Медицинская иммунология
2019, Т. 21, № 3,
стр. 555-558
© 2019, СПб РО РААКИ

Краткие сообщения
Short communications

Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya
2019, Vol. 21, № 3, pp. 555-558
© 2019, SPb RAACI

ПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ НОВОЙ СУБЪЕДИНИЧНОЙ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ В СОЧЕТАНИИ С BCG СВЯЗАН С ТОРМОЖЕНИЕМ ДИССЕМИНАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ

Еремеев В.В.[1], Шепелькова Г.С.[1], Духовлинов И.В.[2], Гергерт В.Я.[1]

[1] ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия
[2] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. С 1924 года вакцина БЦЖ защищает детей от наиболее тяжелых форм туберкулеза. В то же время защитный эффект BCG у взрослого населения не прослеживается. Возможности применения живой вакцины для ревакцинации дополнительно ограничены быстрым распространением инфекции ВИЧ. Рано секретируемые белки микобактерии туберкулеза широко применялись для конструирования новых противотуберкулезных вакцин, поскольку характеризуются высокой иммуногенностью и способностью защищать от ТБ в экспериментальных моделях. Целью настоящего исследования было изучение эффективности применения нового субъединичного вакцинного препарата для повышения устойчивости экспериментальных животных к ТБ путем ревакцинации после первичной иммунизации BCG. Тестируемая вакцина представляла собой сочетание химерного белка на основе Ag85B-TB10.4-FliC и плазмидной ДНК, кодирующей антиген Ag85A. Оценку эффективности буст-вакцинации проводили на модели аэрозольного заражения вакцинированных только BCG или BCG с последующей ревакцинацией тестируемой вакциной, а также интактных лабораторных мышей линии C57BL/6 вирулентным лабораторным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv по результатам определения высеваемости микобактерий из органов и продолжительности жизни животных после заражения. Было показано, что дополнительная буст-вакцинация исследуемой вакциной, по сравнению с обычной вакцинацией BCG, приводит к усилению торможения диссеминации микобактерий из очага инфицирования и существенному продлению жизни зараженных животных.

Ключевые слова: туберкулез, вакцина, БЦЖ, ревакцинация

PROTECTIVE EFFECT INDUCED BY THE NEW SUBUNIT TUBERCULOSIS VACCINE WHEN USED AS A BCG BOOST IS ASSOCIATED WITH INHIBITION OF MYCOBACTERIAL DISSEMINATION

Yeremeev V.V.[a], Shepelkova G.S.[a], Dukhovlinov I.V.[b], Gergert V.Ya.[a]

[a] Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, Russian Federation
[b] Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Since 1924, BCG vaccine is used to protect children from the most severe forms of tuberculosis. At the same time, the protective effect of BCG in adults is variable. The potential for revaccination with live

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 Research Institute for Tuberculosis
107564, Russian Federation, Moscow, Yauza all., 2.
Phone: 7 (499) 785-90-72.
E-mail: yeremeev56@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Еремеев, Г.С. Шепелькова, И.В. Духовлинов, В.Я. Гергерт «Протективный эффект новой субъединичной противотуберкулезной вакцины при применении в сочетании с BCG связан с торможением диссеминации микобактерий» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 555-558. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-555-558

© Еремеев В.В. и соавт., 2019

For citation:

V.V. Yeremeev, G.S. Shepelkova, I.V. Dukhovlinov, V.Ya. Gergert "Protective effect induced by the new subunit tuberculosis vaccine when used as a BCG boost is associated with inhibition of mycobacterial dissemination", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 555-558. doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-555-558

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-3-555-558

vaccine is further limited by the rapid spread of HIV infection. The early-secreted *Mycobacterium tuberculosis* proteins have been used extensively in TB vaccine development, due to their high immunogenicity and have shown protective effect in animal models. The aim of our study was to evaluate the opportunity to increase the anti-TB resistance in experimental animals by re-vaccination with a new subunit vaccine preparation following primary immunization with BCG. To perform such boost vaccination, we used a combination of the Ag85B-TB10.4-FliC chimeric protein, and the plasmid DNA encoding Ag85A antigen. Efficiency of the boost vaccination was evaluated in a model of *M. tuberculosis* H37Rv aerosol infection of C57BL / 6 laboratory mice, either in the intact animals, or those vaccinated with BCG only, or BCG followed by revaccination with the test vaccine. The data concerning mycobacteria outgrowth from the organs, and life-span of animals after infection were subject to comparative analysis. We have demonstrated that additional boost vaccination with the vaccine under study, as compared with conventional BCG vaccination, leads to further inhibition of mycobacteria dissemination from the site of infection, and significantly prolonged survival of infected animals.

Keywords: tuberculosis, vaccine, BCG, boost immunization

Введение

Широко применяемая для профилактики туберкулеза (ТБ) вакцина BCG отличается от вирулентных штаммов *Mycobacterium bovis* и *M. tuberculosis* (Mtb) отсутствием локуса *esx-1*, кодирующего так называемые рано секретируемые белки. Тем самым у BCG нарушена способность выходить из фагосомы в цитозоль фагоцита и стимулировать гибель клетки с последующим поглощением материала антигенпрезентирующими клетками [3]. Как следствие, вакцина лишена возможности активировать локализованные в цитозоле распознающие компоненты иммунной системы, потенциально способные участвовать в формировании протективного иммунного ответа. Очевидно, что в варианте Mtb некоторые из этих белков являются факторами вирулентности, обусловливающими чрезмерное воспаление и гранулемообразование, нарушающими тонкий баланс между защитной реакцией и патологией. В экспериментах на иммунодефицитных мышах было показано, что BCG, экспрессирующая ESX-1 из *M. marinum*, менее вирулентна по сравнению с самой Mtb и с BCG, экспрессирующей ESX-1 из Mtb, но по своим протективным свойствам превосходит обычную BCG [4]. Дополнительным аргументом для включения рано секретируемых белков в состав противотуберкулезной вакцины служит наблюдение о существенном вкладе ESAT-6-зависимого иммунного ответа, опосредованного индуцированными через цепочку NLRP3-инфламмасома-IL-18 антиген-неспецифическими, IFNγ-продуцирующими $CD8^+$T-клетками, в защиту от заражения Mtb [5].

На протяжении ряда лет в нашем институте продолжается изучение протективных свойств новой субъединичной противотуберкулезной вакцины на основе Ag85B-TB10.4-FliC и плазмидной ДНК, кодирующей антиген Ag85AMtb. В предварительном исследовании в нашей лаборатории на модели заражения лабораторных мышей относительно резистентной к туберкулезу линии C57BL/6 вирулентным лабораторным штаммом Mtb H37Rv, по результатам определения высеваемости бактерий из органов и продолжительности жизни животных после заражения, была продемонстрирована высокая (сравнимая с BCG Russia) протективная активность трех субъединичных вакцинных препаратов [1]. В последующем в той же модели для наиболее эффективного из этих препаратов было продемонстрировано длительное (до 10 месяцев после вакцинации) сохранение иммунологической памяти к бактериальному антигену [2]. **Целью настоящего исследования** было изучение эффективности применения нового вакцинного препарата для повышения устойчивости экспериментальных животных к ТБ путем ревакцинации после первичной иммунизации BCG.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на самках мышей линии C57BL/6JCit (B6), содержавшимися в виварии ФГБНУ «ЦНИИТ» в стандартных условиях. Условия содержания мышей и порядок проведения экспериментов были определены нормами приказа № 755 МЗ РФ. Возраст животных к началу проведения эксперимента составлял не менее 2-3 мес.

Тестируемая вакцина представляла собой сочетание вариантов химерного белка на основе Ag85B-TB10.4-FliC и плазмидной ДНК, кодирующей антиген Ag85A Mtb. 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 [1].

2 группы мышей по 20 животных в каждой были подкожно провакцинированы 10e5 КОЕ живой вакцины BCG (штамм Russia).

Через 6 недель мышам одной из групп внутримышечно ввели 10 мкг вакцины, конъюгированной с 200 мкл гидроокиси алюминия (буст). Мышам контрольной группы внутримышечно ввели 200 мкл гидроокиси алюминия (контроль BCG).

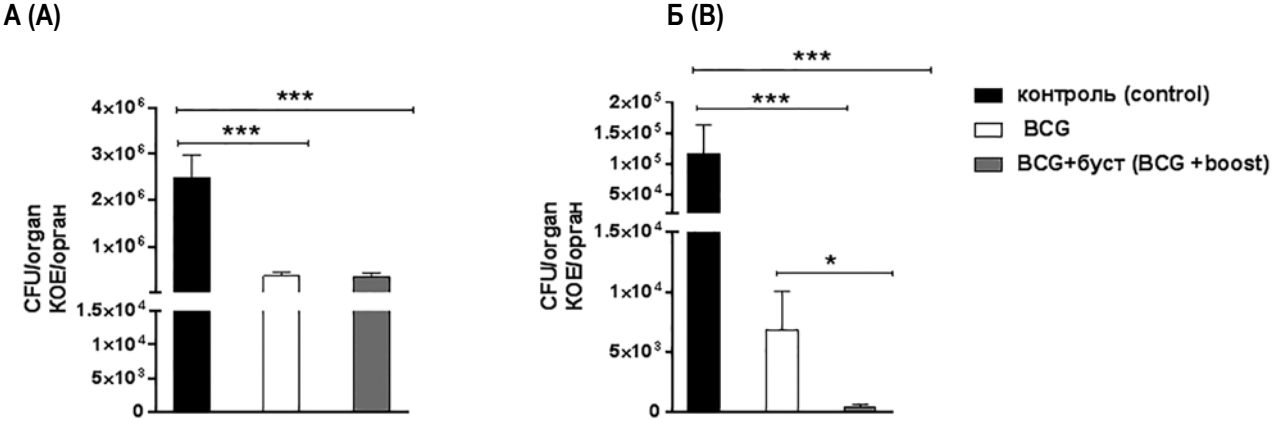

Рисунок 1. Высеваемость микобактерий туберкулеза из легких (А) и селезенки (Б) у мышей B6, вакцинированных BCG или BCG в сочетании с бустом через 3 недели после заражения

Figure 1. Isolation rates for *M. tuberculosis* from lungs (A) and spleen (B) of B6 mice immunized with BCG vaccine or BCG vaccine and boost following 3 weeks after MBT infection

Через 4 недели после последней вакцинации мыши были аэрозольно заражены вирулентным лабораторным штаммом *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv в дозе 600 КОЕ на мышь. Контроль дозы заражения осуществлялся путем высева гомогената легких 5 контрольных мышей на агар Дюбо через 24 часа после заражения. Контрольную группу составляли 20 соответствующих по возрасту мышей, не вакцинированных BCG и не получивших буст-инъекции.

Через 4 недели после заражения у 5 мышей из каждой группы после умерщвления цервикальной дислокацией забирали селезенку и легкие. Полученные органы гомогенизировали, получали серийные разведения в стерильном PBS и высевали на агар Дюбо. Растущие колонии подсчитывали визуально под микроскопом через 3 недели после высева.

Оставшиеся 15 мышей каждой группы использовали для определения среднего срока выживания после заражения.

Результаты и обсуждение

Результаты определения высеваемости микобактерий из органов мышей через 4 недели после заражения приведены на рисунке 1. В то время как вакцинация BCG, вне зависимости от буста субъединичной вакциной, эффективно снижает бактериальную нагрузку в легких (рис. 1А), применение BCG без дополнительной иммунизации в существенно меньшей степени способно притормаживать диссеминацию инфекции из легких в селезенку (рис. 1Б).

Динамика гибели мышей после заражения вирулентным штаммом Mtb представлена на рисунке 2. Сравнение кривых гибели мышей после заражения свидетельствует о положительном влиянии буст-иммунизации субъединичной вакциной на продолжительность жизни инфицированных мышей. К 343-му дню после заражения

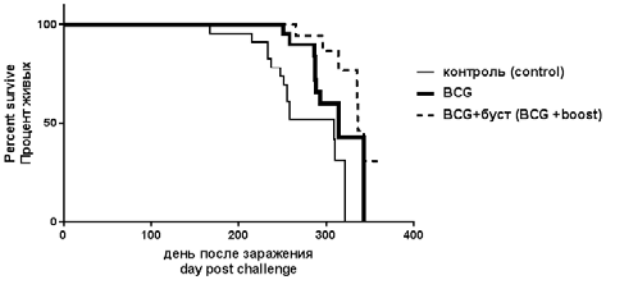

Рисунок 2. Динамика гибели зараженных вирулентными микобактериями мышей, предварительно вакцинированных BCG или BCG с бустом

Figure 2. Survival dynamics of mice infected with virulent mycobacteria, following pre-immunization with BCG vaccine or BCG vaccine and boost

все мыши в контрольных группах пали, в то время как в группе, получившей буст субъединичной вакциной, в живых оставались 5 животных (33%). Статистический анализ кривых гибели вакцинированных животных показал высокую достоверность различий ($p = 0{,}0009$ по Gehan–Breslow–Wilcoxon) между вакцинированными мышами и вакцинированными мышами, получившими буст.

Ключевым вопросом исследования и усовершенствования новой вакцины является подбор антигенов для включения в ее состав. За последнее десятилетие получила дальнейшее развитие концепция об определенных фазах роста Mtb, связанных с периодами репликации, персистенции и дормантности микобактерий [6]. К ассоциированным со стадией активного размножения бактерий антигенам относятся рано секретируемые белки, такие как семейство Ag85, ESAT-6 и CFP-10. Эти антигены широко применялись для конструирования новых противотуберкулезных вакцин и характеризуются высокой имму-

ногенностью и способностью защищать от ТБ в экспериментальных моделях.

Наряду с антигенами рано секретируемых белков микобактерий, в состав изучаемой нами вакцины входил участок белка FliC, способный взаимодействовать с TLR5, запуская процесс созревания макрофагов и дендритных клеток. Кроме того, в последовательность входящего в состав вакцины плазмидного вектора были встроены дополнительные CpG мотивы, также способные активировать ряд компонентов врожденного иммунитета [1].

Таким образом, в использованной нами модели экспериментального ТБ буст-стимуляция специфической и врожденной составляющих иммунного ответа не привела к дополнительному (по сравнению с BCG) торможению репликации Mtb в очаге инфекции. В то же время буст-иммунизация способствует снижению интенсивности воспалительных реакций в легких инфицированных мышей, препятствует разрушению инфицированных клеток легкого и тем самым тормозит диссеминацию Mtb из очага заражения. В результате в нашей модели использование дополнительной иммунизации субъединичной вакциной позволяет существенно повысить протективные свойства вакцины BCG.

Список литературы / References

1. Еремеев В.В., Духовлинов И.В., Орлов А.И., Маленко А.Ф., Федорова Е.А., Балазовский М.Б., Гергерт В.Я. Исследование протективных свойств вакцинного препарата на основе рекомбинантных белков Ag85, TB10 ИFliC // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 197-202. [Yeremeev V.V., Dukhovlinov I.V., Orlov A.I., Malenko A.F., Fedorova E.A., Balazovsky M.B., Gergert V.Ya. Studies on protective effects of a vaccine, based on recombinant Ag85, TB10 and FliC proteins. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 197-202.* (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2017-2-197-202.

2. Еремеев В.В., Духовлинов И.В., Орлов А.И., Шепелькова Г.С., Федорова Е.А., Балазовский М.Б., Гергерт В.Я. Изучение продолжительности иммунного ответа, индуцированного вакциной на основе рекомбинантных белков Ag85, TB10 и FliC // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 271-276. [Yeremeev V.V., Dukhovlinov I.V., Orlov A.I., Shepelkova G.S., Fedorova E.A., Balazovsky M.B., Gergert V.Ya. Duration of immune response induced by the vaccine based on recombinant Ag85, TB10 and FliC proteins. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 271-276.*(In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-271-276.

3. Gröschel M.I., Sayes F., Simeone R., Majlessi L., Brosch R. ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat. Rev. Microbiol., 2016, Vol. 14, no. 11, pp. 677-691.*

4. Gröschel M.I., Sayes F., Shin S.J., Frigui W., Pawlik A., Orgeur M., Canetti R., Honoré N., Simeone R., van der Werf T.S., Bitter W., Cho S.N., Majlessi L., Brosch R. Recombinant BCG expressing ESX-1 of *Mycobacterium marinum* combines low virulence with cytosolic immune signaling and improved TB protection. *Cell Rep., 2017, Vol. 18, no. 11, pp. 2752–2765.*

5. Kupz A., Zedler U., Stäber M., Perdomo C., Dorhoi A., Brosch R., Kaufmann S.H. ESAT-6-dependent cytosolic pattern recognition drives noncognate tuberculosis control *in vivo*. *J. Clin. Invest., 2016, Vol. 126, no. 6, pp. 2109-2122.*

6. Schubert O.T., Ludwig C., Kogadeeva M., Zimmermann M., Rosenberger G., Gengenbacher M., Gillet L.C., Collins B.C., Röst H.L., Kaufmann S.H., Sauer U., Aebersold R. Absolute proteome composition and dynamics during dormancy and resuscitation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Host Microbe, 2015, Vol. 18, no. 1, pp. 96-108.*

Авторы:

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

Шепелькова Г.С. *— к.б.н., старший научный сотрудник 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*

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 Research Institute for Tuberculosis, Moscow, Russian Federation*

Shepelkova G.S., *PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory for Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, Russian Federation*

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

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

Поступила 02.11.2018
Отправлена на доработку 19.11.2018
Принята к печати 25.12.2018

Received 02.11.2018
Revision received 19.11.2018
Accepted 25.12.2018