины	20	10	9	0	
	гепатита В	10	0	0	0	

Примечания: <sup>1</sup> – общие и местные реакции имели место, как правило, в период с 7-х по 13-е сутки после вакцинации; <sup>2</sup> – легкая гиперемия зева, увеличение подчелюстных лимфоузлов до 0,8 см; <sup>3</sup> – повышение температуры тела до 37,2 °С; <sup>4</sup> – зарегистрировано появление антител, но их концентрация была минимальной защитной (10 мМЕ/мл).

другими исследователями [12].

В табл. 2 приведены данные по динамике титров антител в ВОВ через 1, 3, 6 и 9 месяцев после двукратной оральной вакцинации малой и большой дозами препарата «Ревакс-ВТ» с интервалом между введениями 1 и 2 недели у добровольцев, ранее (в детском возрасте) привитых против оспы. Видно, что через 1 и 3 месяца после вакцинации происходит увеличение титра вируснейтрализующих антител к ВОВ у более 90 % добровольцев. Через 6 месяцев иммунная прослойка составляет 70 % среди привитых волонтеров из групп А и Б, тогда как при однократном введении вакцины происходит существенное уменьшение титров антител к ВОВ уже через 6 месяцев после вакцинации, и иммунная прослойка среди привитых волонтеров уменьшается до 20 % [9].

Значимого же уровня клеточного иммунного ответа на ВОВ при двукратном введении препарата не зарегистрировано, как и при однократной вакцинации [9], что, возможно, связано с низкой чувствительностью использованного нами метода оценки клеточного иммунитета.

Учитывая то обстоятельство, что разрабатываемая вакцина «Ревакс-ВТ» была приготовлена на основе штамма b7,5S2-S ВОВ, полученного путем выключения одного из генов вирулентности (гентамидинкиназы) штамма ЛИВП ВОВ за счет встройки фрагмента ДНК вируса ГВ, кодирующего синтез белков НВs и preS2, было проведено также изучение формирования гуморального иммунного ответа на НВs Ag (так же, как и клеточного) у двукратно вакцинированных волонтеров. При этом уровень специфических сывороточных антител во всех случаях был низким: иммунная прослойка среди привитых добровольцев

была существенно ниже 70 %. Другие исследователи [12] также отмечали отсутствие антител к НВs Ag после двукратного введения аналогичной рекомбинантной вакцины, но накожного применения.

Все образцы плазмы, слюны, мочи от двукратно вакцинированных добровольцев проверены на содержание рекомбинантного ВОВ. При этом ни в одном случае не зарегистрировано наличие ВОВ в исследуемых пробах, что свидетельствует о крайне низкой вероятности выделения вируса в окружающую среду при течении вакцинального процесса и соответственно исключает возможность неконтролируемой передачи инфекции, вызванной оральной двукратной иммунизацией препаратом.

Ревакцинацию (повторную вакцинацию) для профилактики натуральной оспы начали применять еще в 19 веке [14]. В первую очередь, это было связано с тем, что прививка против оспы обеспечивает надежную защиту в среднем на протяжении 3 лет, в дальнейшем протективный эффект постепенно ослабевает [6]. Так заболеваемость оспой среди привитых 1–3 года назад составила 0,3 %, 3–5 лет – 0,9 %, 5–10 лет – 8,3 % и более 10 лет – 10,7 % [5]. Сроки ревакцинаций и их количество варьировали в зависимости от задач, стоящих перед медиками и исследователями. В СССР перед отменой оспопрививания предусматривалась двукратная ревакцинация в возрасте 8 и 16 лет [6]. При ревакцинации вируснейтрализующие противооспенные антитела выявляются раньше (на 7-е сутки) и в более высоких титрах по сравнению с первичной вакцинацией (на 10–14-е сутки). Это обстоятельство позволяет использовать ревакцинацию как средство экстренной профилактики в первые дни после контакта с оспенным больным [6]. Полученные

Таблица 2

Данные по динамике титров вируснейтрализующих антител к вирусу осповакцины через 1, 3, 6 и 9 месяцев после двукратной оральной вакцинации малой и большой дозами препарата «Ревакс-ВТ» с интервалом между введениями 1–2 недели у добровольцев, в детском возрасте привитых против оспы

Номер добровольца (группа)	Титр противооспенных вируснейтрализующих антител через различные сутки наблюдения после вакцинации:				
	0	30	90	180	270
1 (Б)	1:5	1:125	1:125	1:125	Нд
2 (Б)	1:5	1:5	1:25	1:5	Нд
3 (Б)	Сн	1:125	1:25	1:125	Нд
4 (Б)	Сн	>1:125	1:125	>1:125	Нд
5 (Б)	1:5	1:25	1:25	1:25	Нд
6 (А)	1:5	1:25	1:25	1:125	Нд
7 (А)	Сн	1:25	1:25	>1:125	Нд
8 (А)	Сн	1:25	1:25	1:125	Нд
9 (А)	1:5	1:125	>1:125	1:5	Нд
10 (А)	Сн	1:125	>1:125	Сн	Нд
11 (Б)	Сн	1:125	Нд	Нд	>1:125
12 (А)	Сн	1:125	Нд	Нд	1:125
13 (А)	Сн	1:125	Нд	Нд	1:125
14 (Б)	Сн	1:125	Нд	Нд	1:125

Примечания: Приведены данные по добровольцам, имеющим через месяц после вакцинации протективные значения титров вируснейтрализующих антител к ВОВ, и которые наблюдались 6–9 месяцев; Нд – нет данных; Сн – серонегативный результат в реакции нейтрализации, в которой были использованы разведения исследуемых сывороток 1:5, 1:25, 1:125.

нами результаты также позволяют сделать заключение о возможности и перспективности двукратного введения вакцины «Ревакс-ВТ» для вакцинопрофилактики оспы у людей, ранее иммунизированных против ВО. Для этого предлагается оральная вакцинация людей сначала малой дозой вакцины и через 7–14 дней большой. Это позволит при отсутствии реактогенности получить уровень сероконверсии к ВОВ до 100 % у привитых. Результаты, полученные нами при клинических испытаниях вакцины в условиях двукратной оральной вакцинации добровольцев, в детском возрасте иммунизированных против оспы, свидетельствуют о перспективности применения этого подхода также для волонтеров, ранее не иммунизированных против оспы [11]. При этом для ослабления реактогенности предполагается уменьшить в несколько раз первую (малую) дозу вакцины.

Таким образом, у ранее привитых (в детском возрасте) против оспы добровольцев при проведении двукратной оральной иммунизации вакциной «Ревакс-ВТ» сначала малой дозой ( $7,6 \cdot 10^6$  ООЕ) и через 7, 14, 30, 90 и 180 дней большой ( $3,9 \cdot 10^7$  ООЕ) иногда наблюдалась лишь слабая реактогенность после первой вакцинации малой дозой, тогда как ревакцинация большой дозой не давала каких-либо клинических проявлений. При этом наиболее эффективным был метод двукратной иммунизации этим препаратом с интервалом в 1–2 недели, что приводило к формированию у 90–100 % добровольцев защитного уровня вируснейтрализующих антител к ВОВ через месяц после вакцинации, в то время как через 6 месяцев этот показатель снизился до 70 %. Уровень же клеточного иммунитета к ВОВ, оцененный с помощью реакции ГЗТ-эффекторов был низким (до 20 %). Двукратная иммунизация оральной вакциной добровольцев в условиях отдаленной вакцинации не приводила к формированию значимого уровня гуморального и клеточного иммунного ответа на маркер ГВ (иммунная прослойка среди вакцинированных была существенно менее 70 %). Ни в одном случае при двукратной иммунизации добровольцев вакциной не зарегистрировано наличие рекомбинантного ВОВ в исследуемых от них пробах крови, слюны, мочи.

Работа выполнена по Государственному контракту № 104-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962. 256 с.
2. Беляев А.С., Путинцева Н.И., Дмитриев И.П., Аммосов А.Д., Черный Н.Б., Миронова Е.Б. и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК р7,5 S2-S, содержащая рге-S2-S ген вируса гепатита В, способ ее конструирования и штамм рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующий рге-S2-S ген вируса гепатита В. Патент РФ № 1575576 от 20.06.88.
3. Воробьев А.А., Подкуйко В.Н., Михайлов В.В., Махлай А.А. Непарантеральные методы иммунизации. ЖМЭИ. 1996; 5:117–21.
4. Гловер Д., редактор. Клонирование ДНК. Методы. М.: 1988. 540 с.

5. Ладный И.Д. Ликвидация оспы и предупреждение ее возврата. М.: 1985. 222 с.
6. Маренникова С.С., Шелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. М.: КМК Scientific Press Ltd; 1998. 386 с.
7. Методические рекомендации. Методы оценки клеточных эффекторных функций гиперчувствительности замедленного типа. М.: 1990. 11 с.
8. Муратов П.Ю., Сандахчиев Л.С., Дмитриев И.П., Беляев А.С., Бектемиров Т.А., Перекрест В.В. и др. Живая рекомбинантная вакцина гепатита В на основе вируса осповакцины для перорального применения и способ ее получения. Патент 2076735 РФ от 10.04.97.
9. Плясунов И.В., Сергеев А.Н., Сергеев А.А., Петрищенко В.А., Шишкина Л.Н., Генералов В.В. и др. Клинические исследования рекомбинантной бивакцины против оспы и гепатита В в условиях двукратной оральной вакцинации. Вопр. вирусол. 2006; 2:31–5.
10. Сергеев А.А., Сергеев А.Н., Петрищенко В.А., Шишкина Л.Н., Кочнева Г.В., Жуков В.А. и др. Изучение реактогенности, безопасности и иммуногенности рекомбинантной бивакцины против оспы и гепатита В на людях. Вопр. вирусол. 2004; 5:22–6.
11. Сергеев А.Н., Плясунов И.В., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Генералов В.М., Сергеев А.А. и др. Набор таблетированной живой рекомбинантной оральной бивакцины против натуральной оспы и гепатита В и способ вакцинации с использованием указанного набора. Патент РФ №2302259 от 10.07.07.
12. Чернос Н.В., Челябин Т.П., Антонова Т.П., Рахилина Л.Е., Уланов С.С., Альтиштейн А.Д. и др. Проверка безопасности, прививаемости, реактогенности и антигенных свойств живой рекомбинантной оспенно-гепатитной В-вакцины в опыте на добровольцах. Вопр. вирусол. 1990; 2:133–5.
13. Buller R.M. L., Smith G.L., Gemer K., Notkins A.L., Moss B. Decreased virulens of recombinant vaccine virus expression vectors is associated with a thymidinekinase negative phenotype. Nature. 1985; 317(6040):813–5.
14. Fenner F., Henderson D. A., Arita I., Jezek Z., and Ladnyi I. D. Smallpox and its eradication. Geneva: World Health Organization; 1988. 1460 p.
15. Leparc-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M-H, Fuchs F., Crance J-M. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. J. Clin. Virol. 2005; 32:47–52.

I.V.Plyasunov, A.A.Sergeev, L.N.Shishkina, A.I.A.Sergeev, K.A.Titova, A.P.Agaonov, N.K.Evtin, E.A.Stavskiy, I.G.Drozdov

#### Clinical Studies of Vaccine Against Smallpox on the Base of Recombinant Vaccinia b7,5S2-S Strain under the Conditions of Double Oral Vaccination

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo

Volunteers who had been vaccinated against smallpox in their childhood were orally immunized with “Revax-BT” vaccine – initially with a small dose, then (in 7, 14, 30, 90 and 180 days) with a large one. Slight reactogenicity was observed after the first vaccination whereas revaccination induced no clinical manifestation. Double immunization with this preparation with 1–2 weeks interval proved to be the most effective method: the protective level of virus-neutralizing antibodies to vaccinia virus (VV) was formed in 90–100 % volunteers in a month after vaccination, and 6 months later this index decreased up to 70 %. The recombinant VV was not registered in the samples of blood, saliva and urine taken from the volunteers after double immunization.

**Key words:** recombinant virus of vaccinia, smallpox, hepatitis B, tablet vaccine, oral use, clinical trial, double vaccination, cellular immunity, humoral immunity, reactogenicity, safety.

#### Об авторах:

Плясунов И.В., Сергеев А.А., Шишкина Л.Н., Сергеев А.А., Титова К.А., Агафонов А.П., Евтин Н.К., Ставский Е.А., Дроздов И.Г. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

#### Authors:

Plyasunov I.V., Sergeev A.A., Shishkina L.N., Sergeev A.A., Titova K.A., Agaonov A.P., Evtin N.K., Stavskiy E.A., Drozdov I.G. State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”. 630559, Novosibirsk Region, Koltsovo. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 12.11.09.