

## ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ НОВОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЕЗА

© 2018 г. М. Е. Михеева\*, Г. В. Александров, Е. А. Варюшина, М. С. Захаров, А. С. Кирьянова, О. Э. Хуттунен, А. Б. Румянцева, И. Д. Митрофанов, И. В. Бендт, А. Э. Полянская, А. Б. Чистякова, Н. А. Артемова, А. С. Симбирцев

\*E-mail: m.e.miheeva@hpb.spb.ru

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»  
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Коллективом ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России разработана новая генно-инженерная вакцина на основе рекомбинантных белков микобактерий и флагеллина, потенциальная эффективность которой была показана ранее. Для демонстрации безопасности вакцины в экспериментах на лабораторных животных разных видов были изучены острая и субхроническая токсичность, пирогенность, иммунотоксичность и аллергенность вакцины. Показано, что в дозах, значительно превышающих предполагаемую терапевтическую дозу для человека, разработанная вакцина не токсична и обладает иммуностимулирующим действием.

**Ключевые слова:** туберкулез, генно-инженерная вакцина, доклинические исследования, токсичность, аллергенность, иммунотоксичность

DOI: 10.31857/S102872210002645-4

### Авторы:

**Михеева М. Е.**, биолог лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Александров Г. В.**, к.б.н., зам. начальника лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Варюшина Е. А.**, д.б.н., в. н. с. лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Захаров М. С.**, начальник лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Кирьянова А. С.**, науч.сотр. лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Хуттунен О. Э.**, м.н.с. лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Румянцева А. Б.**, науч.сотр. лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Митрофанов И. Д.**, м.н.с. лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Бендт И. В.**, ст.н.с. лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Полянская А. Э.**, м.н.с. лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Чистякова А. Б.**, м.н.с. лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Артемова Н. А.**, ст. биолог лаборатории экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Симбирцев А. С.**, д.м.н., профессор, член-корр. РАН, научный руководитель института, ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

**Введение.** Туберкулез является лидирующей инфекцией по количеству смертельных исходов, при этом, по состоянию на 2015 год, в мире было зафиксировано 10,4 миллиона новых случаев данного заболевания [1]. Возбудителем туберкулеза является бактерия *Mycobacterium tuberculosis*, поражающая преимущественно легкие, однако возможно развитие заболевания и в других органах. Для профилактики туберкулеза путем вакцинации в данный момент используется только одна вакцина – БЦЖ (*Bacillus Calmette – Guerin*, VCG). Основными недостатками БЦЖ являются поствакцинальные осложнения, развивающиеся из-за того, что основой вакцины является штамм ослабленной живой туберкулезной палочки *Mycobacterium bovis*, а также неэффективность вакцин. Одним из возможных способов решения данных проблем является создание новой генно-инженерной вакцины, иммуногенность которой будет повышена за счет включения в ее состав адьюванта, а вероятность развития осложнений снижена благодаря отсутствию в составе живой микобактерии.

Коллективом ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России [2] в рамках ФЦП «Фарма-2020» разработана вакцина, удовлетворяющая данным требованиям. В состав препарата вошли реком-

бинантные белки TB10.4 и Ag85b, являющиеся антигенами *M. tuberculosis*, а также рекомбинантный белок флагеллин, созданный на основе белка *S. typhimurium*, в качестве адъюванта. После экспериментальной демонстрации высокой иммуногенности полученной вакцины, была поставлена задача изучить ее безопасность для дальнейших клинических испытаний.

Таким образом, целью данной работы стало изучение общей токсичности, аллергенности и иммунотоксичности разработанной вакцины.

**Материалы и методы.** В данной работе исследовали препарат «Вакцина против туберкулеза, рекомбинантная», раствор для внутримышечного введения. Одна ампула препарата содержит: активный компонент – рекомбинантные белки TB10.4 *M. tuberculosis* 10 мкг и Ag85b *M. tuberculosis* 10 мкг; гибридный рекомбинантный белок на основе FliC *S. typhimurium* 10 мкг; вспомогательные компоненты – маннитол (ЕР) 25,0 мг; натрия сукцинат (ЕР/USP) 0,36 мг; полисорбат 20 (ЕР) 0,05 мг; вода для инъекций (ФС.2.2.0019.15) до 0,5 мл. Взрослая человеческая терапевтическая доза (ЧТД) вакцины при внутримышечном введении составляет 0,5 мл, детская – 0,25 мл.

Оценку острой токсичности выполняли на половозрелых крысах, мышах и кроликах обоего пола, а также на неполовозрелых крысятах-сосунках. Препарат вводили однократно внутримышечно (в/м) или внутривенно (в/в) мышам до 5 человеческих терапевтических доз (5 ЧТД), крысам до 20 ЧТД, кроликам 30 ЧТД на животное. Крысятам-сосункам вводили до 5 ЧТД внутримышечно или внутрибрюшинно (как аналог внутривенного введения). После 14 суток наблюдения все животные были подвергнуты эвтаназии и патоморфологическому исследованию.

Оценку субхронической токсичности выполняли на половозрелых крысах и кроликах обоего пола, а также на крысятах-сосунках возрастом 7 дней. Препарат вводили внутримышечно в течение 30 дней – крысам до 3 ЧТД, кроликам до 6 ЧТД, крысятам до 1,5 ЧТД. В конце эксперимента проводили ряд физиологических исследований, а после эвтаназии выполняли биохимическое, патоморфологическое и патогистологическое исследования.

Оценку возможной аллергенной активности препарата проводили в реакции общей анафилаксии на морских свинках, реакции активной кожной анафилаксии и реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) – на мышах. Иммунотоксическое действие препарата оценивали у животных, вакцинированных

однократно 1 и 2 ЧТД. Изучали образование антителообразующих клеток (АОК) в селезенке в ответ на иммунизацию эритроцитами барана (ЭБ), а также развитие реакции ГЗТ в ответ на введение ЭБ и фагоцитоз опсонизированных дрожжей перитонеальными макрофагами, полученными от вакцинированных животных.

**Результаты.** Изучение острой токсичности вакцины от туберкулеза на половозрелых и неполовозрелых грызунах при внутривенном (внутрибрюшинном у крысят) и внутримышечном введении показало, что дозы препарата, в сотни и тысячи раз превосходящие человеческую дозу, абсолютно не токсичны для теплокровных лабораторных животных. Значительных отклонений в температуре и массе тела, потреблении пищи и воды, патоморфологической картине и массовых коэффициентах органов между контрольными и опытными группами не наблюдалось.

В экспериментах по изучению субхронической токсичности было показано, что дозы вакцины, значительно превышающие человеческую (в тысячи раз для половозрелых крыс и в сотни раз для крысят-сосунков и кроликов), не токсичны при ежедневном введении в течение 30 дней лабораторным животным. Анализ целого ряда физиологических параметров, гематологическое, биохимическое, патоморфологическое и патогистологическое исследования не выявили различий между экспериментальными и контрольными группами.

Изучение аллергизирующего действия вакцины показало, что препарат вызывает выраженную анафилактическую реакцию у сенсibilизированных животных, гиперчувствительность замедленного типа в ответ на введение препарата не развивается. Данный эффект характерен для целого ряда пептидных препаратов и является предостережением, но не противопоказанием для клинического применения [3]. Изучение развития иммунного ответа у вакцинированных животных показало иммуномодулирующий эффект препарата, выразившийся в неспецифическом усилении гуморального и ослаблении клеточного иммунного ответа к эритроцитам барана, введенным животным в один день с вакциной. Введение ЭБ спустя 10 дней после вакцинации показало восстановление нормальной интенсивности клеточного иммунного ответа, иммуномодулирующий эффект не наблюдался. Фагоцитарная функция перитонеальных макрофагов под действием вакцины не изменялась.

**Обсуждение/выводы.** На основании полученных данных можно заключить, что по всем

изученным параметрам разработанная вакцина является малотоксичным и безопасным препаратом, который после проведения дальнейших испытаний может внести значительный вклад в борьбу с туберкулезной инфекцией.

Исследование выполнено в рамках государственного контракта с Минобрнауки РФ № 14. N08.12.1024 от 01.06.2015 г. по теме: «Доклинические исследования кандидатной вакцины против туберкулеза на основе рекомбинантных белков TB10.4 и Ag85B *Mycobacterium tuberculosis*».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Global Tuberculosis Report, 2016, WHO.
2. Симбирцев А. С., Духовлинов И. В., Добровольская О. А., Федорова Е. А., Вакцина против туберкулеза, патент № 2647831, дата приоритета 15.03.2017, дата публикации 19.03.2018. [Simbirtsev A. S., Dukhovlinov I. V., Dobrovolskaya O. A., Fedorova E. A. Tuberculosis Vaccine. Patent 2647831, Priority Date 15.03.2017, Published 19.03.2018].
3. ГОСТ Р 56699–2015. Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования безопасности биотехнологических лекарственных препаратов. Общие рекомендации. Москва, Стандартинформ, 2016. [GOST R56699–2015. Medicinal Products for Human. Preclinical Safety Studies of Biotech Medicinal Products. General Recommendations. Moskva. Standartinform, 2016].

## A NEW RECOMBINANT TUBERCULOSIS VACCINE SAFETY STUDIES

© 2018 М. Е. Mikheeva\*, G. V. Alexandrov, E. A. Varyushina, M. S. Zakharov, A. S. Kiryanova, O. E. Khuttunen, A. B. Rumyantseva, I. D. Mitrofanov, I. V. Bendt, A. E. Polyanskaya, A. B. Chistyakova, N. A. Artyomova, A. S. Simbirtsev

\*E-mail: m.e.miheeva@hpb.spb.ru

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia

A new genetically engineered vaccine based on recombinant mycobacterium proteins and flagellin has been developed by SRIHPB research team. Vaccine potential efficacy was demonstrated earlier. The safety of the vaccine was confirmed in *in vivo* experiments using animals of different types. There were assessed the acute and subchronic activities, pyrogenic effect, immunotoxicity and possible allergenic effect. The doses of vaccine far exceeding the human therapeutic vaccine dose were demonstrated to be non-toxic and to elicit the immune response.

*Key words:* tuberculosis, genetically engineered vaccine, preclinical studies, toxicity, allergenic effect, immunotoxicity

### Authors:

**Mikheeva M. E.**, ✉ biologist, Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia; E-mail: m.e.miheeva@hpb.spb.ru;

**Aleksandrov G. V.**, Ph.D., Deputy Head of Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Varyushina E. A.**, DrSci, Leading Researcher, Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Zakharov M. S.**, Head of Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Kiryanova A. S.**, Researcher, Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Khuttunen O. E.**, Junior Researcher, Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Rumyantseva A. B.**, Researcher, Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Mitrofanov I. D.**, Junior Researcher, Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Bendt I. V.**, Senior Researcher, Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Polyanskaya A. E.**, Junior Researcher, Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Chistyakova A. B.**, Junior Researcher, Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Artemova N. A.**, Senior Biologist, Laboratory of Experimental Pharmacology and Toxicology State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia;

**Simbirtsev A. S.**, DrSci, Professor, Associate Member of RAS, Institute Research Advisor, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, Russia.