

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ Ag85, TB10 И FliC

Еремеев В.В.¹, Духовлинов И.В.², Орлов А.И.², Маленко А.Ф.¹,
Федорова Е.А.², Балазовский М.Б.³, Гергерт В.Я.¹

¹ ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ЗАО «Фарма ВАМ», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. К сегодняшнему дню назрела необходимость разработки вакцин нового поколения как наиболее эффективных иммунопрофилактических средств борьбы с туберкулезом. Наибольшую поддержку в мире находит стратегия гетерологичной вакцинации, в рамках которой для праймирования иммунной системы предлагается использовать вакцину БЦЖ или ее улучшенные аналоги, либо аттенуированные штаммы *M. tuberculosis*, а для последующих бустерных вакцинаций – субъединичные или векторные вакцины, содержащие протективные белки микобактерий. Целью настоящего исследования была оценка протективных свойств новой вакцины на основе рекомбинантных бактериальных белков Ag85, TB10 и FliC. Мы использовали модель аэрозольного заражения вакцинированных и интактных лабораторных мышей линии C57BL/6 вирулентным лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv и определяли высеваемость бактерий из органов и продолжительность жизни животных после заражения. В результате были выявлены три варианта вакцины, обладающие в нашей модели сравнимой с БЦЖ протективной активностью. Наиболее перспективный вариант будет использован для последующих доклинических испытаний.

Ключевые слова: туберкулез, вакцина, иммунитет, рекомбинантные антигены, протекция, микобактерия

STUDIES ON PROTECTIVE EFFECTS OF A VACCINE, BASED ON RECOMBINANT Ag85, TB10 AND FliC PROTEINS

Yeremeev V.V.^a, Duhovlinov I.V.^b, Orlov A.I.^b, Malenko A.F.^a,
Fedorova E.A.^b, Balazovsky M.B.^c, Gergert V.Ya.^a

^a Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

^b Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c Pharma VAM Private Company, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. At present time, there is an obvious need for a new generation of vaccines as the most effective preventive approach, in order to stop spreading of tuberculosis infection. So far, the most popular strategy is

Адрес для переписки:

Еремеев Владимир Витальевич
ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский
институт туберкулеза»
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2.
Тел.: 8 (499) 785-90-72.
E-mail: yeremeev56@mail.ru

Address for correspondence:

Yeremeev Vladimir V.
Central Tuberculosis Research Institute
107564, Russian Federation, Moscow, Yauzskaya All, 2.
Phone: 7 (499) 785-90-72.
E-mail: yeremeev56@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Еремеев, И.В. Духовлинов, А.И. Орлов,
А.Ф. Маленко, Е.А. Федорова, М.Б. Балазовский,
В.Я. Гергерт «Исследование протективных свойств
вакцинного препарата на основе рекомбинантных белков
Ag85, TB10 и FliC» // Медицинская иммунология, 2017.
Т. 19, № 2. С. 197-202.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-197-202

© Еремеев В.В. и соавт., 2017

For citation:

V.V. Yeremeev, I.V. Duhovlinov, A.I. Orlov, A.F. Malenko,
E.A. Fedorova, M.B. Balazovsky, V.Ya. Gergert "Studies on
protective effects of a vaccine, based on recombinant Ag85, TB10
and FliC proteins", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 197-202.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-197-202

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-197-202

aimed at heterological vaccination. The idea is to use BCG, or improved BCG, or attenuated *M. tuberculosis* for primary vaccination. For the further booster vaccination one may apply thw s.c. subunit or vector vaccines, containing protective mycobacterial proteins. The aim of our investigation was to evaluate protective effects of a new vaccine based on recombinant bacterial proteins Ag85, TB10 and FliC. We used a model with aerosol *M. tuberculosis* H37Rv infection, and compared lung and spleen CFU counts and life-span of vaccinated *versus* non-vaccinated C57BL/6 mice. As a result, we revealed three vaccine variants with comparable protective capacity against BCG using our experimental model. The most promising variant is suggested for testing in preclinical trials.

Keywords: tuberculosis, vaccine, immunity, recombinant antigens, protection, mycobacterium

Введение

По данным информационного бюллетеня ВОЗ (№ 104, март 2016), туберкулез является второй по значимости причиной смерти от какого-либо одного инфекционного агента, уступая лишь ВИЧ/СПИД. В 2013 году в мире заболели туберкулезом 9 миллионов человек и 1,5 миллиона человек умерли от этой болезни (среди них около 550 000 и 80 000 ВИЧ-негативных детей соответственно). Туберкулез также является одной из основных причин смерти людей с ВИЧ (примерно в четверти всех случаев).

Кроме того, по оценкам 2013 года, у 480 000 людей в мире развился туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ). Возникновение и все более широкое распространение лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий является в настоящий период времени серьезной проблемой. Вызываемые ими формы туберкулеза, устойчивые к широкому ряду препаратов, получили значительное распространение во многих странах Азиатского и Африканского континентов. При этом лекарственно-устойчивые штаммы не только сильно затрудняют лечение туберкулеза, в некоторых случаях делая его невозможным (широкая лекарственная устойчивость – ШЛУ), но и существенно удорожают таковое [1]. Число случаев заболевания такой формой туберкулеза растет во всем мире. В связи с этим возникает необходимость разработки и создания принципиально новых, безопасных иммунопрофилактических и терапевтических средств, что является приоритетной задачей. По инициативе ВОЗ с 2006 г. объявлена глобальная программа борьбы с туберкулезом «The Global Plan to Stop TB», согласно которой одно из ведущих мест занимает разработка вакцин нового поколения против туберкулеза [7].

В настоящее время для предупреждения туберкулеза широко используется вакцинирование новорожденных детей живой вакциной БЦЖ, сохранившей свои антигенные и иммуногенные свойства [5]. Опыт применения вакцины БЦЖ показал ее высокую эффективность у детей и слабый защитный эффект или полное его отсутствие при предупреждении легочных форм туберкулеза

у взрослых [6, 2]. Различия в развитии «вакцинового процесса» могут зависеть от генетических особенностей макроорганизма, контролируемых процессы формирования и особенности иммуногенеза, силу иммунного ответа на антигены микобактерий, продолжительность протекции, которая может продолжаться от 1 до 4–6 лет [3, 8]. I. M. Orme [6] указывает на неспособность вакцины БЦЖ стимулировать выработку долгоживущих «центральных» Т-клеток памяти.

Следует отметить, что БЦЖ, подобно другим живым вакцинам, способна вызывать побочные эффекты. Осложнения при вакцинации БЦЖ наблюдаются, в частности, у детей, инфицированных ВИЧ еще до рождения. Введение живых штаммов микобактерий представляет серьезную опасность генерализации БЦЖ-инфекции при иммунодефицитных состояниях, все чаще регистрируемых в детской патологии, что явилось основанием для инструкции МЗ РФ об отводе от вакцинации БЦЖ до возраста 18 месяцев новорожденных от инфицированных ВИЧ матерей (Методические указания 3.3.1.1095-02, 2002). Нередко отмечается воспаление подмышечных лимфоузлов со стороны введения вакцины [2].

К сегодняшнему дню назрела необходимость разработки вакцин нового поколения как наиболее эффективных иммунопрофилактических средств борьбы с туберкулезом. Наибольшую поддержку в мире находит стратегия гетерологичной вакцинации, в рамках которой для праймирования иммунной системы предлагается использовать вакцину БЦЖ или ее улучшенные аналоги, либо аттенуированные штаммы *M. tuberculosis*, а для последующих бустерных вакцинаций – субъединичные или векторные вакцины, содержащие протективные белки микобактерий [4].

В связи с вышеизложенным нами была поставлена задача оценить протективные свойства новой вакцины на модели аэрозольного заражения лабораторных мышей вирулентным лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv по результатам определения высеваемости бактерий из органов и продолжительности жизни животных после заражения.

Материалы и методы

В исследовании был использован предоставленный фирмой ООО «Фарма ВАМ» вакцинный препарат на основе рекомбинантных бактериальных белков Ag85, TB10 и FliC, конъюгированных с 200 мкл эмульсии гидроксида алюминия и находящихся в различных сочетаниях в виде фармацевтических композиций (номера – 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7), в том числе с добавлением дополнительного адьюванта (секрет фирмы). Каждый препарат представляет собой различные кандидатные фармацевтические композиции указанных белков, как в виде фьюженнов (химер), так и отдельно.

Композиция представляет собой сочетание вариантов химерного белка на основе Ag85B-TB10.4-FliC и плазмидной ДНК, кодирующей антиген Ag85A *Mycobacterium tuberculosis*. Химерный белок Ag85B-TB10.4-FliC получали с использованием штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21, трансформированного векторной плазмидой pet28a-Ag85B-TB10.4-FliC. Плазмидную ДНК получали с использованием штамма *Escherichia coli* DH10/B, трансформированного векторной плазмидой pEXag85A.

Химерный белок представляет собой последовательно соединенные с помощью шарнирного лейцинового мостика иммуногенные участки белков Ag85B и TB10.4. Шарнирный мостик и конформационная свобода для фолдинга целевых иммуногенных белков рассчитана с помощью метода I-Tasser. Участок белка FliC, также включенный в состав химерного белка, является структурным компонентом бактериальной флагеллы *Salmonella typhimurium*. Белок FliC выполняет функцию иммуногенного адьюванта, активирующего врожденный иммунный ответ через взаимодействие с рецепторами TLR5, и стимулирует созревание макрофагов, дендритных клеток. Плазмида pEXag85A представляет собой эукариотический экспрессионный вектор, где белок находится под контролем цитомегаловирусного промотора с энхансером. В состав вектора введены с помощью нуклеотидного синтеза дополнительные CpG мотивы, представляющие собой специальный профиль (комбинация А, В и С типов), для активации врожденного иммунитета и естественных киллеров.

Эксперименты проводили на мышах линии C57BL/6JCit (B6), содержащихся в виварии ФГБНУ «ЦНИИТ» в условиях неограниченного доступа к воде и пище. Параметры содержания мышей и проводимых экспериментов соответствовали нормам, установленным в приказе № 755 МЗ РФ. Были использованы самки мышей B6, достигшие возраста 2-3 мес. к началу эксперимента.

Группы по 15 мышей (7 групп животных, соответственно, каждой композиции) линии B6 вакцинировали внутримышечно два раза с двухнедельными интервалами 10 мкг белка, конъюгированного с 200 мкл эмульсии гидроксида алюминия.

Мышам контрольной группы вводили 200 мкл эмульсии гидроксида алюминия (отрицательный контроль). Положительный контроль – мыши, иммунизированные 10e5 КОЕ живой вакцины БЦЖ (штамм Russia).

Через 4 недели после последней вакцинации проводили в/в заражение 10e5 КОЕ вирулентного лабораторного штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Через 4 недели после заражения у 5 мышей из каждой группы после умерщвления цервикальной дислокацией забирали селезенку и легкие. Полученные органы тщательно растирали в стеклянных гомогенизаторах и получали серийные разведения в стерильном PBS и высевали на агар Дюбо. Растущие колонии подсчитывали визуально под бинокулярной лупой через 3 недели после высева на твердый агар.

Оставшиеся 10 мышей каждой группы использовали для определения среднего срока выживания после заражения.

Результаты и обсуждение

Как видно на рисунке 1, вакцины № 3, 6 и 7 обладают выраженным протективным эффектом, поскольку содержание микобактерий в селезенках и легких у данных вакцинированных групп мышей к четвертой неделе после заражения снижено на полтора-два порядка по сравнению с невакцинированным контролем. Эти показатели практически не отличаются от таковых в группе вакцинированных БЦЖ мышей. В то же время вакцины № 1, 2, 4 и 5 оказались неспособны существенно повлиять на содержание микобактерий в органах инфицированных животных.

Аналогичным образом данные по выживанию вакцинированных мышей после заражения *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (рис. 2А, Б и табл. 1 – для наглядности кривые выживаемости распределены в два рисунка) также указывают на высокую эффективность вакцинных препаратов № 3, 6 и 7. Средний срок выживаемости животных в этих группах (136, 138,5 и 138,1 дней соответственно) в цифровом значении оказался даже выше, чем в группе вакцинированных БЦЖ мышей (табл. 1). Однако следует подчеркнуть, что различия эти не подтверждаются статистическим анализом. По результатам выживаемости мышей вакцины № 1, 2 и 4 также обладали некоторым и статистически достоверным протективным эффектом по сравнению с контролем, но жизнь

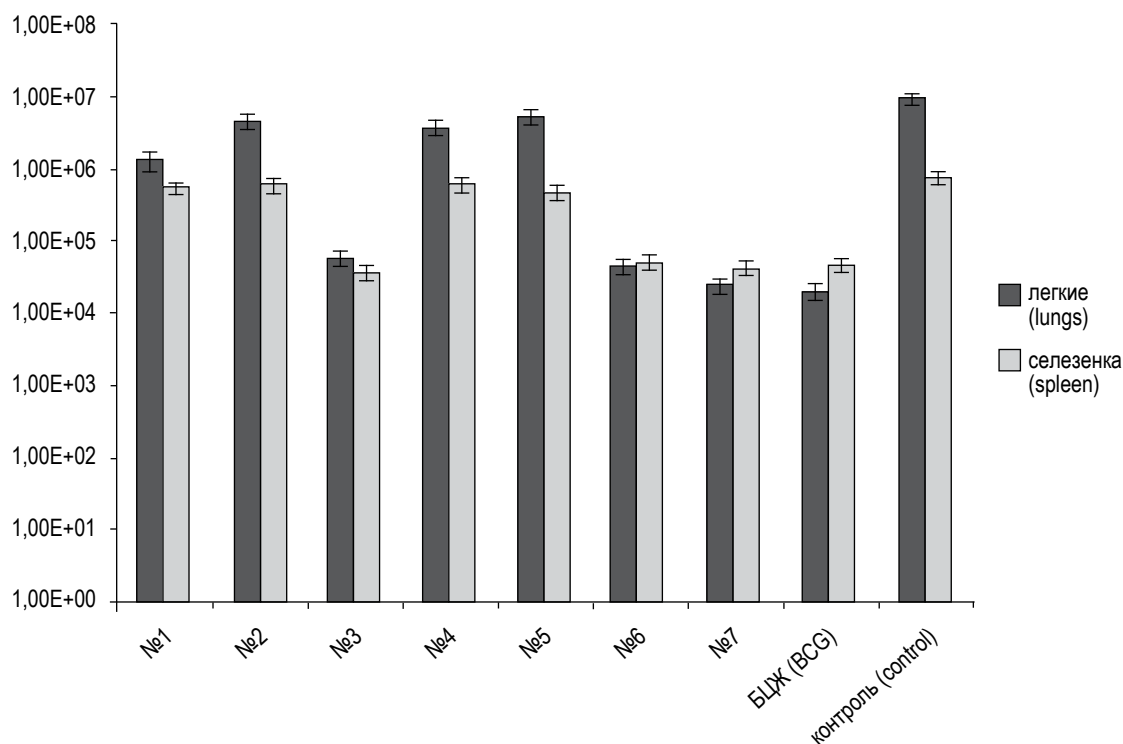


Рисунок 1. Высеваемость микобактерий туберкулеза из селезенки и легких у вакцинированных различными вариантами вакцинных препаратов мышей В6 через 4 недели после заражения

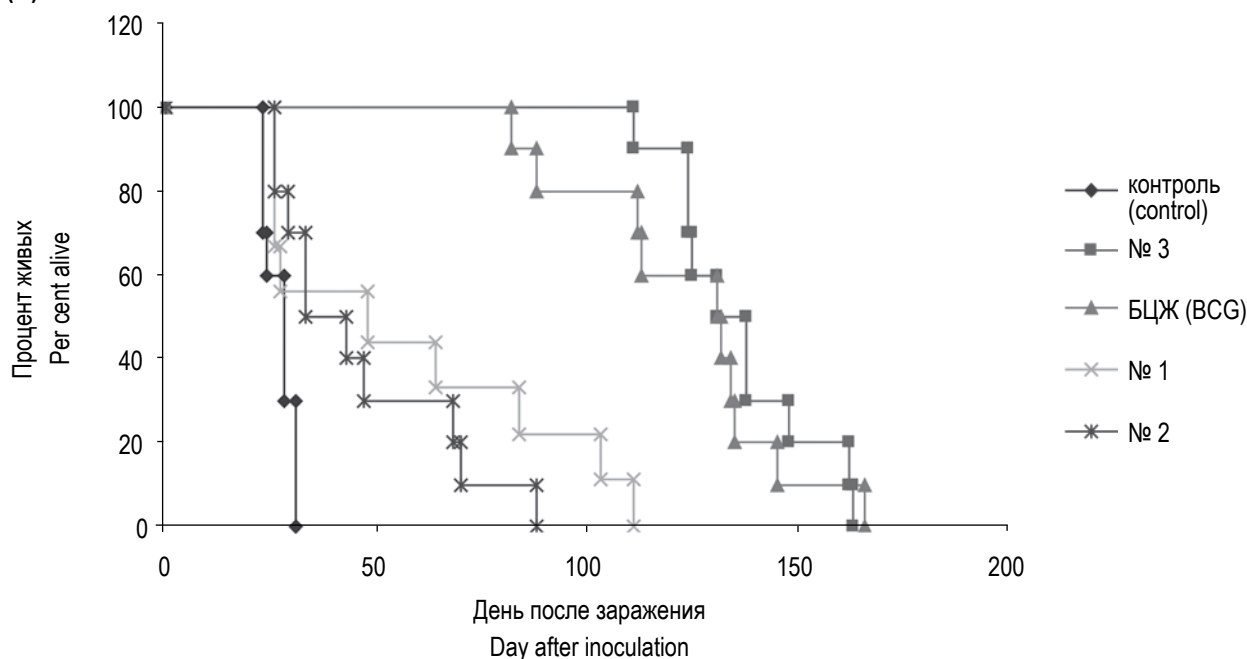
Figure 1. Isolation rates for *M. tuberculosis* from spleen and lungs of B6 mice immunized with different vaccine preparations following 4 weeks after MBT infection

ТАБЛИЦА 1. СРЕДНИЙ СРОК ВЫЖИВАЕМОСТИ ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУЛЕНТНЫМИ МИКОБАКТЕРИЯМИ МЫШЕЙ, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ВАКЦИНИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ВАКЦИННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ В СРАВНЕНИИ С ВАКЦИНОЙ БЦЖ

TABLE 1. MEAN SURVIVAL TERMS FOR MICE INFECTED BY VIRULENT MYCOBACTERIA AFTER PRE-VACCINATION WITH DIFFERENT VACCINAL PREPARATIONS, AS COMPARED WITH BCG VACCINE

Экспериментальная группа Experimental group	ССЖ (сут.) Mean survival term, days	m m value
№ 1	57,2	11,9
№ 2	46,3	7,2
№ 3	136	5,7
№ 4	54,3	8,5
№ 5	34,9	6,0
№ 6	138,5	8,1
№ 7	138,1	8,5
БЦЖ BCG	123,8	7,7
Контроль Control	27	1,1

А (А)



Б (В)

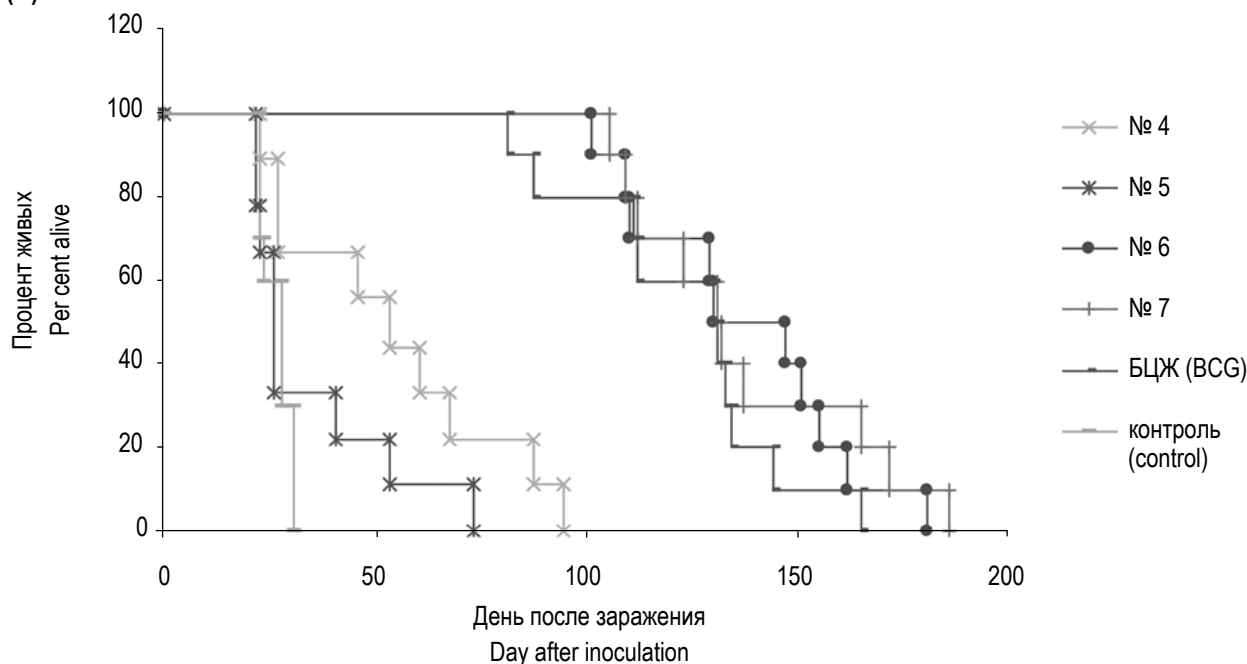


Рисунок 2. Динамика гибели зараженных вирулентными микобактериями мышей, предварительно вакцинированных различными вакцинными препаратами в сравнении с вакциной БЦЖ

Figure 2. Survival dynamics of mice infected with virulent mycobacteria, following pre-immunization with different vaccine preparations, as compared with BCG vaccine

животных пролонгировалась на более короткие сроки, чем после вакцинации БЦЖ. Вариант вакцины № 5 оказался неспособным пролонгировать жизнь зараженных вирулентной культурой микобактерий мышей, поскольку средний срок их жизни статистически не отличался от такового в контрольной группе.

Таким образом, полученные результаты внушают определенный оптимизм, открывая возможности для дальнейшего совершенствования нового вакцинного препарата, основываясь на наиболее перспективных вариантах № 3, 6 и 7. Очевидные направления дальнейших исследований включают: 1) титрование

дозы новой вакцины – возможно, что увеличение вакцинирующей дозы способно повысить протективный эффект; 2) определение иммуногенности новой вакцины и длительности иммунного ответа после однократной иммунизации; 3) определение длительности протек-

тивного эффекта; 4) использование новой вакцины в качестве буст-вакцины в комбинации с БЦЖ, имея в виду (в перспективе) разработку схемы вакцинации, снимающей «провальные» возрастные периоды БЦЖ в защите от туберкулеза детей и подростков.

Список литературы / References

1. Diel R., Nienhaus A., Lampenius N., Rüscher-Gerdes S., Richter E. Cost of multi drug resistance tuberculosis in Germany. *Respir. Med.*, 2014, Vol. 108, no. 11, pp. 1677-1687.
2. Haile M., Källénus G. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 200, Vol. 18, no. 3, pp. 211-215.
3. Källénus G., Pawlowski A., Brandtzaeg P., Svenson S. Should a new tuberculosis vaccine be administered intranasally? *Tuberculosis (Edinb)*, 2007, Vol. 87, no. 4, pp. 257-266.
4. Kaufmann S.H. Tuberculosis vaccines: Time to think about the next generation. *Semin. Immunol.*, 2013, Vol. 25, no. 2, pp. 172-181.
5. Liu J., Tran V., Leung A.S., Alexander D.C., Zhu B. BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Hum. Vaccin.*, 2009, Vol. 5, pp. 70-78.
6. Orme I.M. The Achilles heel of BCG. *Tuberculosis (Edinburgh)*, 2010, Vol. 90, no. 6, pp. 329-332.
7. Raviglione M.C., Uplekar M.W. WHO's new Stop TB Strategy. *Lancet*, 2006, Vol. 367, pp. 952-955.
8. Sepulveda R.L., Heiba I.M., King A., Gonzalez B., Elston R.C., Sorensen R.U. Evaluation of tuberculin reactivity in BCG-immunized siblings. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1994, Vol. 149, pp. 620-624.

Авторы:

Еремеев В.В. — д.м.н., заведующий лабораторией клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Духовлинов И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Орлов А.И. — д.х.н., заместитель директора ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Маленко А.Ф. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Федорова Е.А. — аспирант отдела молекулярной биотехнологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Балазовский М.Б. — директор ЗАО «Фарма ВАМ», Санкт-Петербург, Россия

Гергерт В.Я. — д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунологии, ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Authors:

Yeremeev V.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory for Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Duhovlinov I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Orlov A.I., PhD, MD (Chemistry), Deputy Director, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Malenko A.F., PhD (Biology), Senior Research Associate, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Fedorova E.A., PhD Student, Molecular Biotechnology Department, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Balazovsky M.B., Director, Pharma VAM Private Company, St. Petersburg, Russian Federation

Gergert V.Ya., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Immunology Department, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Поступила 28.11.2016
Принята к печати 13.12.2016

Received 28.11.2016
Accepted 13.12.2016