

# ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ, ФОРМИРУЕМАЯ В ОТВЕТ НА ВАКЦИНАЦИЮ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНОЙ «ГамТБвак»: КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИНЫ НА ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦАХ

Д. А. Клейменов<sup>1</sup>✉, Е. П. Мазунина<sup>1</sup>, В. Г. Лунин<sup>1</sup>, Е. Ю. Коптев<sup>1</sup>, В. А. Мануйлов<sup>1,2</sup>, В. А. Гушчин<sup>1,3</sup>, А. П. Ткачук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория трансляционной биомедицины, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи, Москва

<sup>2</sup>Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва

<sup>3</sup>Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

В настоящее время единственной применяемой в мире вакциной против туберкулеза является БЦЖ — живой аттенуированный штамм *Mycobacterium bovis*. Она защищает детей от милиарного туберкулеза и туберкулезного менингита, но не защищает взрослых от легочного туберкулеза и реактивации латентной формы инфекции. Для повышения эффективности вакцины БЦЖ у взрослых и подростков разрабатываются рекомбинантные бустерные вакцины, несущие антигены как *M. bovis*, так и *M. tuberculosis*. В статье приводятся первые данные о безопасности и иммуногенности кандидатной рекомбинантной вакцины для профилактики туберкулеза «ГамТБвак». Изучали иммуногенность препарата на 12 добровольцах. Оценку проводили по изменению у испытуемых параметров клеточного и гуморального иммунитета (методами IGRA-тест и мультиплексный иммунологический xMAP анализ соответственно) в течение 20 нед. после введения препарата. На 140-й день с момента первой вакцинации у 10 (83 %) из 12 иммунизированных «ГамТБвак» добровольцев сохранялся положительный клеточный ответ на все антигены, входящие в состав вакцины, по сравнению с уровнем до вакцинации. Оба смысловых антигена CFP10 и ESAT6 индуцировали достоверную выработку IgG антител с 98-го и 140-го дней наблюдения соответственно. Антиген Ag85A вызывал сравнительно низкий гуморальный ответ. В целом, изучаемая рекомбинантная вакцина «ГамТБвак» обладает необходимым уровнем безопасности и активирует клеточное и гуморальное звенья адаптивного иммунитета, формирует клеточную память.

**Ключевые слова:** иммунологическая память, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет, туберкулез, БЦЖ, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, IGRA, суспензионный иммунологический анализ, ESAT6, CFP10, Ag85

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения РФ и ФАНО России (государственное задание № 0574-2014-0023).

✉ Для корреспонденции: Клейменов Денис Александрович  
ул. Гамалеи, д. 18, г. Москва, 123098; 10000let@rambler.ru

Статья получена: 20.09.2017 Статья принята к печати: 20.10.2017

## IMMUNOLOGICAL MEMORY FORMED IN RESPONSE TO ADMINISTRATION OF GamTBvac RECOMBINANT TUBERCULOSIS VACCINE CANDIDATE: CLINICAL TRIALS IN HEALTHY VOLUNTEERS

Kleymenov DA<sup>1</sup>✉, Mazunina EP<sup>1</sup>, Lunin VG<sup>1</sup>, Koptev EYu<sup>1</sup>, Manuilov VA<sup>1,2</sup>, Gushchin VA<sup>1,3</sup>, Tkachuk AP<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Translational Biomedicine, N. F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Institute of Molecular Medicine, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

So far BCG, a live attenuated *Mycobacterium bovis* strain remains the only available vaccine for tuberculosis prevention and control. Although BCG is effective against miliary tuberculosis and tuberculous meningitis in children, it barely protects adults and adolescents from the pulmonary form of the disease or reactivation of the latent infection. Still, its effectiveness can be increased by using recombinant booster vaccines containing both *M. bovis* and *M. tuberculosis* antigens. This article reports preliminary data on the safety and immunogenicity of a recombinant vaccine candidate, GamTBvac, developed for tuberculosis prevention. Its immunogenicity was studied in 12 volunteers. Over the course of 20 weeks following GamTBvac administration, we measured cell-mediated and humoral immune responses using interferon-gamma release assays and multiplex xMAP-based immunoassays. On day 140 after the first administration of the vaccine, 10 participants of the study (83 %) still showed a positive cellular response to all antigens contained in the vaccine. Both sense antigens CFP10 and ESAT6 induced production of IgG antibodies between days 98 and 140 of the observation. The Ag85 antigen induced a relatively weak humoral response. On the whole, the recombinant GamTBvac is safe and activates cell-mediated and humoral components of the adaptive immunity, forming immunological memory.

**Keywords:** immunological memory, humoral immunity, cell-mediated immunity, tuberculosis, BCG, *M. bovis*, *M. tuberculosis*, IGRA, suspension immunoassay, ESAT6, CFP10, Ag85

**Funding:** this work was supported by the Russian Ministry of Health and the Federal Agency for Scientific Organizations (state task no. 0574-2014-0023)

✉ Correspondence should be addressed: Denis Kleymenov  
ul. Gamalei, d. 18, Moscow, Russia, 123098; 10000let@rambler.ru

Received: 20.09.2017 Accepted: 20.10.2017

Согласно расчетам, приведенным в [1], за последние 200 лет от туберкулеза умерло более одного миллиарда человек. Это больше, чем количество людей, скончавшихся в тот же период от оспы, малярии, чумы, гриппа, холеры и СПИДа вместе взятых. К концу XIX в. каждая пятая из смертей от любых причин была связана с туберкулезом [1]. Ситуация изменилась после введения вакцины БЦЖ (BCG, *Bacillus Calmette–Guérin*) в 20-х гг. 20 в., и в какой-то момент была надежда полностью победить туберкулез, учитывая радикальное снижение заболеваемости в Европе и Америке [2]. Прогресс в борьбе с туберкулезом остановился во многом по причине свойств самой вакцины БЦЖ. Так, было установлено, что вакцинация БЦЖ защищает детей в раннем возрасте от миллиарного туберкулеза и туберкулезного менингита, но не способна обеспечить высокую степень защиты от аэрозольных форм инфекции подростков и взрослых. Кроме того, выяснилось, что эффективность вакцинации варьирует от высокой в северных районах Европы и Северной Америки до ничтожной в южных экваториальных районах мира [2]. Таким образом, несмотря на наличие вакцины БЦЖ и на то, что в настоящее время туберкулез является достаточно успешно излечимым заболеванием, он по-прежнему входит в тройку основных причин смерти от инфекционных заболеваний. В 2015 г. зафиксировано 10,4 млн новых случаев активного туберкулеза, и не менее 1,8 млн человек погибли от этой болезни [3].

Другой стороной проблемы туберкулеза является увеличение заболеваемости его мультирезистентными формами. Известно, что в 2015 г. было зафиксировано около полумиллиона новых случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-туберкулеза). Основная проблема МЛУ-туберкулеза — очень высокая стоимость лечения (более \$ 10 000 за курс) при прогнозе выздоровления лишь в 50 % случаев. Уже сейчас, по оценкам экспертов, около 50 млн человек во всем мире являются латентно инфицированными МЛУ-туберкулезом. Между тем вероятность перехода латентной формы в активную может быть более 10 % в течение жизни [4]. В России особенно остро стоит проблема распространения МЛУ-туберкулеза. Так, в общей мировой заболеваемости МЛУ-туберкулезом совместный вклад Индии, Китая и России — 45 % [3]. Общая заболеваемость туберкулезом в самой России остается высокой и составляет в среднем 115 на 100 000 жителей, а в отдельных регионах показатель доходит до 160 случаев [5].

Глобальным планом ВОЗ является сокращение заболеваемости туберкулезом на 90 % и смертности от туберкулеза на 95 % к 2035 г. [3]. Эта амбициозная цель не может быть достигнута без разработки новых высокоэффективных вакцин. Из разрабатываемых на сегодняшний день вакцин существенную долю составляют рекомбинантные, включающие в свой состав антигены *Mycobacterium tuberculosis*, некоторые из которых присутствуют в БЦЖ [6]. Композиции антигенов в таких вакцинах определяются тем, что они разрабатываются как бустерные вакцины, которые направлены на усиление иммунитета, сформированного БЦЖ, а не для первичной вакцинации новорожденных [7]. Примером такого препарата является разработанная авторами рекомбинантная вакцина «ГамТБвак», состоящая из двух фьюжен-белков микобактериальных антигенов (Ag85A и ESAT6-CFP10), слитых с декстран-связывающим доменом (dextran-binding domain, DBD), иммобилизованным на декстране. Адьювант вакцины представлен ДЭАЭ-декстраном и CpG-оли-

гонуклеотидами (агонист рецептора TLR9). Обоснование выбора антигенной композиции вакцины и ее формуляции представлено в нашей предыдущей работе [8].

Доказательные исследования показали высокую иммуногенность и эффективность композиции «ГамТБвак» в модельных экспериментах на мышах и морских свинках [8]. На обеих инфекционных моделях «ГамТБвак» проявила защитный эффект против штамма H37Rv *M. tuberculosis* как при аэрозольном, так и при внутривенном заражении. Как и предполагалось, «ГамТБвак» показала особенно сильный эффект в случае применения ее в качестве бустерной вакцины на фоне предшествующей иммунизации БЦЖ. Успешное завершение доклинических исследований позволило нам начать клинические исследования по изучению безопасности и иммуногенности вакцины на здоровых добровольцах (далее — КИ) (разрешение Минздрава России от 10.04.2015 № 179; протокол исследования доступен в международной базе данных NIH [9]). В настоящей работе представлены первые результаты экспериментов по изучению иммуногенности вакцины на здоровых БЦЖ-вакцинированных добровольцах.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Дизайн и протокол клинического исследования

Клинические исследования проводились в соответствии с законодательством Российской Федерации, с соблюдением отечественных и международных регуляторных и этических норм [10–13]. Всего в КИ фазы I/IIa (изучение безопасности и иммуногенности) принимали участие 60 здоровых БЦЖ-вакцинированных добровольцев обоих полов в возрасте от 18 до 49 лет. Дизайн протокола исследования предполагал три этапа (рис. 1). Одним из критериев не включения на этапе скрининга (помимо фармакологических или острых клинических показателей) был положительный результат на наличие латентной туберкулезной инфекции, определяемый лабораторно тестом QuantIFERON-TB Gold (Qiagen, США) [14, 15]. На первом этапе КИ с участием 24 добровольцев изучали безопасность однократного введения вакцины «ГамТБвак», при этом 12 человек получали плацебо, а 12 — ¼ предполагаемой дозы применения. Оценку безопасности проводили при наступлении нежелательных явлений (по классификации ВОЗ, цит. по [16]) в течение 20 нед. наблюдения после введения препарата, включающего медицинское обследование (медицинский осмотр, электрокардиограмма, общие анализы мочи и крови, рентгенограмма органов грудной клетки и др.). Второй этап КИ был посвящен изучению иммуногенности препарата при двукратном введении с двухмесячным интервалом и проходил с участием 12 добровольцев, каждый из которых получил по ¼ предполагаемой дозы применения препарата. Иммуногенность вакцины на данном этапе оценивали по изменению параметров клеточного и гуморального иммунитета испытуемых (см. ниже) в течение 20 нед. после введения препарата. На третьем этапе КИ (который по состоянию на момент выхода публикации завершается, и результаты которого не включены в настоящую работу), проводимом для подбора оптимальной дозы, участвуют еще 24 добровольца, половина из которых получила дозу в ½ рекомендуемой, а оставшиеся — полную (максимальную) дозу вакцины.

Наработка рекомбинантных антигенов *M. tuberculosis*

Для экспрессии антигенов, входящих в состав вакцины (Ag85A, ESAT6-CFP10), слитых с декстран-связывающим доменом [8], использовали клетки *Escherichia coli* штамма BL21(DE3) pLysS, культуры растили на питательной среде LB (lysogeny broth), содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл хлорамфеникола, при температуре 37 °С и перемешивании. Индукцию экспрессии проводили при оптической плотности культуры 0,7–1 (при 600 нм) путем добавления к суспензии изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозида (IPTG) до конечной концентрации 0,5 мМ и продолжали инкубацию при 30 °С в течение 4 ч при перемешивании. Бактериальную культуру *E. coli* после проведения экспрессии центрифугировали 20 мин при 6000 г и 4 °С. Осадок бактерий лизировали в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl с pH 8, 200 мМ NaCl, Тритон-X100 0,1 % по объему, после растворения клеток в буфере добавляли лизоцим до 25 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин при RT, затем проводили обработку ультразвуком. В зависимости от используемого метода выделения рекомбинантных антигенов проводили либо из фракции осадка после лизиса клеток, либо из фракции супернатанта. Центрифугирования лизата проводили при 17 000 г в течение 20 мин.

Препараты Ag85A-his8, DBD-his8, ESAT6-his8 получали из лизатов культур-продуцентов, несущих экспрессионный вектор pET42b с соответствующими вставками генов, кодирующих белки *M. tuberculosis*. Экспрессируемые белки оказывались в нерастворимой фракции лизата — тельцах включения. Перед растворением телец включения в буфере, содержащем 8 М мочевины, мы проводили три раунда их отмывки от растворимых белковых и небелковых примесей лизирующим буфером, осаждая центрифугированием. Растворенные в 8 М мочеvine микобактериальные антигены ренатурировали с помощью пульс-ренатурации и проводили очистку на аффинной хроматографической колонке HisPrep FF 16/10 (GE, США) по стандартному протоколу, рекомендованному производителем.

Препарат антигена CFP10 получали из лизатов культур-продуцентов, несущих экспрессионный вектор pTXB1, с соответствующей вставкой гена, кодирующего белок CFP10. Очистку растворимого белка CFP10 проводили с использованием аффинного хроматического сорбента Chitin Resin (NEB, США) по стандартному протоколу, рекомендованному производителем.

## Определение клеточного иммунитета

Для определения Т-клеточной популяции, чувствительной к антигенам *M. tuberculosis*, использовали подход, известный как IGRA-тест (interferon-gamma release assay [17, 18]), в ранее описанной нами модификации [19]. Кратко, для

этого 100 мкл цельной крови, отобранной в вакуумную пробирку с гепарином лития в качестве антикоагулянта и содержащей лейкоцитарную фракцию, добавляли к 600 мкл полной ростовой среды (90 % среда 199, 10 % эмбриональная телячья сыворотка, 2 мМ L-глутамин, 10 мМ HEPES, 50 мкг/мл гентамицина сульфат; производитель компонентов — «ПанЭко», Россия). Описанным образом для каждой пробы получали четыре аликвоты. В два раствора добавляли рекомбинантные антигены, входящие в состав вакцины «ГамТБвак»: DBD-Ag85A и DBD-ESAT6-CFP10, с конечной концентрацией в ПРС 50 мкг/мл. Отдельно в среду с кровью добавляли неспецифический индуктор интерферона-гамма в лимфоцитах (конканавалин А из *Canavalia ensiformis* производства Sigma-Aldrich, Германия) в качестве положительного контроля стимуляции и отрицательный контроль (стерильный бессолевой 20 мМ ТРИС, pH 7,5). Таким образом, для каждого из образцов крови проводили четыре реакции стимуляции в отдельных пробирках: антигенами DBD-Ag85A, DBD-ESAT6-CFP10, положительным и отрицательным контролями. Среду с кровью, содержащую живые лимфоциты, стимулирующие антигены и контроли, инкубировали в течение 72 ч в стерильных влажных условиях при +37 °С. После завершения инкубации количество интерферона-гамма в среде определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора А-8752 гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ («Вектор-Бест», Россия). Положительный ответ на стимуляцию учитывали как превышение уровня интерферона-гамма над уровнем спонтанной продукции в образце с отрицательным контролем [15, 19]. Для каждого из 12 участников данного этапа исследования забор крови и стимуляцию клеток антигенами проводили перед введением вакцины (0-й день) и на 1, 42, 63, 98 и 140-й дни после иммунизации.

## Проведение суспензионного иммунологического анализа для определения гуморального иммунитета

Для серологического определения уровня антител отдельно к антигенам Ag85A, ESAT6, CFP10, DBD, а также к их фьюжен-формам DBD-Ag85A, DBD-ESAT6-CFP10, с использованием полученных рекомбинантных белков были разработаны шесть соответствующих моноплексных тест-систем на основе технологии xMAP (Luminex Corporation, США) [20].

Оптимальные для каждого антигена или фьюжен-формы количества (от 5 до 20 мкг/10<sup>6</sup> микросфер) конъюгировали с 6 регионами (таблица). Сенсibilизацию микросфер выполняли в соответствии с протоколом, приведенным в официальном издании компании Luminex «The xMAP Cookbook, 3rd ed.» [20], методом карбодиимидной химии.

Концентрации антигенов, используемых для конъюгации микросфер

Антиген	Концентрация для конъюгации, мкг/10 <sup>6</sup> микросфер	Регион микросфер
DBD-ESAT6-CFP10	5	61
CFP-10	20	33
ESAT-6	10	25
DBD	20	55
DBD-Ag85A	20	67
Ag85A	20	42

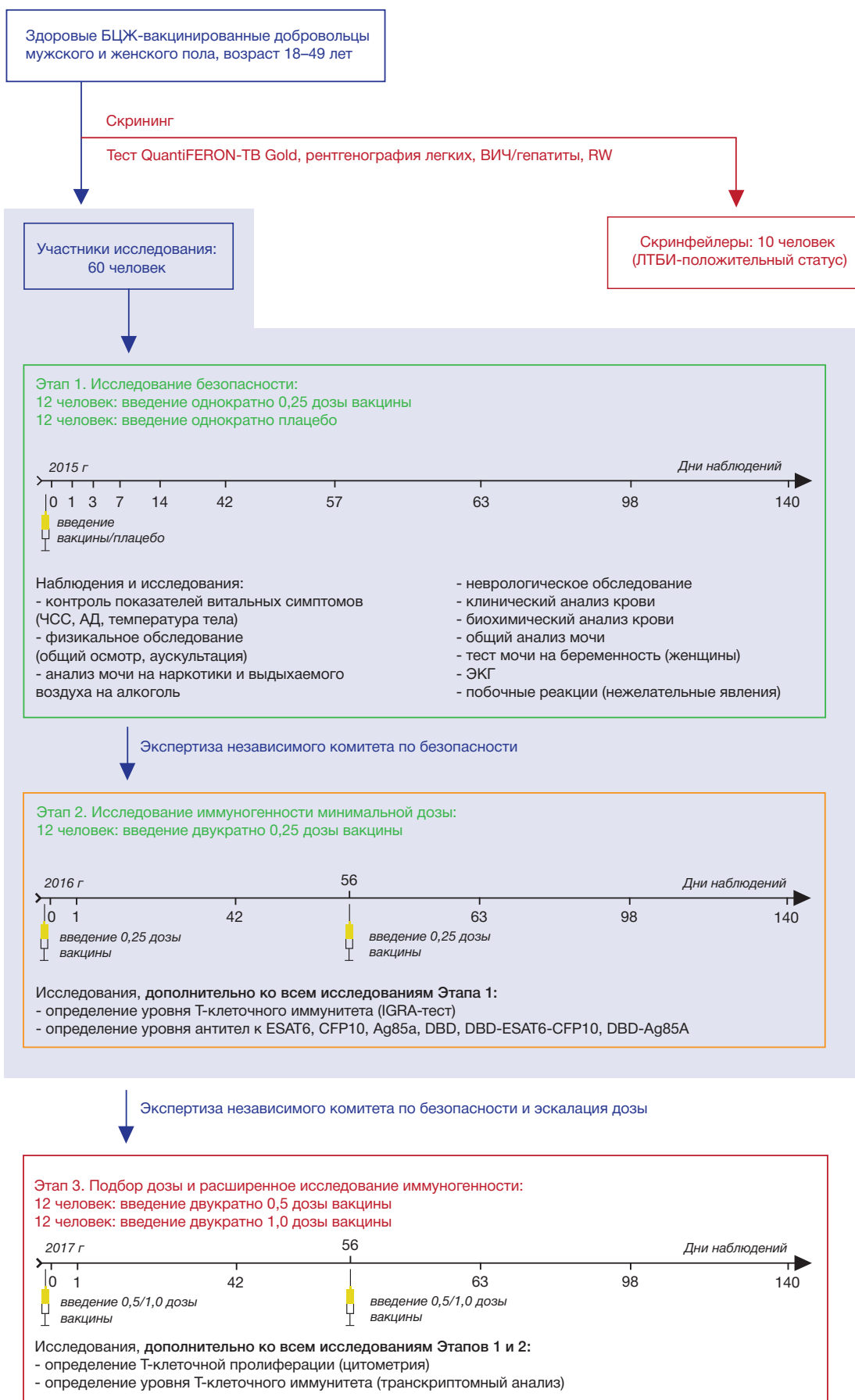


Рис. 1. Диаграмма, отображающая дизайн исследования. Выделением отмечена часть протокола клинических исследований (Этапы 1 и 2), результаты по которым представлены в данной статье

Микросферы ( $1 \times 10^6$  шт) активировали 10 мкл 50 мг/мл (в дист.  $H_2O$ ) 1-Этил-3-[3-диметиламинопропил] карбодимид гидрохлорид (EDC) и 10 мкл 50 мг/мл (в дист.  $H_2O$ ) N-гидроксисульфосукцинимид натрия соль (s-NHS) в 80 мкл активирующего буферного раствора (0,1 M  $NaH_2PO_4$ , pH 6,2) в течение 20 мин при 25 °C с вращением 20 об/мин. После этого активированные микросферы промывали два раза и ресуспендировали в 500 мкл буферного раствора для связывания (50 mM MES, pH 5,0) с добавлением каждого из антигенов к своему региону. После инкубации в течение 2 ч в темноте при 25 °C с вращением 20 об/мин и трех этапов промывки блокирующим буферным раствором микросферы ресуспендировали в 1 мл буферного раствора для хранения и использовали для анализа не менее чем через 16 ч. Подсчет микросфер, оставшихся после процедуры сенсibilизации, осуществляли с помощью автоматического счетчика клеток TC20 (Bio-RAD Laboratories, США). В качестве блокирующего буферного раствора/буферного раствора для хранения сенсibilизированных микросфер использовали PBS-TBN (PBS, 0,1 % BSA, 0,02 % Tween-20, 0,05 %  $NaN_3$ ).

Процедуру постановки иммунологического анализа проводили по схеме непрямого серологического исследования в соответствии с протоколом [20]. В лунку планшета (96-луночный, полистирол, Microlon, плоскодонный прозрачный; Greiner, Австрия) добавляли 50 мкл PBS-TBN с 2500 микросферами одного региона и 50 мкл сыворотки, предварительно разведенной PBS-TBN в 50 раз (итоговое разведение сыворотки 1 : 100). Смесь инкубировали на шейкере-термостате PST-60HL-4 (Biosan, Латвия) 60 мин, при +25 °C и 800 об/мин. Далее проводили отмывку с помощью ручного магнитного сепаратора MILLIPLIX (Merck Millipore, Германия): 2 цикла добавления-перемешивания на шейкере, 30 с, 800 об/мин — удаления 100 мкл PBS-TBN в каждой лунке (такие условия отмывки применяли на всех этапах). Затем микросферы ресуспендировали в 50 мкл PBS-TBN и к ним добавляли 50 мкл препарата козьих антител против IgG человека, конъюгированных с фикоэритрином (One Lambda/Thermo Fisher Scientific Inc., США) в концентрации 5 мкг/мл в PBS-TBN. Итоговое разведение конъюгата в каждой лунке соответствовало 2,5 мкг/мл. Смесь вновь инкубировали на шейкере-термостате 30 мин, при +25 °C и 800 об/мин, а затем вновь отмывали. По окончании отмывки ресуспендировали микросферы в 100 мкл PBS-TBN. Для обработки результатов использовали анализатор MAGPIX (Luminex, США). В расчет брали не менее 100 микросфер каждого региона на лунку.

Количественный учет результатов детекции антител осуществляли в единицах MFI (median fluorescence intensity). Для каждого образца из полученного значения вычиталось значение отрицательного контроля (нормальная кроличья сыворотка). Для каждого из 12 участников данного этапа исследования забор сыворотки крови и определение уровня антител ко всем перечисленным антигенам проводили перед введением вакцины (0-й день) и на 1, 42, 63, 98 и 140-й дни после иммунизации.

#### Статистическая обработка данных

Обработку данных проводили с использованием программ MS Excel и GraphPad Prism 6. Статистическую значимость различий для клеточного и гуморального ответа определяли с использованием критерия Вилкоксона для сопряженных пар. Различия считали значимыми при значении  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Безопасность вакцины «ГамТБвак» в минимальной дозе

В ходе КИ (рис. 1) нежелательных явлений, в том числе серьезных, не зафиксировано. Все выявленные отклонения лабораторных показателей и показателей ЭКГ были расценены исследователями сертифицированного клинического центра [9] как клинически незначимые. Отмечены случаи развития гиперемии в месте введения препарата, которая регистрировалась у 6 добровольцев через 24 ч после введения препарата «ГамТБвак» и купировалась самостоятельно на 3-й день. Данное изменение описано в инструкции к исследуемому препарату, имеет первую степень тяжести по классификации ВОЗ [16] и не было расценено как клинически значимое. Таким образом, можно заключить, что препарат «ГамТБвак» в  $\frac{1}{4}$  предполагаемой дозы применения [8]: белковый антиген DBD-Ag85A (микобактериальный белок Ag85A, слитый с декстран-связывающим доменом) — 0,006 мг; белковый антиген DBD-ESAT6-CFP10 (микобактериальный белок ESAT6, слитый с декстран-связывающим доменом) — 0,006 мг; декстран с молекулярной массой 500 000 Да — 2,5 мг; ДЭАЭ-декстран с молекулярной массой 500 000 Да — 0,125 мг; CpG-олигонуклеотиды с последовательностью 5'-ggGGGACGA:TCGTCgggggg-3' — 0,0375 мг, — обладает высоким уровнем безопасности.

### Клеточный иммунитет

Клеточный иммунитет играет ключевую роль в защите от туберкулезной инфекции, поэтому изучение клеточного иммунитета в ответ на вакцинацию — основная задача для подтверждения иммуногенности вакцин против туберкулеза [6, 21, 22]. Наиболее часто используемым методом является оценка секреции лимфоцитами ИФН- $\gamma$  в ответ на стимуляцию антигенами, входящими в состав вакцины, в модификациях, использующих IGRA-тест, метод ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot), проточную цитометрию. В случае изучения иммуногенности вакцины «ГамТБвак» была использована модификация IGRA-теста.

В экспериментах по определению выработки ИФН- $\gamma$  Т-лимфоцитами в ответ на стимуляцию рекомбинантными антигенами *M. tuberculosis* было обнаружено, что оба антигена, входящих в состав вакцины: DBD-Ag85A и DBD-ESAT6-CFP10, индуцируют достоверное повышение продукции ИФН- $\gamma$  (рис. 2, А, Б). При этом достоверное повышение ответа на DBD-Ag85A проявляется уже после первой иммунизации с 42-го дня. Поскольку Ag85A экспрессируется *M. bovis*, а все добровольцы, принимавшие участие в клинических исследованиях, были вакцинированы БЦЖ согласно календарю профилактических прививок, ранний клеточный ответ на Ag85A можно объяснить проявлением бустерного эффекта к БЦЖ [9]. Клеточный ответ на DBD-ESAT6-CFP10 становится выраженным через месяц после второй иммунизации «ГамТБвак», начиная с 98-го дня. На 140-й день с момента первой вакцинации у 10 (83 %) из 12 иммунизированных «ГамТБвак» добровольцев сохранялся положительный клеточный ответ на все антигены, входящие в состав вакцины, по сравнению с уровнем до вакцинации.

Таким образом, можно заключить, что используемая в составе вакцины «ГамТБвак» антигенная композиция является иммуногенной и приводит к формированию Т-клеточного ответа. При этом оба антигенных фьюжена

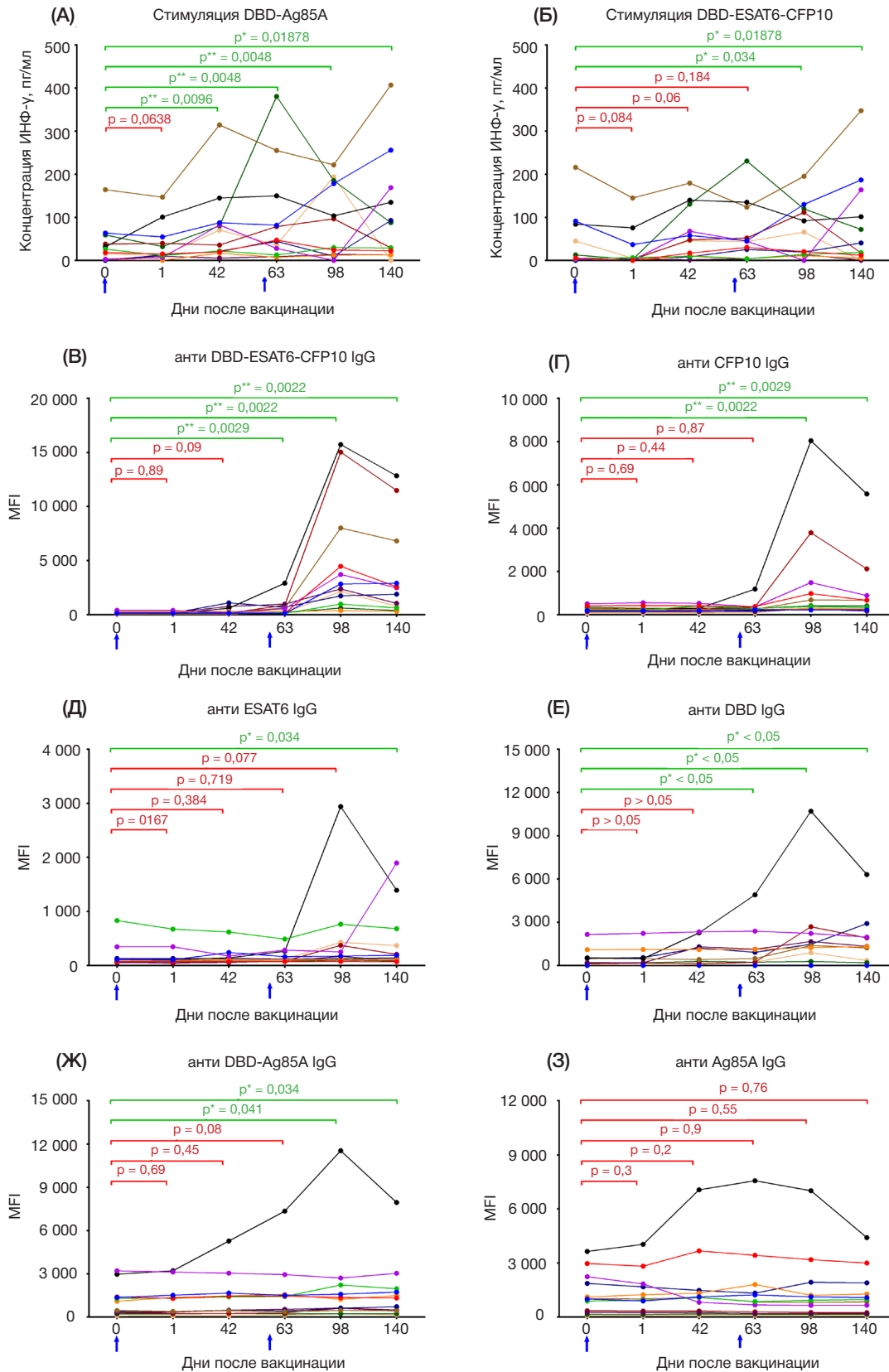


Рис. 2. Иммуногенность вакцины «ГамТБвак» у 12 добровольцев.

(А), (Б) Оценка клеточного иммунитета. Применяли ранее разработанную модификацию теста IGRA [19], оценивающего уровень секреции ИНФ-γ лимфоцитами цельной крови в ответ на стимуляцию антигенами DBD-Ag85A (А) и DBD-ESAT6-CFP10 (Б). Из значений необработанных данных был вычтен уровень спонтанной продукции ИНФ-γ.

(В) — (З) Оценка уровня антител к компонентам вакцины DBD-ESAT6-CFP10 (В) и его составляющих: CFP10 (Г), ESAT6 (Д), DBD (Е), а также DBD-Ag85A (Ж) и его ключевого компонента Ag85A (З). Проводили с использованием технологии xMAP

При расчете уровня статистической значимости использовали критерий Вилкоксона для сопряженных пар. Значения р обозначены зеленым цветом при наличии достоверных различий показателей по дням вакцинации при сравнении с нулевым визитом (\*р < 0,05 и \*\*р < 0,01), красным цветом — при отсутствии статистически значимых различий. Синими стрелками отмечены дни введения вакцины «ГамТБвак».

обладают выраженной иммуногенностью, но с разной динамикой развития иммунного ответа.

#### Гуморальный иммунитет

Изучение динамики накопления в сыворотке крови испытуемых антител класса G к антигенам, входящим в состав вакцины «ГамТБвак» (DBD-Ag85A и DBD-ESAT6-CFP10), показало, что оба антигенных фьюжена в той или иной мере индуцируют выработку антител (рис. 2, В–З). Антиген DBD-ESAT6-CFP10 оказался более сильным индуктором гуморального иммунитета (рис. 2, В). Достоверное повышение антительного ответа наблюдалось с 63-го дня после первой иммунизации. В последней точке наблюдений (140-й день) у 11 (92 %) из 12 добровольцев было показано наличие антител к данному фьюжену. Детальный анализ иммуногенности отдельных антигенов в составе фьюжена показал, что оба смысловых антигена CFP10 (рис. 2, Г) и ESAT6 (рис. 2, Д) индуцировали выработку IgG антител с 98-го и 140-го дней наблюдения соответственно ( $p^{**} = 0,0022$  и  $p^{*} = 0,034$ ). Любопытно, что DBD также проявил иммуногенность в составе фьюжена, причем даже раньше, чем смысловые антигены, начиная с 63-го дня (рис. 2, Е) после иммунизации.

Другой фьюжен DBD-Ag85A показал сравнительно низкую иммуногенность (рис. 2, Ж). Достоверные различия по этому антигену наблюдались с 98-го дня ( $p^{*} = 0,041$ ) после иммунизации. Однако статистический анализ данных показал отсутствие достоверной связи ( $p > 0,05$ ) между вакцинацией и продукцией IgG антител к Ag85A (рис. 2, З).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках проведенной части I фазы клинических испытаний вакцины «ГамТБвак» показано, что при двукратном введении вакцина обладает приемлемым профилем безопасности в изученных дозах для здоровых БЦЖ-вакцинированных добровольцев, не имеющих латентной инфекции. Серьезных нежелательных явлений не выявлено ни у одного из пациентов. Отмечены случаи развития гиперемии в месте введения препарата, которая была зарегистрирована у 6 добровольцев через 24 ч после введения препарата «ГамТБвак» и купировалась самостоятельно на 3-й день. Данное изменение описано в инструкции к исследуемому препарату, имеет первую степень тяжести по классификации ВОЗ [16] и не было расценено как клинически значимое.

Полученные результаты показали, что клеточное звено иммунитета активировалось у 10 (83 %) из 12 добровольцев, получивших вакцину «ГамТБвак». При этом антиген DBD-Ag85A стимулировал бустерный эффект, проявившийся уже после первой иммунизации (рис. 2, А). Наиболее вероятно, что эффект активировал именно Ag85A, так как в случае второго антигена DBD-ESAT6-CFP10 развитие иммунологической памяти наблюдали только после второй иммунизации (рис. 2, Б). В рамках проведенного исследования не был изучен вклад каждого из антигенов фьюжена в отдельности в активацию клеточного звена иммунитета. Между тем ранее на мышинной модели вклад каждого из антигенов «ГамТБвак» был детально исследован [8]. Так, было показано, что наибольшую иммуногенность проявляют Ag85A и ESAT6, тогда как эффект CFP10 менее выражен, хотя и достоверен при использовании в бустерной вакцинации после БЦЖ. Тогда же было изучено,

что вклад DBD в активацию клеточного звена иммунитета является незначительным [8]. Это соответствует результатам ранее проводимых других клинических исследований. Так, в серии клинических исследований рекомбинантных вакцин (H1, H4, H56), проводимых Государственным институтом сывороток (Копенгаген, Дания), было показано, что Ag85, как и ESAT6, проявляют высокую иммуногенность [21–23]. Формируемую данными антигенами клеточную память наблюдали в течении полугода после первой иммунизации. В рамках данного исследования иммунизация «ГамТБвак» ведет к формированию клеточной памяти, достоверно сохраняющейся на финальный 140-й день исследований.

Вопреки классическим представлениям о преимущественной роли клеточного иммунитета для борьбы с туберкулезом, в последние несколько лет все более значимая роль отводится гуморальному иммунитету [6, 24]. В этой связи изучение активации гуморального звена иммунитета противотуберкулезными вакцинами приобретает все большее значение. В случае «ГамТБвак» гуморальный ответ формировался на все антигены фьюжена DBD-ESAT6-CFP10 (рис. 2, В–Е). Наиболее ранний и сильный ответ был отмечен в отношении антигена CFP10 (рис. 2, Г). Таким образом, CFP10 является индуктором как клеточного, так и гуморального иммунитета. Достоверный ответ на ESAT6 появляется позднее и с меньшей интенсивностью, но, по всей видимости, все же вносит свой вклад в общую иммуногенность DBD-ESAT6-CFP10 (рис. 2, В, Д).

Устойчивый и сильный гуморальный ответ на «вспомогательный» антиген DBD (рис. 2, Е), разумеется, не имеет отношения к защите от туберкулеза, однако антитела к DBD могут служить в будущих исследованиях в качестве серологического маркера и стать индикатором проведенной иммунизации в случае недокументированного вакцинального статуса пациента, что важно в популяционных исследованиях и для нужд персонализированной медицины.

Неожиданной оказалась низкая иммуногенность антигена Ag85A в отношении гуморального иммунитета (рис. 2, З), который, по всей видимости, не вносит вклада в общую иммуногенность DBD-Ag85A (рис. 2, Ж). В экспериментах на животных Ag85A индуцировал высокий титр антител как в случае применения «ГамТБвак» в качестве единственной вакцины, так и в случае бустерной после иммунизации БЦЖ [8]. Отсутствие стимуляции гуморального иммунитета можно объяснить неправильным фолдингом Ag85A, используемого для конъюгации с микросферами xMAP. Против данного предположения говорит тот факт, что у части добровольцев титр антител, по всей видимости, является априорно высоким во всех исследуемых точках. Вторым объяснением может быть то, что именно повышенный титр антител, имеющихся после вакцинации БЦЖ, приводит к быстрой нейтрализации небольших количеств белка, приносимых вакцинацией, без запуска бустерного эффекта. Проверка данных предположений требует отдельных экспериментов.

Изучение вклада каждого из антигенов в развитие гуморального иммунитета при проведении доклинических и клинических исследований противотуберкулезных вакцин является важным в свете смещения парадигмы относительно роли гуморального ответа в туберкулезной инфекции [24]. Между тем для большинства исследованных противотуберкулезных вакцин вообще не приводятся данные по антительному ответу [22, 23] или приводятся для всех антигенов без дифференциации [21]. Приведенные данные по «ГамТБвак» показывают, что антигены в

составе вакцины могут иметь диаметрально противоположный вклад в иммунологическую память клеточного и гуморального типа.

## ВЫВОДЫ

Изучаемая рекомбинантная вакцина «ГамТБвак» обладает необходимым уровнем безопасности и активирует клеточное и гуморальное звенья адаптивного иммунитета, формирует клеточную память. В рамках проведенного исследования получены данные, указывающие на формирование

устойчивого клеточного и гуморального иммунитета при введении  $\frac{1}{4}$  теоретически расчетной дозы. Это позволяет рассчитывать на успешное завершение текущей фазы клинических исследований (Этапа 3), в ходе которых иммуногенность вакцины будет доказана с использованием альтернативных высокотехнологичных методов, таких как проточная цитометрия и анализ транскриптома клеток иммунной системы. Положительные результаты послужат основанием для начала фазы IIb, целью которой будет подтверждение профилактической эффективности вакцины.

## Литература

1. Kaufmann SHE, Weiner J, von Reyn CF. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *Int J Infect Dis*. 2017 Mar; 56: 263–7. DOI<sup>^</sup>: 10.1016/j.ijid.2016.10.018
2. Nguipdop-Djomo P, Haldal E, Rodrigues LC, Abubakar I, Mangtani P. Duration of BCG protection against tuberculosis and change in effectiveness with time since vaccination in Norway: A retrospective population-based cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb; 16 (2): 219–26. DOI<sup>^</sup>: 10.1016/S1473-3099(15)00400-4
3. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2016*. 21th ed. Geneva: World Health Organization; 2016. 214 p.
4. Glaziou P, Sismanidis C, Floyd K, Raviglione M. Global Epidemiology of Tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Feb; 5 (2): a017798. DOI<sup>^</sup>: 10.1101/cshperspect.a017798
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2017. 220 с.
6. Karp CL, Wilson CB, Stuart LM. Tuberculosis vaccines: Barriers and prospects on the quest for a transformative tool. *Immunol Rev*. 2015 Mar; 264 (1): 363–81. DOI<sup>^</sup>: 10.1111/imr.12270. PubMed PMID: 25703572.
7. Frick M. The Tuberculosis Vaccines Pipeline: A New Path to the Same Destination? [Интернет]. 2015 Pipeline Report. HIV, HCV, and TB. London, NY: HIV i-Base/Treatment Action Group; July 2015 [дата обращения: 9 октября 2017 г.]. Доступно по: <http://www.pipeline-report.org/2015/tb-vaccines>
8. Tkachuk AP, Gushchin VA, Potapov VD, Demidenko AV, Lunin VG, Gintsburg AL. Multi-subunit BCG booster vaccine GamTBvac: Assessment of immunogenicity and protective efficacy in murine and guinea pig TB models. *PLoS One*. 2017; 12 (4): e0176784. DOI<sup>^</sup>: 10.1371/journal.pone.0176784
9. Evaluation of the Safety and Immunogenicity of the Recombinant Subunit Vaccine "GamTBvac" Against the Tuberculosis [Интернет]. U. S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03255278 [дата обращения: 9 октября 2017 г.]. Доступно по: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03255278>
10. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guideline for good clinical practice E6(R1). Current Step 4 version. Dated 10 June 1996 [Интернет]; [дата обращения: 9 октября 2017 г.]: [59 с.]. Доступно по: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6_R1_Guideline.pdf)
11. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 03.07.2016) «Об обращении лекарственных средств».
12. ГОСТ 33044-2014 Принципы надлежащей лабораторной практики. Межгосударственный стандарт. Дата введения: 1 августа 2015 г.
13. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики».
14. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A, et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. *MMWR Recomm Rep*. 2005 Dec 16; 54 (RR-15): 49–55.
15. QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Package Insert. Rev. 04. Hilden: QIAGEN GmbH; Feb 2016.
16. Мелихов О. Г., Атаршиков Д. С. Нежелательные явления в клинических исследованиях лекарственных средств. *Кач. клин. практик*. 2003; (2): 11–6.
17. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, Malin AS, Pathan AA, Andersen P, et al. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 6; 95 (1): 270–5. PubMed PMID: 9419365.
18. Dewan PK, Grinsdale J, Liska S, Wong E, Fallstad R, Kawamura LM. Feasibility, acceptability, and cost of tuberculosis testing by whole-blood interferon-gamma assay. *BMC Infect Dis*. 2006 Mar 15; 6: 47. PubMed PMID: 16539718.
19. Плеханова М. А., Аксенова В. А., Ткачук А. П., Пацула Ю. И., Кривцова Л. А., Коломеец А. Н. Оценка специфических антигенов ранней стадии туберкулезной инфекции у детей. *Туберк. и болезни легких*. 2017; 95 (1): 27–33.
20. Luminex. The xMAP Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology. 3rd ed. [Интернет]; [дата обращения: 5 мая 2017 г.]. Доступно по: <http://info.luminexcorp.com/en-us/download-the-xmap-cookbook>
21. Luabeya AKK, Kagina BMN, Tameris MD, Geldenhuys H, Hoff ST, Shi Z, et al. First-in-human trial of the post-exposure tuberculosis vaccine H56:IC31 in Mycobacterium tuberculosis infected and non-infected healthy adults. *Vaccine*. 2015 Aug 7; 33 (33): 4130–40. DOI<sup>^</sup>: 10.1016/j.vaccine.2015.06.051
22. Geldenhuys H, Mearns H, Miles DJC, Tameris M, Hokey D, Shi Z, et al. The tuberculosis vaccine H4:IC31 is safe and induces a persistent polyfunctional CD4 T cell response in South African adults: A randomized controlled trial. *Vaccine*. 2015 Jul 9; 33 (30): 3592–9. DOI<sup>^</sup>: 10.1016/j.vaccine.2015.05.036
23. Reither K, Katsoulis L, Beattie T, Gardiner N, Lenz N, Said K, et al. Safety and immunogenicity of H1/IC31H<sup>®</sup>, an adjuvanted TB subunit vaccine, in HIV-infected adults with CD4+ lymphocyte counts greater than 350 cells/mm<sup>3</sup>: A phase II, multi-centre, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *PLoS One*. 2014; 9 (12): e114602. DOI<sup>^</sup>: 10.1371/journal.pone.0114602
24. Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, Ghebremichael M, Yu WH, Grace PS, et al. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. *Cell*. 2016 Oct 6; 167 (2): 433–43.e14. DOI<sup>^</sup>: 10.1016/j.cell.2016.08.072

## References

1. Kaufmann SHE, Weiner J, von Reyn CF. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *Int J Infect Dis*. 2017 Mar; 56: 263–7. DOI<sup>^</sup>: 10.1016/j.ijid.2016.10.018
2. Nguipdop-Djomo P, Haldal E, Rodrigues LC, Abubakar I, Mangtani P. Duration of BCG protection against tuberculosis and change in effectiveness with time since vaccination in Norway: A retrospective



- population-based cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2016 Feb; 16 (2): 219–26. DOI<sup>^</sup>: 10.1016/S1473-3099(15)00400-4
3. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2016.* 21th ed. Geneva: World Health Organization; 2016. 214 p.
  4. Glaziou P, Sismanidis C, Floyd K, Raviglione M. *Global Epidemiology of Tuberculosis.* Cold Spring Harb Perspect Med. 2015 Feb; 5 (2): a017798. DOI<sup>^</sup>: 10.1101/cshperspect.a017798
  5. O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2016 godu. National Report. Moscow: Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор); 2017. 220 p. Russian.
  6. Karp CL, Wilson CB, Stuart LM. Tuberculosis vaccines: Barriers and prospects on the quest for a transformative tool. *Immunol Rev.* 2015 Mar; 264 (1): 363–81. DOI<sup>^</sup>: 10.1111/immr.12270. PubMed PMID: 25703572.
  7. Frick M. The Tuberculosis Vaccines Pipeline: A New Path to the Same Destination? [Internet]. 2015 Pipeline Report. HIV, HCV, and TB. London, NY: HIV i-Base/Treatment Action Group; July 2015 [cited 2017 Oct 9]. Available from: <http://www.pipeline-report.org/2015/tb-vaccines>
  8. Tkachuk AP, Gushchin VA, Potapov VD, Demidenko AV, Lunin VG, Gintsburg AL. Multi-subunit BCG booster vaccine GamTBvac: Assessment of immunogenicity and protective efficacy in murine and guinea pig TB models. *PLoS One.* 2017; 12 (4): e0176784. DOI<sup>^</sup>: 10.1371/journal.pone.0176784
  9. Evaluation of the Safety and Immunogenicity of the Recombinant Subunit Vaccine "GamTBvac" Against the Tuberculosis [Internet]. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03255278 [cited 2017 Oct 9]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03255278>
  10. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guideline for good clinical practice E6(R1). Current Step 4 version. Dated 10 June 1996 [Internet]; [cited 2017 Oct 9]; [59 p.]. Available from: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6_R1_Guideline.pdf)
  11. Federal'nyy zakon ot 12.04.2010 № 61-FZ (red. ot 03.07.2016) «Ob obrashchenii lekarstvennykh sredstv». Federal law of the Russian Federation. Russian.
  12. GOST 33044-2014 Printsipy nadlezhashchey laboratornoy praktiki. Mezghosudarstvennyy standart. Data vvedeniya: 1 avgusta 2015 g. State Standard. Identical to OECD Guide 1:1998 OECD Principles of good laboratory practice. Russian.
  13. Prikaz Ministerstva zdравookhraneniya RF ot 1 aprelya 2016 g. № 200n «Ob utverzhdenii pravil nadlezhashchey klinicheskoy praktiki». Order of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Russian.
  14. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A, et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. *MMWR Recomm Rep.* 2005 Dec 16; 54 (RR-15): 49–55.
  15. QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Package Insert. Rev. 04. Hilden: QIAGEN GmbH; Feb 2016.
  16. Melikhov OG, Atarshchikov DS. Nezhelatel'nye yavleniya v klinicheskikh issledovaniyakh lekarstvennykh sredstv. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika.* 2003; (2): 11–6. Russian.
  17. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, Malin AS, Pathan AA, Andersen P, et al. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jan 6; 95 (1): 270–5. PubMed PMID: 9419365.
  18. Dewan PK, Grinsdale J, Liska S, Wong E, Fallstad R, Kawamura LM. Feasibility, acceptability, and cost of tuberculosis testing by whole-blood interferon-gamma assay. *BMC Infect Dis.* 2006 Mar 15; 6: 47. PubMed PMID: 16539718.
  19. Plekhanova MA, Aksenova VA, Tkachuk AP, Patsula YI, Krivtsova LA, Kolomeets AN. Evaluation of specific antigens at the early stage of tuberculous infection in children. *Tuberkulez i bolezni legkikh.* 2017; 95 (1): 27–33. Russian.
  20. Luminex. The xMAP Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology. 3rd ed. [Internet]; [cited 2017 May 5]. Available from: <http://info.luminexcorp.com/en-us/download-the-xmap-cookbook>
  21. Luabeya AKK, Kagina BMN, Tameris MD, Geldenhuys H, Hoff ST, Shi Z, et al. First-in-human trial of the post-exposure tuberculosis vaccine H56:IC31 in Mycobacterium tuberculosis infected and non-infected healthy adults. *Vaccine.* 2015 Aug 7; 33 (33): 4130–40. DOI<sup>^</sup>: 10.1016/j.vaccine.2015.06.051
  22. Geldenhuys H, Mearns H, Miles DJC, Tameris M, Hokey D, Shi Z, et al. The tuberculosis vaccine H4:IC31 is safe and induces a persistent polyfunctional CD4 T cell response in South African adults: A randomized controlled trial. *Vaccine.* 2015 Jul 9; 33 (30): 3592–9. DOI<sup>^</sup>: 10.1016/j.vaccine.2015.05.036
  23. Reither K, Katsoulis L, Beattie T, Gardiner N, Lenz N, Said K, et al. Safety and immunogenicity of H1/IC31H<sup>®</sup>, an adjuvanted TB subunit vaccine, in HIV-infected adults with CD4+ lymphocyte counts greater than 350 cells/mm<sup>3</sup>: A phase II, multi-centre, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *PLoS One.* 2014; 9 (12): e114602. DOI<sup>^</sup>: 10.1371/journal.pone.0114602
  24. Lu LL, Chung AW, Rosebrock TR, Ghebremichael M, Yu WH, Grace PS, et al. A Functional Role for Antibodies in Tuberculosis. *Cell.* 2016 Oct 6; 167 (2): 433–43.e14. DOI<sup>^</sup>: 10.1016/j.cell.2016.08.072