



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 112067

(13) C2

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 39/04 (2006.01)

A61K 39/05 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 08660

(22) Дата подання заявки: 21.12.2011

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: 25.07.2016(31) Номер попередньої
заявки відповідно до
Парижської конвенції: 61/425,442(32) Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Парижської конвенції: 21.12.2010(33) Код держави-учасниці
Парижської конвенції,
до якої подано
попередню заявку: US(41) Публікація відомостей
про заявку: 25.11.2013, Бюл. № 22(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: 25.07.2016, Бюл. № 14(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ: РСТ/EP2011/073609,
21.12.2011

(72) Винахідник(и):

Дезель Крістіана (DE),
Кауфман Штефан Х.Е. (DE),
Бандерман Зільке (DE),
Гроде Леандер (DE)

(73) Власник(и):

МАКС-ПЛАНК-ГЕЗЕЛЬШАФТ ЦУР
ФОРДЕРУНГ ДЕР ВІССЕНШАФТЕН
АЙ.ЕФ.,

Hofgartenstrasse 8, 80539 München,

Germany (DE),

ВАКЦІНЕ ПРОЕКТ МЕНАГЕМЕНТ ГМБХ,

Mellendorfer Strasse 9, 30625 Hannover,

Germany (DE)

(74) Представник:

Шляховецький Ілля Олександрович,
реєстр. №190(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:Kolls J. K. Th17 cells in mucosal immunity and
tissue inflammation // Seminars in
immunopathology. – Springer-Verlag, 2010. –
Т. 32. – №. 1. – С. 1-2.de Cassan S. C. et al. Investigating the
induction of vaccine-induced Th17 and
regulatory T cells in healthy, Mycobacterium
bovis BCG-immunized adults vaccinated with
a new tuberculosis vaccine, MVA85A // Clinical
and Vaccine Immunology. – 2010. – Т. 17. –
№. 7. – С. 1066-1073.Lin Y., Slight S. R., Khader S. A. Th17
cytokines and vaccine-induced immunity //
Seminars in immunopathology. – Springer-
Verlag, 2010. – Т. 32. – №. 1. – С. 79-90.Desel C. et al. Recombinant BCG ?ureC hly+
induces superior protection over parental BCG
by stimulating a balanced combination of type
1 and type 17 cytokine responses // Journal of
Infectious Diseases. – 2011. – vol. 204. – №.
10. – С. 1573-1584.

(54) ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АНТИМІКОБАКТЕРІАЛЬНОЇ ВАКЦИНАЦІЇ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу визначення ефективності рекомбінантної мікобактеріальної живої вакцини, зокрема протитуберкульозної вакцини, а також застосування набору реагентів для використання в способі.

UA 112067 C2

Цей винахід стосується способів та реагентів для визначення ефективності вакцини, зокрема протитуберкульозної вакцини.

Щороку від туберкульозу (ТВ) помирає до 2 мільйонів людей [1]. Єдиною доступною протитуберкульозною вакциною є вакцинний штам *Mycobacterium bovis* (бацила Кальметта-Герена (BCG)), яка була використана в організмі людини в перший раз в 1921 році [2]. До теперішнього часу було введено 4 мільярди доз БЦЖ, що робить її найбільш широко застосовуваною вакциною для людини в усьому світі [3]. Тим не менш, ми все ще далекі від досягнення викорінення туберкульозу. Вакцинація БЦЖ запобігає захворюванню немовлят на туберкульозний менінгіт та міліарний туберкульоз [4]. Проте захист від інших форм туберкульозу, зокрема, туберкульозу легень у підлітків і дорослих, є неповним, що підкреслюється мета-аналізом, який показує ефективність захисту у дорослих на рівні 0-80% [5]. Таким чином, вкрай необхідними є нові протитуберкульозні вакцини. Наразі, нові стратегії вакцинації проти туберкульозу в клінічних випробуваннях передбачають використання рекомбінантної БЦЖ, що замінює канонічну БЦЖ, та субодиночних вакцин і вакцин на основі вірусних векторів, що не розмножуються, для бустингу праймування БЦЖ [6, 7].

Ідентифікування імунологічних механізмів, що лежать в основі захисту, може полегшити раціональну розробку нових стратегій вакцинації для профілактики туберкульозу. Більше того, ця стратегія може виявити біомаркери, що є показовими для захисного імунітету, які могли б виявити сурогатні кінцеві точки клінічного результату в клінічних випробуваннях ефективності протитуберкульозної вакцини і тим самим знизити їх тривалість, а також полегшити випробування більшої кількості вакцин-кандидатів у паралельних випробуваннях. Для визначення таких біомаркерів були розпочаті спостережні дослідження із зосередженням уваги на новоінфікованих здорових контактерах із хворими на туберкульоз і на БЦЖ-вакцинованих немовлятах [8]. Незважаючи на широкомасштабні дослідження імунної реакції проти туберкульозу, головні елементи захисної імунологічної пам'яті досі залишаються нез'ясованими. Після вакцинації БЦЖ антиген-специфічні CD4 Т-клітини пам'яті важко виявити унаслідок малої кількості імунодомінантних антигенів. Наразі, основу найбільш широко застосовуваних біомаркерів становить підвищена частота CD4 Т-клітин, що продукують IFN- γ . З'являється все більше даних, що ставлять під сумнів значення IFN- γ як кореляту захисту при туберкульозі [9, 10]. Безсумнівно, IFN- γ відіграє важливу роль у захисті від МТВ (мікобактерії туберкульозу) [11], але визначення лише IFN- γ більше не може вважатись надійним маркером захисного імунітету.

Опис рекомбінантного штаму БЦЖ, що експресує домен виходу з фаголізосоми, наведений у WO99/101496, вміст якої включений до цього опису шляхом посилання. Згаданий домен виходу з фаголізосоми надає штаму можливості уникнення фагосоми інфікованих клітин-хазяїв шляхом перфорації мембрани фагосоми. Для того, щоб забезпечити кислий діапазон рН для фагосом з метою оптимальної активності уникнення фаголізосом, був розроблений рекомбінантний штам, дефіцитний з уреази. Цей штам є розкритим в заявці WO2004/094469, зміст якої включений до цього опису.

Рекомбінантний штам Δ ureC Hly⁺ rBCG (rBCG), що експресує мембрано-перфоровальний лістеріолізін (Hly) *Listeria monocytogenes* і є позбавленим уреази С, індукуює чудовий захист від аерогенного інфікування МТВ порівняно з батьківським BCG (pBCG) в доклінічній моделі [12]. Ця генно-інженерна вакцинна конструкція успішно довела безпечність і імуногенність у фазі І клінічних випробувань (заявка на патент США № 61/384,375, зміст якої включений до цього опису шляхом посилання).

У цьому дослідженні показано, що rBCG і pBCG індукують явно виражену Th1-імунову відповідь, тоді як лише rBCG додатково викликає глибоку Th17-відповідь. Спостерігався також більш ранній рекрутинг антиген-специфічних Т-лімфоцитів до легень при МТВ-інфікуванні rBCG-вакцинованих мишей. Ці Т-клітини продукували велику кількість Th1 цитокінів після повторної стимуляції. Набагато краща захисна ефективність rBCG явно залежала від IL-17. Підвищене продукування IL-17 після rBCG-, але не pBCG-вакцинації, було також виявлено у здорових волонтерів на фазі І клінічних випробувань. Результати, одержані винахідниками, визначають загальний імунологічний шлях як маркер для поліпшених стратегій вакцинації проти туберкульозу, який також можна досліджувати субодиночними вакцинами-кандидатами.

Предметом цього винаходу є спосіб визначення ефективності вакцини, який включає визначення Th17-імуної відповіді у вакцинованого суб'єкта, де присутність Th17-імуної відповіді є показовою для захисного імунітету у згаданого суб'єкта.

Іншим аспектом цього винаходу є набір реагентів для визначення ефективності вакцини, який включає в себе щонайменше один реагент для виявлення Th17-імуної відповіді.

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, згаданою вакциною є жива вакцина, зокрема клітина *Mycobacterium*. За варіантом здійснення цього винаходу, якому

віддають ще більшу перевагу, згаданою вакциною є рекомбінантна клітина *Mycobacterium*, яка містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка кодує гібридний поліпептид, що містить (а) домен, здатний викликати імунну відповідь, та (b) домен виходу з фаголізосоми. Згаданий домен, здатний викликати імунну відповідь, за варіантом, якому віддається перевага, являє собою імуногенний пептид або поліпептид патогену чи його імуногенний фрагмент. За іншим варіантом здійснення цього винаходу згадана вакцина являє собою субодиночну вакцину, тобто вакцину, яка містить очищений антиген патогену або його імуногенний фрагмент, зокрема рекомбінантний антиген або його імуногенний фрагмент. За ще одним варіантом здійснення цього винаходу згаданою вакциною є вакцина, основу якої становить інактивована не піддана обробці клітина патогену або клітинна фракція.

Згаданою клітиною *Mycobacterium* за варіантом, якому віддається перевага, є клітина *M. bovis*, клітина *M. tuberculosis*, зокрема атенуйована клітина *M. tuberculosis* або інших *Mycobacteria*, наприклад, *M. microti*, *M. smegmatis*, *M. canettii*, *M. marinum* або *M. fortuitum*. За варіантом, якому віддається більша перевага, згадана клітина являє собою рекомбінантну клітину *M. bovis* (BCG), зокрема, рекомбінантну клітину *M. bovis* штаму Danish підтипу Prague [43]. За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається особлива перевага, згадана вакцина являє собою рекомбінантну клітину *Mycobacterium*, дефіцитну з уреаз. За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається особлива перевага, послідовність *ureC* клітини *Mycobacterium* є інактивованою ($\Delta UreC$), наприклад, шляхом конструювання вектора-самогубця, який містить ген *ureC*, зруйнований геном селекційного маркера, трансформування клітини-мішені згаданим вектором і скринінгу для віднаходження позитивних на селекційний маркер клітин, які мають негативний з уреаз фенотип. За варіантом, якому віддається найбільша перевага, згадана клітина являє собою рекомбінантну клітину BCG штаму Danish підтипу Prague, яка характеризується як $rBCG \Delta UreC::Hly^{+}::Hyg^{+}$.

Згаданий домен, здатний викликати імунну відповідь, за варіантом, якому віддається перевага, вибраний з-посеред імуногенних пептидів або поліпептидів від *M. bovis* або *M. tuberculosis* чи їх імуногенних фрагментів, які мають довжину щонайменше 6 амінокислот, за варіантом, якому віддається перевага, щонайменше 8 амінокислот, за варіантом, якому віддається найбільша перевага, щонайменше 9 амінокислот і, наприклад, до 20 амінокислот. Конкретними прикладами прийнятих антигенів є Ag85B (p30) від *M. tuberculosis*, Ag85B (α -антиген) від *M. bovis* БЦЖ, Ag85A від *M. tuberculosis* та ESAT-6 від *M. tuberculosis* та їх фрагменти.

Згадана вакцина за варіантом, якому віддається перевага, являє собою вакцину проти мікобактеріальних інфекційних захворювань, зокрема, легеневих мікобактеріальних інфекційних захворювань, конкретніше, туберкульозу.

Відповідно до способу за цим винаходом визначають Th17-імунну відповідь у вакцинованого суб'єкта. Згаданим суб'єктом за варіантом, якому віддають перевагу, є ссавець, наприклад, людина. Визначення за варіантом, якому віддають перевагу, здійснюють на біологічному зразку, який одержують від згаданого суб'єкта, при цьому цей зразок містить імунокомпетентні клітини, зокрема Т-клітини та/або НК-клітини, конкретніше, антиген-специфічні Т-клітини, наприклад, CD4 Т-клітини. Згаданим зразком може бути біологічна рідина організму або зразок тканини, наприклад, зразок крові, сироватки або плазми чи зразок легень або селезінки. Способи збирання зразків є добре відомими у цій галузі.

Спосіб за цим винаходом вимагає визначення ТМ7-імунної відповіді. З цією метою перевага віддається повторному стимулюванню імуногеном імунних клітин, присутніх у зразку суб'єкта, призначеному для аналізу, та визначенню експресії цитокінів згаданими клітинами. Клітинами, призначеними для аналізу, за варіантом, якому віддається перевага, є антиген-специфічні Т-клітини, за варіантом, якому віддається більша перевага, CD4 Т-клітини. Згаданий імуноген для повторного стимулювання відповідає імуногену, присутньому у вакцині (ефективність якого має бути визначена). Імуноген може бути присутнім або у формі, ідентичній формі, присутній у вакцині, або в іншій формі. Наприклад, у разі, коли вакцина містить імуногенний поліпептид, імуноген на етапі повторного стимулювання може включати імуногенний фрагмент згаданого поліпептиду або навпаки. За варіантом, якому віддається перевага, імуноген, який застосовують на етапі повторного стимулювання, являє собою очищений поліпептид або пептид. Для того, щоб перевірити ефективність протитуберкульозних вакцин, зокрема, живої протитуберкульозної вакцини, як описано вище, згаданим імуногеном, за варіантом, якому віддається перевага, може бути мікобактеріальний антиген, вибраний, наприклад, з-посеред PPD (Очищений протеїновий дериват), який являє собою гліцериновий екстракт мікобактерій, або Ag85A і Ag85B, а також інших мікобактеріальних антигенів та їх імуногенних фрагментів (наприклад, як описано вище).

Визначення Th17-відповіді за цим винаходом може включати в себе визначення клітин, пов'язаних із Th17-відповіддю, наприклад, клітин, що продукують IL-17, за допомогою поверхневих маркерів і цитокінів, присутніх в та/або секретованих згаданими клітинами. Прикладами поверхневих маркерів є CD4, CD8, EL-23R, CCR4 та/або CCR6. Прикладами цитокінів, присутніх в та/або секретованих такими клітинами, є IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- γ та їх комбінації. За варіантом, якому віддається перевага, згаданим цитокіном є IL-17. Такі клітини можуть бути визначені цитологічними методами, наприклад, методом сортування клітин із використанням імунологічних реагентів виявлення, таких як антитіла, специфічні до поверхнево-клітинних маркерів та/або цитокіни, які можуть нести маркування, наприклад, флуоресцентну групу.

За варіантом, якому віддається більша перевага, клітинами, пов'язаними з Th17-імуною відповіддю є, наприклад, CD4 Т-клітини, які продукують і, можливо, секретують IL-17.

За іншим варіантом здійснення цього винаходу визначення Th17-імуною відповіді включає в себе визначення цитокіну, який секретується клітинами, пов'язаними з Th17-імуною відповіддю, наприклад, IL-17. Згаданий цитокін може бути визначений імунологічними методами з використанням відповідних антитіл, наприклад, антитіл проти IL-17.

За способом за цим винаходом Th17-імуною відповідь визначають у відповідний час після вакцинації. Наприклад, імуною відповідь можна визначати через 20-50 днів, зокрема через 25-35 днів після вакцинації.

Цей винахід також стосується набору реагентів для визначення ефективності вакцини, зокрема для застосування за способом, як описано вище. Згаданий набір реактивів включає в себе імуноген, прийнятний для повторної стимуляції імунокомпетентних клітин, присутніх у зразку від вакцинованого суб'єкта. Окрім того, набір реактивів включає в себе щонайменше один реагент, прийнятний для виявлення маркера Th17-імуною відповіді, як описано вище. Згадані реагенти можуть, наприклад, бути вибрані з-посеред реактивів для цитологічного та/або імунологічного виявлення, наприклад, антитіл проти клітинних маркерів, характерних для клітин, пов'язаних з Th17-імуною відповіддю та/або імунологічного реагенту, специфічного для цитокінів, пов'язаних з Th17-імуною відповіддю, зокрема IL-17 та/або IL-22. Згадані ділянки для виявлення можуть нести виявлювані групи, наприклад, групи флуоресцентного мічення.

Нижче цей винахід докладніше описаний за допомогою наведених нижче Фігур і Прикладів.

Підписи до Фігур

Фіг. 1: МТВ-навантаження у мишей дикого типу. Підшкірна імунізація захищає від інфікування МТВ впродовж 90 днів після імунізації. (А). Бактеріальні навантаження на вакциновані і невакциновані групи на 7 день після інфікування. (В) є порівнянними. Визначення КУО (CFU) в легенях і селезінці після аерозольного інфікування у дозі 400 КУО МТВ. Серцева частка легень (приблизно 71/10 цілого органа) або половина селезінки була гомогенізована; решта матеріалу була використана для *in vitro* рестимуляційних аналізів. Статистичну значущість визначали за критерієм Манна-Уїтні з двосторонніми значеннями P . *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$. Репрезентативні дані трьох експериментів з аналогічними результатами.

Фіг. 2: Поліпшена індукція цитокінів після rBCG-вакцинації у зіставленні з rBCG-вакцинацією. Відповіді в клітинах легень (А) і селезінки (В) через 83 дні після підшкірної вакцинації rBCG або rBCG. У цілому $2,5 \times 10^5$ клітин (легені) або 2×10^6 клітин (селезінка) повторно стимулювали PPD протягом 20 год, і супернатанти аналізували за допомогою мультиплексного аналізу. Концентрації цитокінів зображені у вигляді середніх значень \pm SEM (середня квадратична помилка середнього) чотирьох незалежних експериментів з трьома повтореннями кожного. Фонове продукування цитокінів контрольних середовищ віднімали. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою ANOVA (дисперсійний аналіз) і критерію множинного порівняння Бонферроні. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Фіг. 3: rBCG-вакцинація прискорює рекрутинг антиген-специфічних Т-клітин до легень після аерозольного інфікування МТВ. Секреція цитокінів клітинами легень через 7 днів після аерозольного інфікування 200-400 КУО МТВ. У цілому 2×10^5 клітин стимулювали PPD протягом 20 год, і супернатанти аналізували за допомогою мультиплексного аналізу. (А). Концентрації цитокінів зображені у вигляді середніх значень \pm SEM двох незалежних експериментів з трьома повтореннями кожного. Фонове продукування цитокінів контрольних середовищ віднімали. Клітини, повторно стимульовані PPD протягом 6 год у присутності брэфелдину А, аналізували методом багатокольорової проточної цитометрії (В). Частота CD4 Т-клітин, що відповідають, зображена у вигляді середніх значень \pm SEM трьох незалежних експериментів з трьома повтореннями кожного. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою ANOVA і критерію множинного порівняння Бонферроні. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

Фіг. 4: rBCG-вакцинація збільшує PPD-специфічні відповіді в селезінці після аерозольного інфікування MTB. Секреція цитокінів клітинами селезінки через 7 днів після аерозольного інфікування 200-400 КУО MTB. У цілому 2×10^6 клітин повторно стимулювали PPD протягом 20 год, і супернатанти аналізували за допомогою мультиплексного аналізу. (А). Концентрації цитокінів зображені у вигляді середніх значень \pm SEM чотирьох незалежних експериментів з трьома повтореннями кожного. Фонове продукування цитокінів контрольних середовищ віднімали. Клітини, повторно стимульовані PPD протягом 6 год у присутності брефелдину А, аналізували методом кольорової проточної цитометрії (В). Частота CD4 Т-клітин, що відповідають, зображена у вигляді середніх значень \pm SEM трьох незалежних експериментів з трьома повтореннями кожного. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою ANOVA і критерію множинного порівняння Бонферроні. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

Фіг. 5: Вакцинація rBCG або rBCG не призводить до значних змін популяцій Treg клітин. Treg клітини в селезінці після підшкірної імунізації rBCG або rBCG. Чорні стовпчики відображають клітини CD25+FoxP3+, білі стовпчики відображають клітини CD25-FoxP3+. Частота CD4 Т-клітин і CD8 Treg клітин через 83 дні після імунізації (А і В), а також через 7 днів (С і D) або 90 днів (Е і F) після аерозольного інфікування 200-400 КУО MTB. Три миші на групу, зображено у вигляді середніх значень \pm SEM. Наведені дані трьох незалежних експериментів з аналогічними результатами.

Фіг. 6: Частота CD8 Т-клітин, які продукують цитокін, у легенях після вакцинації і подальшого аерозольного інфікування MTB. Секреція цитокінів через 7 днів після аерозольного інфікування 200-400 КУО MTB. Клітини, повторно стимульовані PPD протягом 6 год у присутності брефелдину А, аналізували методом багатокольорової проточної цитометрії. Частота CD8 Т-клітин, що відповідають, зображена у вигляді середніх значень \pm SEM двох незалежних експериментів з трьома повтореннями кожного. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою ANOVA і критерію множинного порівняння Бонферроні.

Фіг. 7: Частота CD8 Т-клітин, які продукують цитокін, у селезінці після вакцинації і подальшого аерозольного інфікування MTB. Секреція цитокінів через 7 днів після аерозольного інфікування 200-400 КУО MTB. Клітини, повторно стимульовані PPD протягом 6 год у присутності брефелдину А, аналізували методом багатокольорової проточної цитометрії. Частота CD8 Т-клітин, що відповідають, зображена у вигляді середніх значень \pm SEM чотирьох незалежних експериментів з трьома повтореннями кожного. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою ANOVA і критерію множинного порівняння Бонферроні. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

Фіг. 8: Імунні реакції в легенях при персистентному інфікуванні MTB rBCG-вакцинованих мишей. Секреція цитокінів клітинами легень через 90 днів після аерозольного інфікування 200-400 КУО MTB. Клітини повторно стимулювали PPD протягом 20 год, і супернатанти аналізували за допомогою мультиплексного аналізу (А). Концентрації цитокінів зображені у вигляді середніх значень \pm SEM двох незалежних експериментів з трьома повтореннями кожного. Фонове продукування цитокінів контрольних середовищ віднімали. Клітини, повторно стимульовані PPD протягом 6 год у присутності брефелдину А, аналізували методом багатокольорової проточної цитометрії (В). Частота CD4 Т-клітин, що відповідають, зображена у вигляді середніх значень \pm SEM двох незалежних експериментів з трьома повтореннями кожного. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою ANOVA і критерію множинного порівняння Бонферроні. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$.

Фіг. 9: Частота CD8 Т-клітин, які продукують цитокін, після вакцинації і подальшого аерозольного інфікування MTB. Секреція цитокінів клітинами, виділеними з легень, через 90 днів після аерозольного інфікування 200-400 КУО MTB. Клітини, повторно стимульовані PPD протягом 6 год у присутності брефелдину А, аналізували методом багатокольорової проточної цитометрії. Частота CD8 Т-клітин, що відповідають, зображена у вигляді середніх значень \pm SEM двох незалежних експериментів з трьома повтореннями кожного. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою ANOVA і критерію множинного порівняння Бонферроні. *, $P < 0,05$.

Фіг. 10: Вакцинація індукує продукування IL-22, а не IL-21. Секреція IL-21 (А) і IL-22 (В) клітинами селезінки (2×10^6 клітин) або легень (2×10^5 клітин) мишей через 83 дні після вакцинації і подальшого аерозольного інфікування 200-400 КУО MTB. Концентрації IL-21, визначені за трьома зразками на групу, зображені у вигляді середніх значень \pm SEM. Для визначення концентрацій IL-22 зразки з однієї групи об'єднували. Дані є репрезентативними для двох (83 день після вакцинації) і п'яти (7 день після інфікування) аналогічних експериментів. Клітини повторно стимулювали PPD протягом 20 год, і супернатанти аналізували за допомогою ELISA.

Фіг. 11: rBCG спричинює підвищений рекрутинг $\gamma\delta$ Т-клітин і NK-клітин без істотної зміни популяцій APC. Клітини, рекрутовані до черевної порожнини після введення 10^6 КУО rBCG або

pBCG внутрішньоочеревинним шляхом. Аналіз клітинних популяцій перитонеальної промивної рідини за допомогою проточної цитометрії. APC, рекрутовані до очеревини через 5 год (верхня панель) і 6 днів (нижня панель) після внутрішньоочеревинного введення rBCG або pBCG (A). Імунні комплекси (IC) популяцій Т-клітин через 5 год після ін'єкції (B). Клітини стимулювали α CD3/ α CD28 антитілами протягом 18 год у присутності брефелдину А. IC популяцій Т-клітин через 6 днів після введення (C). Клітини повторно стимулювали PPD протягом 18 год у присутності брефелдину А. Дані подані як підсумування даних трьох незалежних експериментів з п'ятьма мишами на групу. Горизонтальною лінією позначена медіана. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою ANOVA і критерію множинного порівняння Бонферроні. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$. Результати аналізу цитокінів і хемокинів, виявлених в перитонеальній змивній рідині за допомогою мультиплексного аналізу (D), зображені як середні концентрації \pm SEM.

Фіг. 12: rBCG індукуює IL-17 в людських PBMC від здорових волонтерів на фазі I клінічних випробувань. Продукування IL-17 людськими PBMC, виділеними від здорових волонтерів на фазі I клінічних досліджень. У цілому 5×10^5 клітин, виділених через 29 днів після вакцинації rBCG або pBCG, повторно стимулювали PPD протягом 20 год, і супернатанти аналізували за допомогою мультиплексного аналізу. Статистичну значущість визначали за критерієм Манна-Уїтні з одностороннім значенням Р і поправкою Уелча. *, $P < 0,05$; $n=3$ для pBCG і $n=7$ для rBCG.

Приклади

Матеріали і методи

Миші

Миші-самці лінії BALB/c були виведені в Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) у Берліні. На початку експериментів вік мишей становив 6-8 тижнів, і тварин утримували за умов, вільних від специфічних патогенів (SPF). Експерименти на тваринах були проведені зі схвалення Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo, Берлін, Німеччина).

Бактерії

Застосовані штами MTB H37Rv і pBCG та rBCG були описані раніше [12]. Бактерії вирощували в живильному середовищі Міддлбрука 7H9, доповненому гліцерином, 0,05% Твін 80 і ADC (альфа-декарбоксилаза). Культури у середньологарифмічній фазі росту збирали і зберігали при температурі -80°C до використання. Усі концентровані розчини титрували перед використанням. Одноклітинні бактеріальні суспензії одержали шляхом повторного пропускання через шприц з голкою 27G.

Вакцинація і MTB інфікування

pBCG або rBCG (10^6 КУО (колонієутворювальних одиниць)) вводили підшкірно (s.c.) в безпосередній близькості від основи хвоста. Аерогенне інфікування мишей MTB здійснювали за допомогою системи інгаляційної експозиції Glas-Col. Бактеріальне навантаження оцінювали шляхом механічного руйнування органів, видалених в асептичних умовах, у 0,5% (в об'ємному відношенні) розчині Tween 80 у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS), і висіванням послідовних розведень на агарових планшетах із середовищем Міддлбрука 7H11, доповненим ростовою домішкою OADC. Колонії MTB підраховували через 3 тижні. Статистичну значущість результатів визначали за критерієм Манна-Уїтні з двобічними значеннями Р для непараметричних даних з використанням програми GraphPad Prism 5.0.

Виділення клітин, стимулювання і проточна цитометрія

Клітини очищали, як описано раніше [42]. Експериментальні групи складались із п'яти мишей. Дві селезінки або легені об'єднували, і один зразок обробляли окремо, в результаті чого для подальшого стимулювання одержали три зразки на групу з п'яти мишей. Клітини стимулювали 50 мкг/мл PPD (компанія SSI, Копенгаген, Данія) протягом 20 год для аналізу цитокінів за допомогою мультиплексного аналізу або протягом 6 год у присутності 25 мкг/мл брефелдину А (Brefeldin A) для внутрішньоклітинного забарвлення цитокінів (ICS). Були використані такі антитіла: CD4 (RM4-5), IFN γ (XMG-1.2), IL2 (JES6-5H4), Ly6G/C (RB6-8C5), CD11b (MI/70), $\gamma\delta$ -TCR (GL-3), набір для забарвлення FoxP3 і CD49b (cloneDX5) (усі від компанії eBioscience). CD8 α (YTS 169), TNF- α (XT22), CD16/CD32 (2.4G2), F4/80 (CI:A3-1) і CD11c (N418) виділяли із супернатантів гібридом з подальшим очищенням і мітили флуоресцентною міткою у лабораторії. IL-17 (TC11-18H10) одержали від компанії BD Biosciences. Клітини аналізували за допомогою проточного цитометра FACSCanto II або LSR II з програмою FACSDiva (BD Biosciences). Цитокіни визначали за допомогою імуноаналізів Bio-Plex Mouse на основі гранул Th1/Th2, IL-17 і IL-6 від компанії Bio-Rad відповідно до інструкцій виробника. IL-21 і IL-22 визначали за допомогою ELISA від компанії R&D Systems. Людський IL-17 виявляли за допомогою аналізу Milliplex 42-plex від компанії Millipore.

Промивання очеревини

pBCG або rBCG були свіжоприготовленими з культури у середньологарифмічній фазі росту. Бактерії тричі промили PBS, і концентрацію визначали шляхом вимірювання оптичної густини при 580 нм. Введення 106 КУО здійснили внутрішньочеревинним шляхом. Рекрутовані клітини одержали з черевної порожнини через 5 год або 6 днів шляхом ін'єкції 5 мл PBS і аналізу з використанням засобів проточної цитометрії. Цитокіни та хемокини в промивній рідині визначали із застосуванням набору Bio-Plex Mouse Cytokine 23-plex від компанії Bio-Rad.

Результати Th1/Th17-відповіді після rBCG і pBCG вакцинації

З метою з'ясування імунних механізмів, що мають відношення до ефективності протитуберкульозної вакцини, винахідники порівнювали імунні відповіді на rBCG і pBCG у мишей. Краща захисна ефективність rBCG спочатку була визначена після внутрішньовенної імунізації [12]. У цьому документі винахідники показують, що підшкірне введення rBCG індукувало зіставні рівні захисту і зберігало свою високу ефективність у порівнянні з pBCG (Фіг. 1А). Далі, винахідники проаналізували довгострокові анамнестичні реакції в легенях і селезінці мишей через 83 дні після підшкірної вакцинації rBCG або pBCG. Клітини повторно стимулювали PPD, і супернатанти аналізували за допомогою мультиплексних аналізів на цитокіни. Імунізація rBCG індукувала значно більше продукування цитокінів клітинами, виділеними з легень, у порівнянні з pBCG (Фіг. 2А). До них належать IFN- γ , IL-2, IL-6 і GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор). На противагу цьому, вміст цитокінів типу 2 IL-4, IL-5 і IL-10 не перевищив фонових рівнів (дані не показані). Цікаво, що приблизно втричі більші концентрації IL-17 продукувались клітинами легень rBCG-вакцинованих мишей. Слід зазначити, що лише деякі клітини можуть бути виділені з легень неінфікованих мишей. Отже, загальні концентрації цитокінів були нижчими, ніж в селезінці, де для стимулювання може застосовуватись в 10 разів вища густина клітин на лунку (Фіг. 2В). У селезінці обидві вакцини викликали однаково сильну Th1-відповідь, що відображається порівнянними концентраціями IL-2, IL-6, IFN- γ і GM-CSF. Тим не менш, клітини селезінки rBCG-вакцинованих мишей продукували значно більше IL-17 при повторній стимуляції PPD в порівнянні з pBCG-вакцинованими тваринами. Таким чином, імунізація rBCG, але не pBCG, індукувала супутні і сильні Th1- і Th17-відповіді в легенях і селезінці, які підтримувались протягом тривалих періодів часу. Прискорений рекрутинг МТВ-специфічних Т-клітин при інфікуванні вірулентним штамом МТВ у rBCG-вакцинованих мишей

Клітини Th17 пов'язуються з поліпшеним імунологічним наглядом [13]. Винахідники порівнювали антиген-специфічні Т-клітинні відповіді у вакцинованих тварин у разі аерозольного інфікування вірулентним штамом МТВ в легенях і селезінці через 7 днів після інфікування. Явно виражене продукування IFN- γ , IL-17, IL-2 і GM-CSF легеневиими клітинами rBCG-вакцинованих мишей було виявлено через 20 год після повторного стимулювання PPD (Фіг. 3А) або пептидами Ag85А (дані не показані). Напроти, ці цитокіни ледь секретувались клітинами pBCG-вакцинованих мишей. У невакцинованих тварин, інфікованих МТВ, рівень продукування цитокінів був нижчим за межу виявлення, що узгоджується з попередніми повідомленнями про те, що МТВ-специфічні Т-клітини з'являються не раніше ніж через 3 тижні після інфікування МТВ [13]. Цитокіни типу 2 IL-4, IL-5 і IL-10 не були виявлені, а рівні TNF α , IL-12p70 і IL-6 ледь перевищували фонові рівні у цей ранній момент часу після інфікування МТВ (дані не показані).

Винахідники визначили продукування цитокінів Т-клітинами легень за допомогою проточної цитометрії через 7 днів після інфікування МТВ (Фіг. 3В). Клітини стимулювали PPD протягом 6 год з подальшим внутрішньоклітинним забарвленням цитокінів на IL-2, IL-17, IFN- γ і TNF- α . У невакцинованих контрольних тварин невелика частина CD4 Т-клітин продукувала IL-2, TNF- α або IFN- γ . У вакцинованих мишей CD4 Т-клітини секретували IL-2, IFN- γ , TNF- α та IL-17. Частота поодиноких клітин, які продукують цитокін, була найвищою, хоча і не значущою, в групі rBCG. У вакцинованих тварин винахідники виявили поліфункціональні Т-клітини, які, як припускається, приймають участь в захисному імунитеті [14]. Численними Т-клітинами, які продукують цитокін, були головним чином подвійні продуценти IL2⁺TNF- α ⁺, кількість яких значно збільшилась після rBCG вакцинації. Потрійними продуцентами були майже виключно IL2⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺, і їх кількість трохи збільшилась у rBCG- у порівнянні з pBCG-вакцинованими мишами. Крім того, четверні позитивні клітини IL2⁺TNF- α ⁺IFN- γ ⁺IL17⁺ з'явились виключно в групі rBCG, хоча і з дуже низькою частотою.

В принципі, Т-клітини селезінки продукували набори цитокінів, аналогічні наборам, продукованим легеневиими Т-клітинами (Фіг. 4). Продукування IL-2 і GM-CSF було значно вищим у rBCG-вакцинованих тварин у порівнянні з групою pBCG і нижчим за рівень виявлення у невакцинованих контрольних тварин, хоча у невакцинованих контрольних тварин невеликий відсоток CD4 Т-клітин продукував IFN- γ . Загалом, вакцинація pBCG або rBCG індукувала CD4 Т-

клітини, що секретують IFN- γ і TNF- α , з більшою частотою моно-або мультипродуцентів у rBCG-вакцинованих мишей у порівнянні з групою pBCG.

Через 7 днів після інфікування CD4 Т-клітини були головними продуцентами цитокінів; CD8 продуценти цитокінів були виявлені з більш низькими частотами в легенях (Фіг. 6) і селезінці (Фіг. 7), хоча і зі схожими наборами. Слід зазначити, що в групі rBCG була виявлена значно більша кількість CD8 Т-клітин-монопродуцентів TNF- α .

Різні рівні продукування цитокінів і кількості клітин-продуцентів не були спричинені різними бактеріальними навантаженнями у цей ранній момент часу після інфікування, що підтверджується порівнянними кількостями колонієутворювальних одиниць (КЮО) в легенях і селезінці (Фіг. 1B). Загальна кількість Трег клітин у двох вакцинованих групах збільшувалась після інфікування до порівнянного ступеня (Фіг. 5). Вакцинація rBCG забезпечує сильну імунну відповідь під час персистентного інфікування

Винахідники аналізували МТВ-специфічні імунні реакції через 90 днів після інфікування, коли бактеріальне навантаження легень було приблизно в 10 разів нижче у rBCG-імунізованих тварин в порівнянні з групою pBCG і у 100 разів нижче в порівнянні з невакцинованою контрольною групою. Клітини легень вакцинованих мишей і необроблених контрольних тварин повторно стимулювали PPD протягом 20 год, і концентрації цитокінів визначали за допомогою мультиплексного аналізу (Фіг. 8A). Цитокіни, виявлені при повторному стимулюванні, належали переважно до типу 1. Однак винахідники не змогли виявити різниці у рівнях IFN- γ або IL-17 між вакцинованими групами під час персистентного інфікування. На противагу цьому, кількість IL-2, IL-6, GM-CSF і TNF- α була вище у rBCG-вакцинованих мишей. У всіх групах рівні IL-4 і IL-5 були нижче межі виявлення, і була виявлена певна кількість IL-12p70 та IL-10 (дані не показані). Крім того, аналіз клітин легень за допомогою багатокольорової проточної цитометрії показав переважно CD4 Т-клітини, які продукують цитокін, під час персистентного інфікування (Фіг. 8B). CD4 Т-клітини, які секретували лише IFN- γ , були виявлені у всіх групах з аналогічними частотами. Після вакцинації можна було також виявити CD4 Т-клітини, що продукують IL-2, IFN- γ , TNF- α або IL-17 в різних комбінаціях. Цікаво, що частота CD4 Т-клітин, які реагували, істотно не відрізнялась між rBCG- і pBCG-вакцинацією, незважаючи на більш високі концентрації IL-2 і TNF- α в супернатантах. Винахідники припускають, що обидві вакцини підвищували частоту антиген-специфічних CD4 Т-клітин у легенях під час персистентного інфікування МТВ, де rBCG-індуковані Т-клітини ставали більш потужними продуцентами цитокінів. CD8 Т-клітини майже виключно секретували IFN- γ з порівнянною частотою в усіх групах, в той час як в rBCG-групі було значно більше поодиноких CD8 Т-клітин, які продукують TNF- α . Кількість поліфункціональних CD8 Т-клітин ледь перевищувала фоновий рівень (Фіг. 9).

Вакцинація спричинює продукування IL-22, але не IL-21

Th17-клітини можуть продукувати додаткові ефекторні цитокіни, такі як IL-21 [15] і IL-22 [16]. Клітини, що продукують IL-22, були виявлені у хворих на туберкульоз, але вони виглядали такими, що відрізняються від клітин, що продукують IL-17 [17]. Винахідники не виявили IL-21 після стимулювання PPD клітин селезінки або легень вакцинованих і згодом МТВ-інфікованих мишей (Фіг. 10A). IL-22 продукувався з підвищеними концентраціями спленоцитами, стимульованими PPD протягом 20 год (Фіг. 10B) у rBCG-імунізованих мишей, але подальшого збільшення в ранні терміни після інфікування МТВ не спостерігалось. Продукування IL-22 клітинами легень спостерігалось лише в rBCG-вакцинованій групі і зменшувалось після аерозольного МТВ-інфікування.

Внутрішньоочеревинне введення rBCG спричинює підвищення рекрутингу $\gamma\delta$ Т-клітин і NK клітин без істотної зміни популяцій APC (клітини, що презентують антиген)

Винахідники хотіли визначити механізми, які лежать в основі переважного індукування Th17-клітин після імунізації rBCG. З цією метою rBCG і pBCG вводили внутрішньоочеревинним шляхом, через 5 год або 6 днів після введення з черевної порожнини виділяли клітини, що іммігрують, і аналізували їх за допомогою проточної цитометрії (Фіг. 11A). Нейтрофіли (визначені як Gr1^{HI}, CD11b^{HI}, MHCII⁺, CD11c⁺) швидко проникали до черевної порожнини і однаковою мірою залишалися у підвищеній кількості на 6 день після інфікування як в pBCG-, так і в rBCG-групі. Частота постійних перитонеальних макрофагів (визначених як CD11b^{HI}, F4/80^{HI}, Gr1⁻, MHCII⁺, CD11c⁺) і дендритних клітин (CD11c⁺, CDHb^{LO}, Gr1⁻) залишалась незмінною у низьких відсотках. Загалом, між rBCG- і pBCG-групами ніяких істотних відмінностей виявлено не було. Перитонеальні клітини, зібрані через 5 год після вакцинації, піддавали поліклональній стимуляції (Фіг. 11B) за допомогою α CD3/ α CD28 антитіл. Частоти CD4 Т-клітин і NK-клітин були порівнянні між усіма групами, як і продукування IFN- γ та IL-17. Через шість днів після введення чисельність цих клітин збільшилась у кількісному відношенні і досягла найвищої частоти у групі rBCG (Фіг. 11C). PPD застосували для повторного стимулювання клітин на 6 день. CD4 Т-

клітини не продукували значної кількості IFN- γ або IL-17, в той час як істотна частина NK-клітин продукувала IFN- γ після введення rBCG. $\gamma\delta$ T-клітини були ідентифіковані як головне джерело раннього IL-17 при туберкульозі [18]. Підвищені, хоча і незначно, пропорції $\gamma\delta$ T-клітин, які продукують IFN- γ , були визначені через 5 год після введення rBCG. Популяція цих клітин згодом збільшилась, і через 6 днів після ін'єкції в rBCG-групі була виявлена значно більша кількість $\gamma\delta$ T-клітин, що продукують IL-17. CD8 T-клітини не були виявлені в черевній порожнині тварин жодної з груп. Винахідники аналізували цитокіни та хемокини, присутні у черевній порожнині, за допомогою мультиплексного аналізу перитонеальної промивної рідини (Фіг. 11D). Після ін'єкції швидко зросла кількість MCP-1, MIP1a, G-CSF і KC; рівні еотаксину через 6 днів залишились незмінними, а IL-12p40 був виявлений з підвищеними концентраціями. Концентрації IL-12p70, IFN- γ , IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17, GM-CSF і TNF- α були нижче межі виявлення, в той час як IL-1b, IL-6, IL-9, IL-13, MIP1b і RANTES можна було виміряти, але продукування було порівнянним між rBCG і pBCG. Таким чином, rBCG і pBCG індукували рекрутинг APC та продукування хемокинів та цитокінів в місці введення однаковою мірою. Цікаво, що пропорції $\gamma\delta$ T-клітин, які секретують IL-17, і NK-клітин, які продукують IFN- γ , були найбільшими після введення rBCG.

Вакцинація rBCG викликає появу клітин, які продукують IL-17, в організмі людини

Нарешті, винахідники проаналізували PBMC (мононуклеари периферичної крові) від здорових волонтерів на I фазі клінічних випробувань, щоб встановити, чи збільшилось продукування IL-17 у rBCG-вакцинованих учасників дослідження. Кров волонтерів відбирали через 29 днів після імунізації rBCG або pBCG, і PBMC виділяли і заморожували. PBMC відтаювали і відстоювали впродовж ночі, з подальшою 20 год повторною стимуляцією PPD. Продукування цитокінів аналізували за допомогою мультиплексного аналізу. Продукування IL-17 було виявлено виключно у PBMC учасників дослідження, імунізованих rBCG (Фіг. 12). Слід зазначити, що доступною була обмежена кількість зразків.

Обговорення

Ідентифікування маркерів імунного захисту має вирішальне значення для раціональної розробки нових протитуберкульозних вакцин. Ці маркери можуть також створити основу для визначення сурогатних маркерів для прогнозування кінцевих точок клінічного результату випробувань ефективності протитуберкульозних вакцин, і тим самим забезпечити провідні принципи вдосконалення нинішніх вакцин-кандидатів. Важливість ключових цитокінів, які активують антимікобактеріальний потенціал макрофагів, у тому числі IFN- γ [21] і TNF- α [22], і необхідність IL-2 для розмноження клітин пам'яті [23], добре відомі і, отже, зазвичай використовуються для моніторингу випробувань протитуберкульозних вакцин.

З метою визначення біомаркерів ефективності вакцини винахідники порівнювали довгострокові анамнестичні реакції, спричинені rBCG, яка, як доведено, надає чудовий захист, у зіставленні з батьківським штамом цієї вакцини, pBCG. Відповіді відрізнялися як в кількісному, так і в якісному відношенні. Винахідники виявили збільшення кількості цитокінів типу 1 та IL-17 в легенях після вакцинації rBCG (Фіг. 2A). Аналіз викликаних вакциною імунних відповідей в легенях, очевидно, є неможливим у контексті клінічних випробувань. З цієї причини винахідники також проаналізували системні довгострокові анамнестичні реакції (Фіг. 2B). Цікаво, що в групах pBCG і rBCG були виявлені порівнянні концентрації спрямувальних цитокінів типу I. На противагу цьому, у разі rBCG-вакцинації було значно підвищено продукування IL-17 спленоцитами. Тому винахідники зробили висновок, що IL-17, а не IFN- γ або IL-2, кваліфікується як маркер кращого захисту, індукованого rBCG.

Th17-клітини сприяють протимікробному захисту завдяки залученню і активації нейтрофілів [24], які є одними з перших клітин, що рекрутуються у відповідь на IL-17. Було показано, що IL-17 є необов'язковим при первинному інфікуванні Mtb [25, 26], але набуває особливого значення в анамнестичних реакціях [13]. Крім того, нещодавні повідомлення щодо експресії CCR6 на людських Th17-клітинах [27, 28] вказують на позитивний зворотний зв'язок, оскільки CCR6 є рецептором CCL20, що продукується нейтрофілами [29], і припускається причетність CCL20-CCR6 до імунопатогенезу туберкульозу [30]. Таким чином, Th17-клітини можуть сприяти прискореному рекрутингу антиген-специфічних T-клітин пам'яті на ділянки знаходження бактерій. Аналізуючи індуковані вакциною імунні відповіді через 7 днів після аерозольного інфікування Mtb, винахідники показали, що наслідком вакцинації rBCG дійсно є прискорений рекрутинг ефекторних клітин на ділянки розмноження бактерій. Винахідники спостерігали підвищену кількість антиген-специфічних CD4 T-клітин і підвищене продукування IL-2, IL-17, IFN- γ і GM-CSF клітинами легень (Фіг. 3) і селезінки (Фіг. 4).

Поліфункціональні CD4 T-клітини, які сумісно продукують IL-2, IFN- γ і TNF- α , були першими, причетність яких припускається до успішних стратегій вакцинації проти *Leishmania major* [14], а

потім також і проти МТВ [31]. Останнім часом ці поліфункціональні CD4 Т-клітини були також виявлені при клінічних випробуваннях протитуберкульозних вакцин [32, 33]. Винахідники виявили поліфункціональні CD4 Т-клітини при rBCG- і pBCG-вакцинації і подальшому інфікуванні (Фіг. 3 і Фіг. 4); проте склад цитокінів (IL-2, IL-17, IFN- γ і TNF- α) у подвійних і

5 потрібних продуцентів значно різнився як між експериментами, так і між окремими тваринами. Якщо поліфункціональні клітини були дійсним корелятом захисту, у такому разі набагато важливішою є їх загальна кількість, яка була більшою в rBCG-групи, а не їх склад.

Чому rBCG індукувала Th17-відповідь? Імунізація rBCG і pBCG однаковою мірою спричинювала рекрутинг APC та продуцентів хемокинів і цитокінів. Цікаво, що пропорції $\gamma\delta$ Т-клітин, що секретують IL-17, і NK-клітин, що продукують IFN- γ , були дуже високими після rBCG-вакцинації. Це узгоджується з повідомленнями, які показують, що IL-17 може швидко продукуватись $\gamma\delta$ Т-клітинами [34, 18] та NKT-клітинами [35]. NK-клітини, кількість яких також збільшилась після вакцинації rBCG, є важливим джерелом раннього IFN- γ . Винахідники вже показали, що різні молекулярні компоненти, вивільнені з rBCG, знаходяться в цитозолі

10 інфікованих макрофагів [12]. Nod-2 є важливим PRR (рецептор розпізнавання патоген-асоційованих молекулярних структур) цитозолу, і його залучення пов'язується з розвитком Tj17-відповідей Т-клітин пам'яті [19].

Апоптоз, індукований протягом бактеріального інфікування, індукує Th17-клітини [36]. Винахідники одержали докази того, що rBCG викликає підвищений апоптоз у порівнянні з pBCG [12], який може ще більше сприяти посиленому розвитку Th17-клітин. Активация інфламасом також може сприяти Th17-анамнестичним реакціям через продукування IL-1b [37]. Було встановлено, наприклад, що NLRP3 виявляє присутність лістеріолізину через зміну рівнів АТФ [38]. Таким чином, індукція Th17-клітин у разі rBCG-вакцинації може потребувати складної

15 взаємодії внутрішньоклітинних стимулів і підвищеного апоптозу.

Th17-клітини вважаються скоріше такими, що спричинюють запальні та аутоімунні захворювання, такі як колаген-індукований артрит [39], ЕАЕ (експериментальний аутоімунний енцефаломієліт) [40, 39] і алергічна гіперчутливість дихальних шляхів [41, 39], аніж корисними для успішної вакцинації. Такий патогенний вплив, як правило, пов'язується з розвитком глибокої IL-21-опосередкованої запальної реакції. Винахідники ніколи не виявляли IL-21 після вакцинації і подальшого інфікування МТВ вище фонового рівня в будь-якому експерименті (Фіг. 10А). Крім того, винахідники ніколи не спостерігали ознак аутоімунітету або надмірного запалення ні в місці ін'єкції після вакцинації rBCG, ні в легенях до 200 днів після інфікування МТВ.

20

У першій спробі порівняння даних з експериментального туберкульозу у мишей з даними щодо людей, винахідники проаналізували профілі цитокінів заморожених РВМС з фази І клінічних випробувань з rBCG і pBCG. В обмеженій кількості зразків винахідники виявили продукування IL-17 після rBCG-, але не після pBCG-вакцинації. Th17-клітини були виявлені в периферичній крові МТВ-інфікованих людей [17]. Нещодавно було повідомлено про CD4 Т-клітини, які продукують IL-17, у підлітків, вакцинованих протитуберкульозною вакциною-кандидатом, до складу якої входив модифікований вірус коров'ячої віспи Ankara, що експресував Ag85A [33]. Відповіді досягли максимального рівня між 7 і 28 днями після вакцинації, після чого їх інтенсивність зменшилась. Це узгоджується з даними винахідників про підвищення продукування IL-17 на 29-й день після вакцинації в групі rBCG (Фіг. 12). Таким чином, видається привабливим запропонувати IL-17 як корелят захисту у випробуваннях протитуберкульозної вакцини.

30

Підсумовуючи, винахідники показали, що наслідком вакцинації rBCG є переважне утворення Th17-клітин, яке, ймовірно, залежить від внутрішньоклітинного розпізнавання бактеріальних компонентів Nod-2. Ці Th17-клітини у свою чергу прискорюють рекрутинг антиген-специфічних Т-клітин до легень. Зрештою, ця послідовність явищ призводить до раннього стримування МТВ і, таким чином, до чудового захисту, що забезпечується rBCG в порівнянні з pBCG. На успішно завершених фази І клінічних випробувань винахідники виявили продукування IL-17 тільки РВМС, виділеними від rBCG-вакцинованих волонтерів. Оскільки IL-17 видається сприятливим для прискореного рекрутингу антиген-специфічних Т-клітин до ділянок реплікації МТВ, майбутні протитуберкульозні вакцини мають конструюватись так, щоб одночасно забезпечувалось індукування збалансованих Th1- і Th17-відповідей.

40

Посилання

1. Tuberculosis Fact Sheet № 104 March. WHO. 2010;

2. Calmette A. Sur la vaccination preventive des enfants nouveau-nes contre tuberculose par le BCG. Ann Inst Pasteur. 1929; 41201-232.

3. Reece S.T., Kaufmann S.H. Rational design of vaccines against tuberculosis directed by basic immunology. Int J Med Microbiol. 2008; 298(1-2): 143-150.

50

4. Trunz B.B., Fine P., Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet*. 2006;367(9517):1173-1180.
5. Colditz G.A., Brewer T.F., Berkey C.S., Wilson M.E., Burdick E., Fineberg H.V. et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA*. 1994;271(9): 698-702.
6. Skeiky Y.A., Sadoff J.C. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(6):469-476.
10. Kaufmann S.H., Baumann S., Nasser Eddine A. Exploiting immunology and molecular genetics for rational vaccine design against tuberculosis, *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10(10):1068-1079.
8. Fletcher H.A. Correlates of immune protection from tuberculosis. *Curr Mol Med*. 2007;7(3):319-325.
9. Goldsack L, Kirman J.R. Half-truths and selective memory: Interferon gamma, CD4(+) T cells and protective memory against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007;87(6):465-473.
15. Tchilian E.Z, Desel C, Forbes E.K., Bandermann S., Sander C.R., Hill A.V. et al. Immunogenicity and protective efficacy of prime-boost regimens with recombinant (delta)ureC hly+ *Mycobacterium bovis* BCG and modified vaccinia virus ankara expressing *M. tuberculosis* antigen 85A against murine tuberculosis. *Infect Immun*. 2009;77(2):622-631.
20. Pearl J.E., Saunders B., Ehlers S., Orme I.M., Cooper A.M. Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse. *Cell Immunol*. 2001;211(1):43-50.
12. Grode L., Seiler P., Baumann S., Hess J., Brinkmann V., Nasser Eddine A. et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest*. 2005; 115(9):2472-2479.
25. Khader S.A., Bell G.K., Pearl J.E., Fountain J.J., Rangel-Moreno J., Cilley G.E. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol*. 2007;8(4):369-377.
14. Darrah P.A., Patel D.T., De Luca P.M., Lindsay R.W., Davey D.F., Flynn B.J. et al. Multifunctional Th1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med*. 2007;13(7):843-850.
15. Korn T., Bettelli E., Gao W., Awasthi A., Jager A., Strom T.B. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H) 17 cells. *Nature*. 2007;448(7152):484-487.
16. Liang S.C., Tan X.Y., Luxenberg D.P., Karim R., Dunussi-Joannopoulos K., Collins M. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2006;203(10):2271-2279.
35. Scriba T.J., Kalsdorf B., Abrahams D.A., Isaacs F., Hofmeister J., Black G. et al. Distinct, Specific IL-17- and IL-22-Producing CD4+ T Cell Subsets Contribute to the Human Anti-Mycobacterial Immune Response. *J Immunol*. 2008;180(3):1962-1970.
18. Lockhart E., Green A.M., Flynn J.L. IL-17 production is dominated by gamma delta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2006;177(7):4662-4669.
40. van Beelen A.J., Zelinkova Z., Taanman-Kueter E.W., Muller F.J., Hommes D. W., Zaat S. A. et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*. 2007;27(4):660-669.
45. Ferwerda G., Girardin S.E., Kullberg B.J., Le Bourhis L., de Jong D.J., Langenberg D.M. et al. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2005; 1(3):279-285.
21. Flynn J.L., Chan J., Triebold K.J., Dalton D.K., Stewart T.A., Bloom B.R. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 1993;178(6):2249-2254.
50. Flynn J.L., Goldstein M.M., Chan J., Triebold K.J., Pfeffer K., Lowenstein C.J. et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995;2(6):561-572.
23. Williams M.A., Tyznik A.J., Bevan M.J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature*. 2006;441(7095):890-893.
55. Happel K.I., Dubin P.J., Zheng M., Ghilardi N., Lockhart C., Quinton L.J. et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med*. 2005;202(6):761-769.
25. Khader S.A., Pearl J.E., Sakamoto K., Gilmartin L., Bell G.K., Jelley-Gibbs D.M. et al. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis

but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol.* 2005;175(2):788-795.

26. Steinman L.. A brief history of T(H) 17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007;13(2):139-145.

5 27. Singh S.P., Zhang H.H., Foley J.F., Hedrick M.N., Farber J.M. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol.* 2008;180(1):214-221.

28. Liu H., Rohowsky-Kochan C. Regulation of DL-17 in human CCR6+ effector memory T cells. *J Immunol.* 2008;180(12):7948-7957.

10 29. Scapini P., Laudanna C., Pinardi C., Allavena P., Mantovani A., Sozzani S. et al. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3 alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol.* 2001;31(7):1981-1988.

30. Lee J.S., Lee J.Y., Son J.W., Oh J.H., Shin D.M., Yuk J.M. et al. Expression and regulation of the CC-chemokine ligand 20 during human tuberculosis. *Scand J Immunol.* 2008;67(1):77-85.

15 31. Forbes E.K., Sander C., Ronan E.O., McShane H., Hill A.V., Beverley P.C. et al. Multifunctional, high-level cytokine-producing Th1 cells in the lung, but not spleen, correlate with protection against *Mycobacterium tuberculosis* aerosol challenge in mice. *J Immunol.* 2008;181(7):4955-4964.

20 32. Abel B., Tameris M., Mansoor N., Gelderbloem S., Hughes J., Abrahams D. et al. The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(12):1407-1417.

33. Scriba T.J., Tameris M., Mansoor N., Smit E., van der Merwe L., Isaacs F. et al. Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2010;40(1):279-290.

25 34. Roark C.L., Simonian P.L., Fontenot A.P., Born W.K., O'Brien R.L. gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3):353-357.

35. Rachitskaya A.V., Hansen A.M., Horai R., Li Z., Villasmil R., Luger D. et al. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgamma and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol.* 2008;180(8):5167-5171.

30 36. Torchinsky M.B., Garaude J., Martin A.P., Blander J.M. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H) 17 cell differentiation. *Nature.* 2009;458(7234):78-82.

37. Meng G., Zhang F., Fuss I., Kitani A., Strober W. A mutation in the *Nlrp3* gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th1 7 cell-dominant immune responses. *Immunity.* 2009;30(6):860-874.

35 38. Mariathasan S., Weiss D.S., Newton K., McBride J., O'Rourke K., Roose-Girma M. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006;440(7081):228-232.

39. Nakae S., Nambu A., Sudo K., Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol.* 2003;171(1):6173-6177.

40 40. Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W.M., Mattson J., Basham B., Sedgwick J.D. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005;201(2):233-240.

41. Hellings P.W., Kasran A., Liu Z., Vandekerckhove P., Wuyts A., Overbergh L. et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(1):42-50.

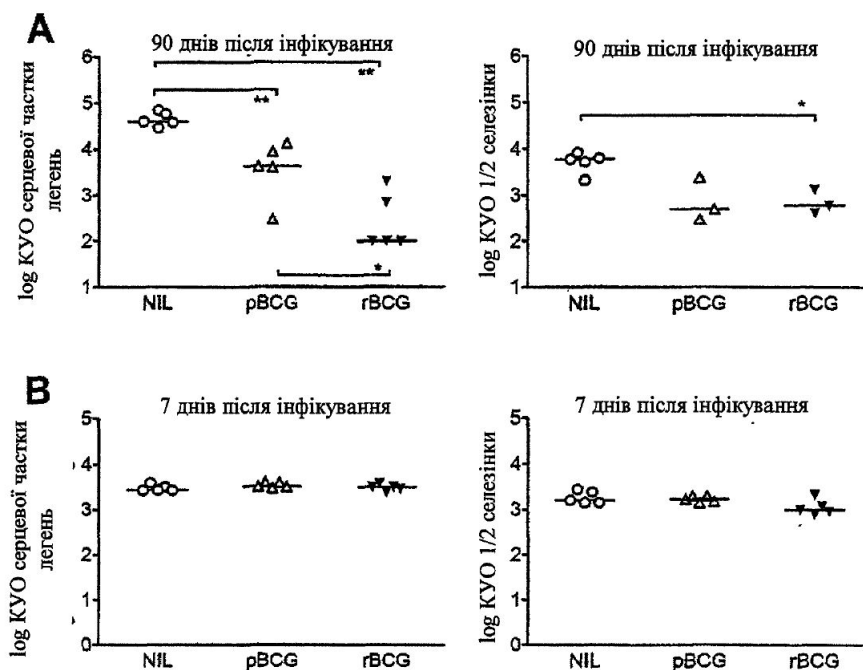
45 42. Kursar M., Koch M., Mittrucker H.W., Nouailles G., Bonhagen K., Kamradt T. et al. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 2007;178(5):2661-2665.

50 43. Brosch R., Gordon S.V., Gamier T., Eiglmeier K., Frigui W., Valenti P., Dos Santos S., Duthoy S., Lacroix C., Garcia-Pelayo C., Inwald J.K., Golby P., Garcia J.N., Hewinson R.G., Behr M.A., Quail M.A., Churcher C., Barrell B.G., Parkhill J., Cole S.T., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Mar 27; 104 (13): 5596-601. Epub 2007 Mar 19.

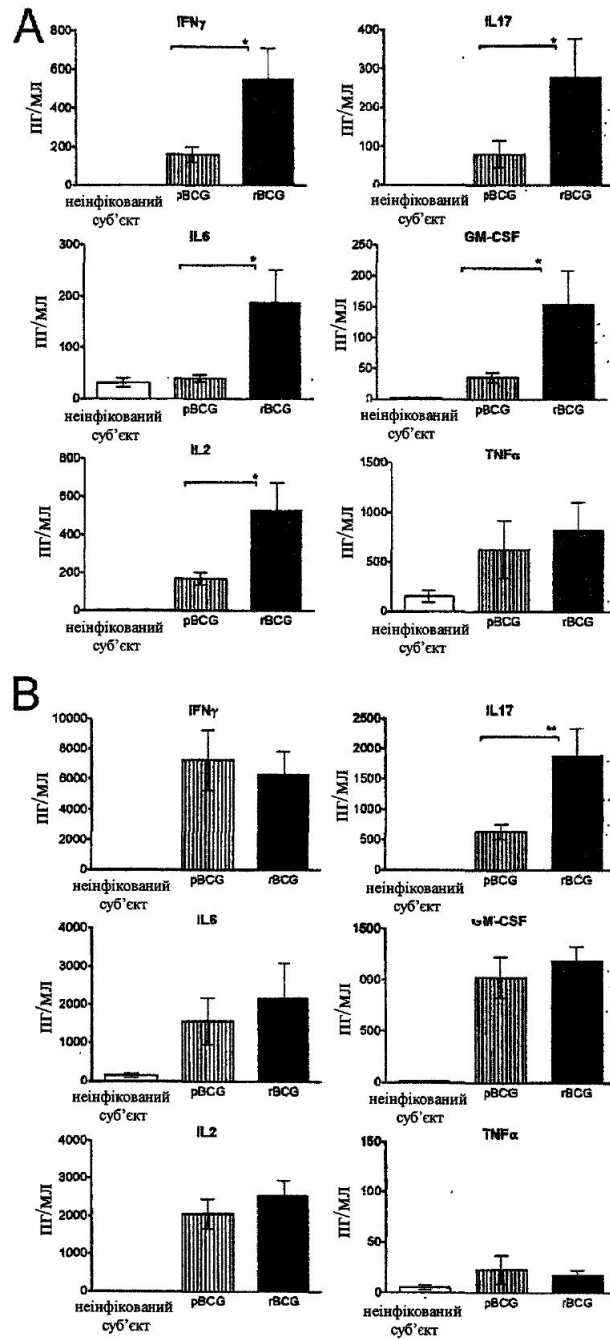
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

55 1. Спосіб визначення ефективності рекомбінантної мікобактеріальної живої вакцини, який включає визначення імунної відповіді, одержаної за участі Т-хелперів 17 (Th17-імунної відповіді) у вакцинованого суб'єкта, причому виявна Th17-імунна відповідь є індикатором захисного імунітету у даного суб'єкта.

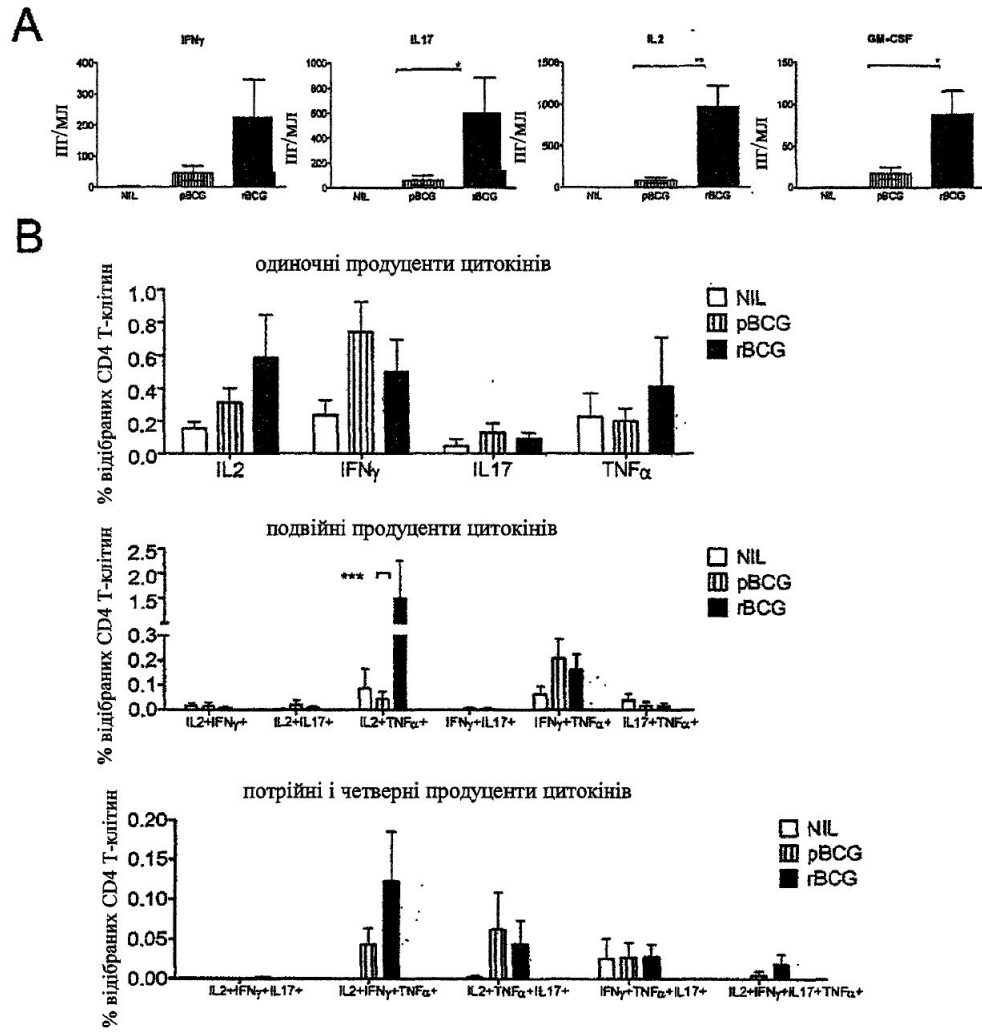
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що вакциною є рекомбінантна *Mycobacterium*, яка містить молекулу рекомбінантної нуклеїнової кислоти, яка кодує гібридний поліпептид, що включає (а) домен, здатний викликати імунну відповідь, та (b) домен виходу з фаголізосоми.
3. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що згадана *Mycobacterium* є дефіцитною за уреазою.
- 5 4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що згадана *Mycobacterium* являє собою rBCGΔUreC::H1y⁺::Hug⁺.
5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що згаданою вакциною є субодинична вакцина.
6. Спосіб за будь-яким із пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що згаданою вакциною є вакцина проти мікобактеріальних інфекцій, в тому числі, особливо, легеневих мікобактеріальних інфекцій, в тому числі, особливо, туберкульозу.
- 10 7. Спосіб за будь-яким із пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що визначення Th17-іммунної відповіді включає піддання зразка, який містить імунокомпетентні клітини згаданого вакцинованого суб'єкта, повторній стимуляції імуногеном, який відповідає імуногену згаданої вакцини, і визначення наявності та/або кількості клітин, пов'язаних з Th17-іммунною відповіддю, у згаданому зразку.
- 15 8. Спосіб за будь-яким із пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що визначення Th17-іммунної відповіді включає визначення IL-17, наприклад, імунологічними способами.
9. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що згаданим суб'єктом є ссавець, наприклад людина.
- 20 10. Спосіб за будь-яким із пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що Th17-іммунну відповідь визначають через 20-50 днів після вакцинації.
11. Застосування набору реагентів у способі за будь-яким із пп. 1-10 для визначення ефективності рекомбінантної мікобактеріальної живої вакцини, який включає в себе (а) реагент для повторної стимуляції імунокомпетентних клітин заздалегідь вакцинованого суб'єкта, і (b) реагент для виявлення Th17-іммунної відповіді.
- 25



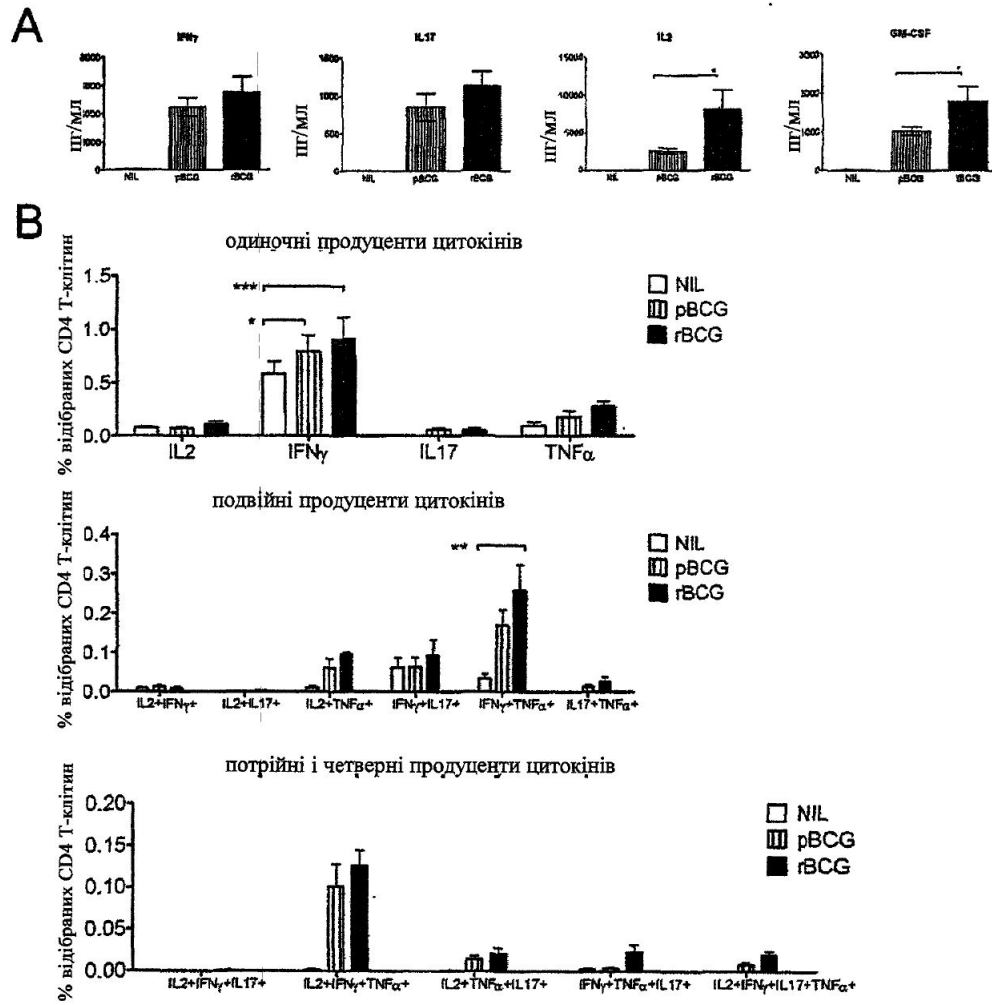
Фіг.1



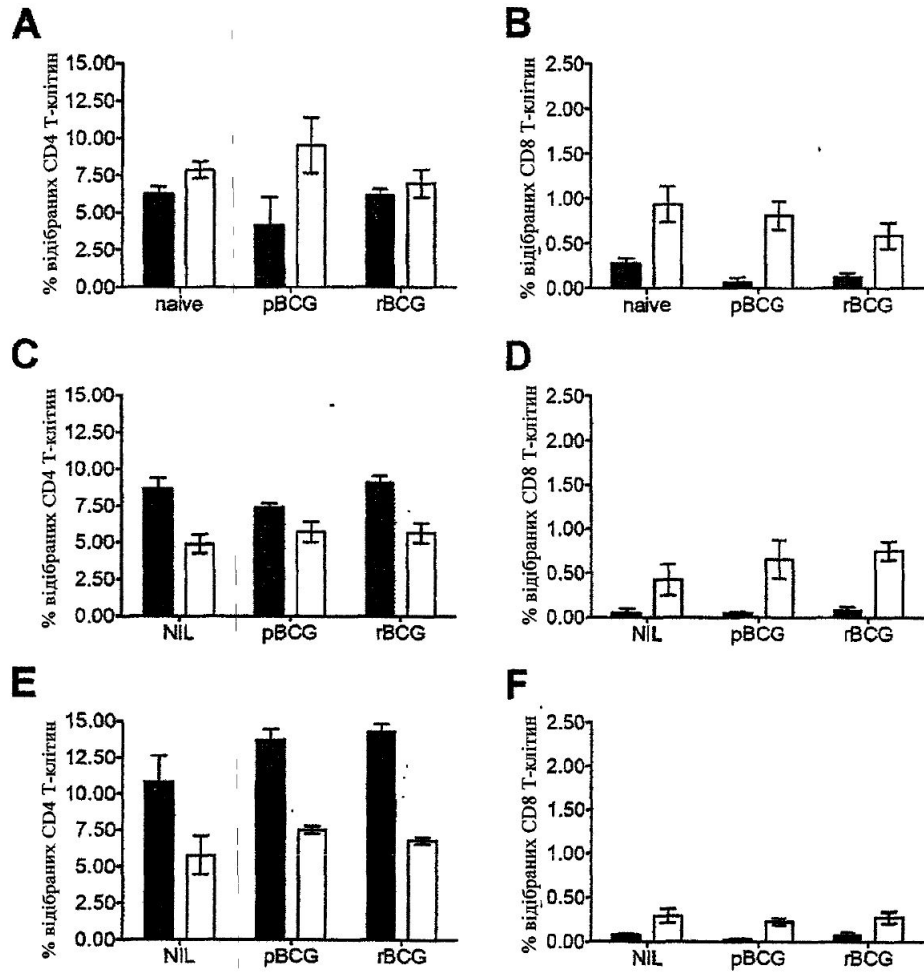
Фіг.2



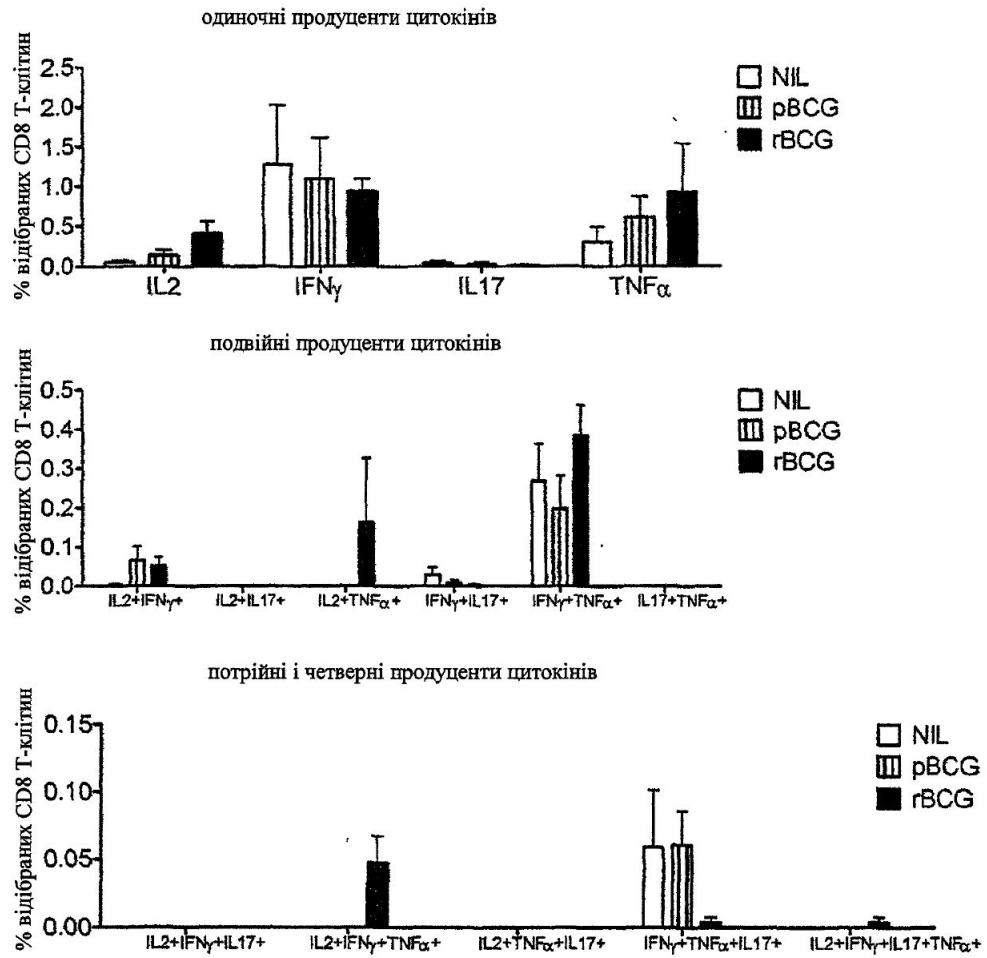
Фіг.3



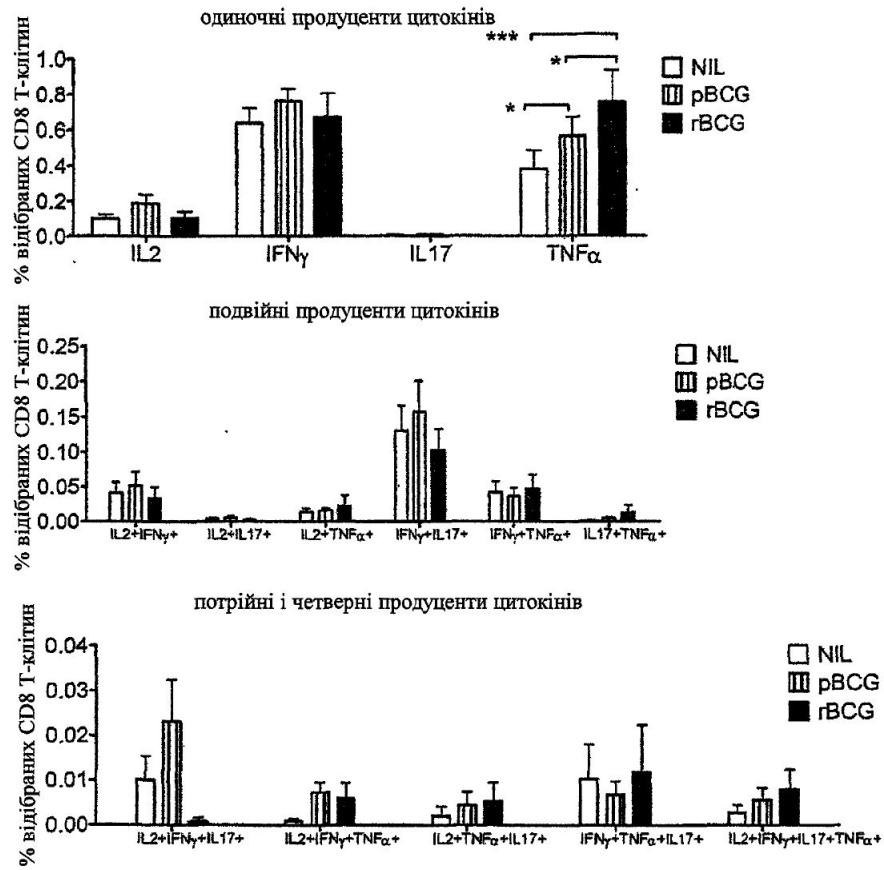
Фіг.4



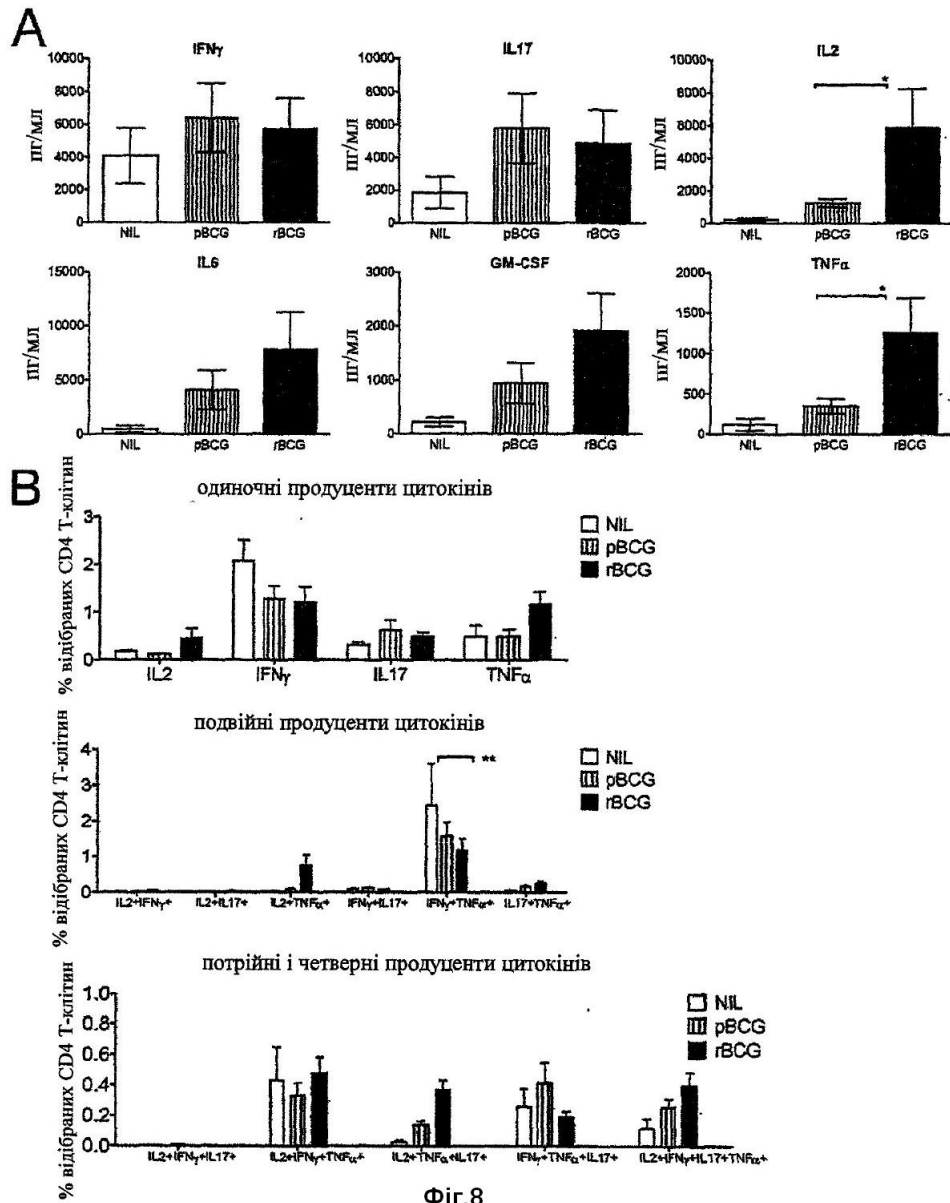
Фиг.5

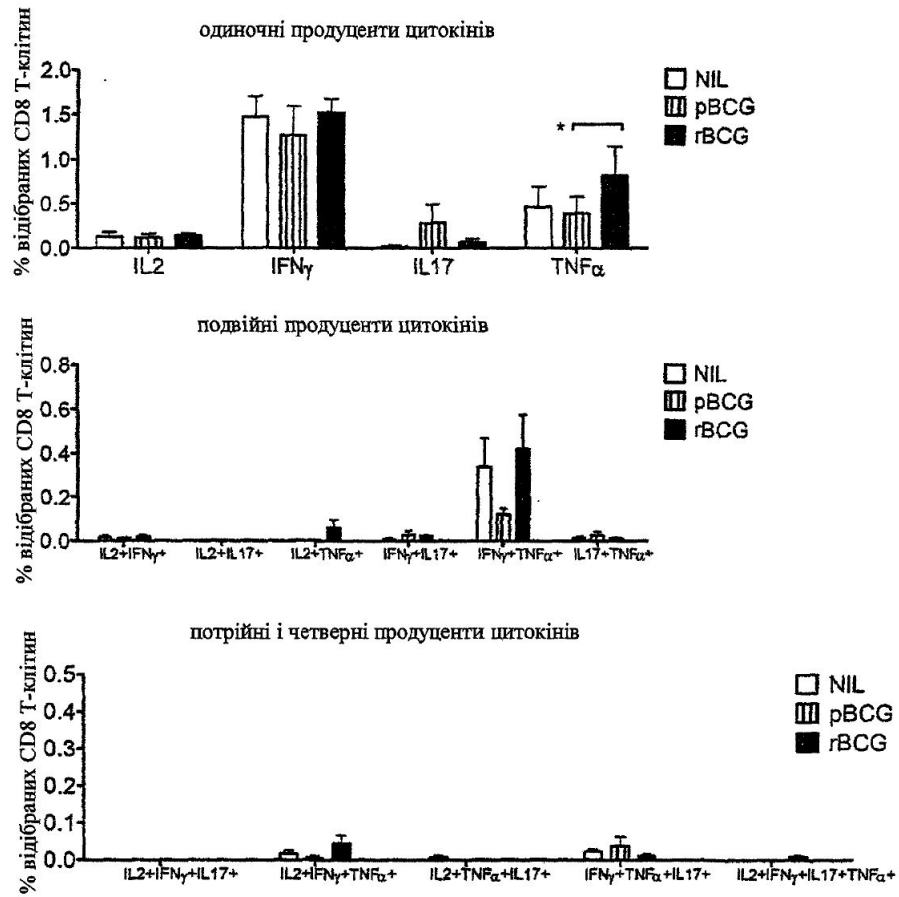


Фіг.6



Фіг.7





Фіг.9

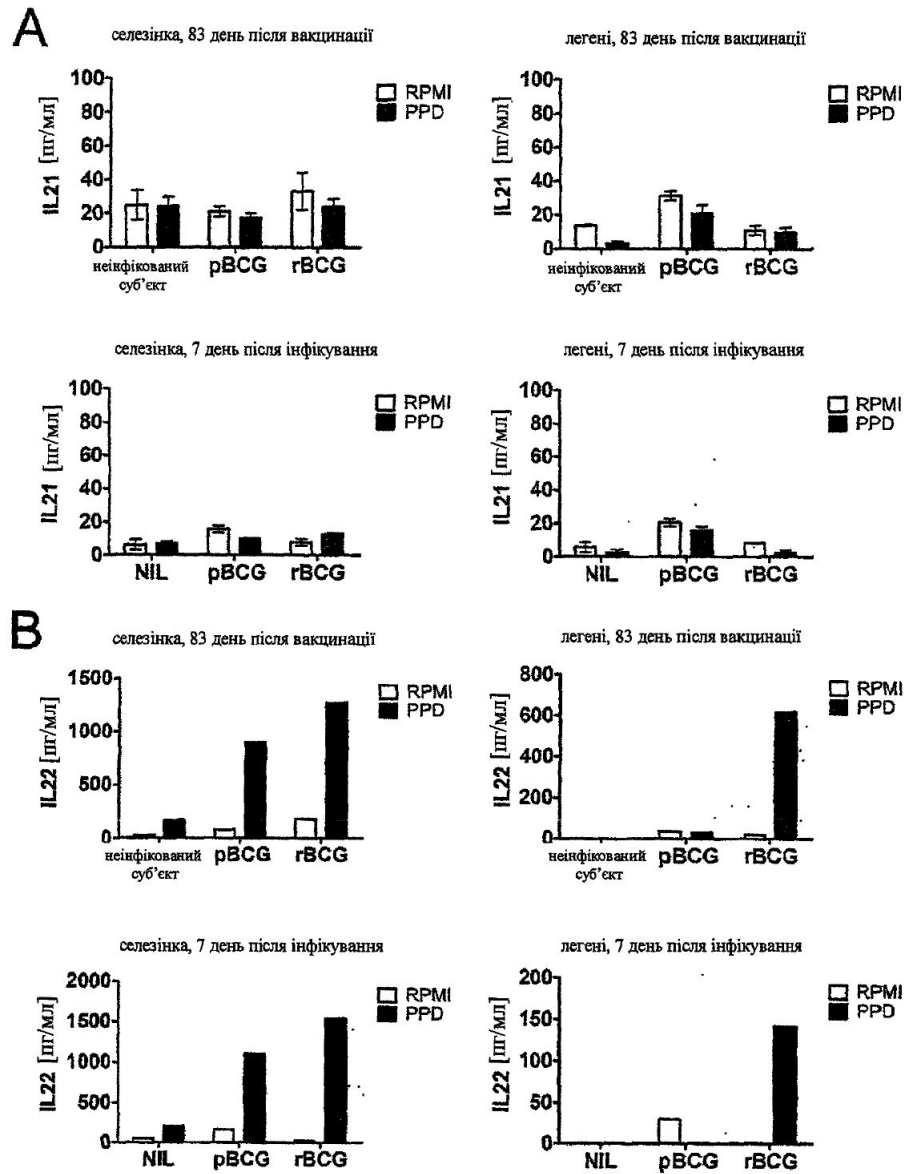


Fig.10

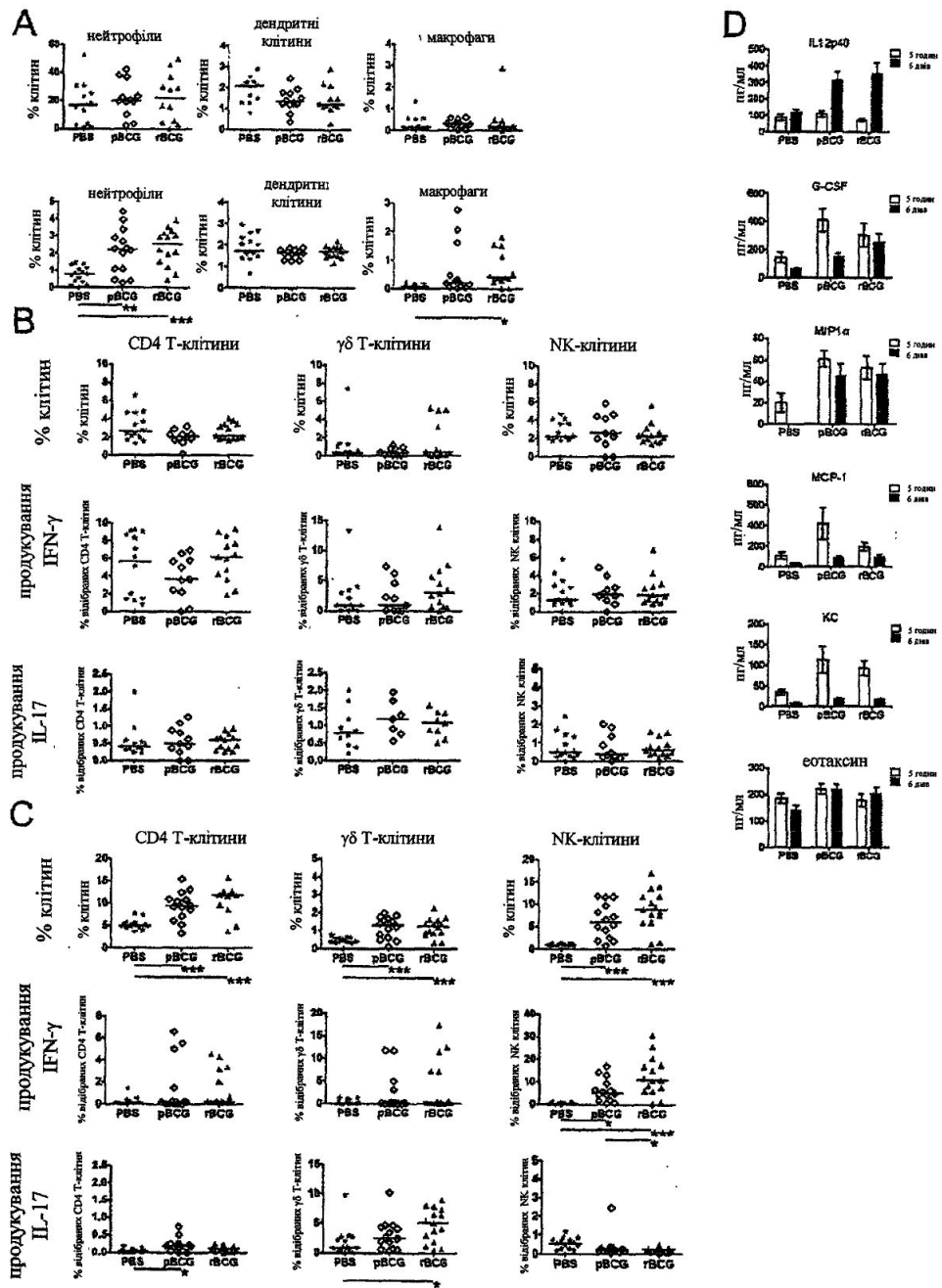


Fig.11

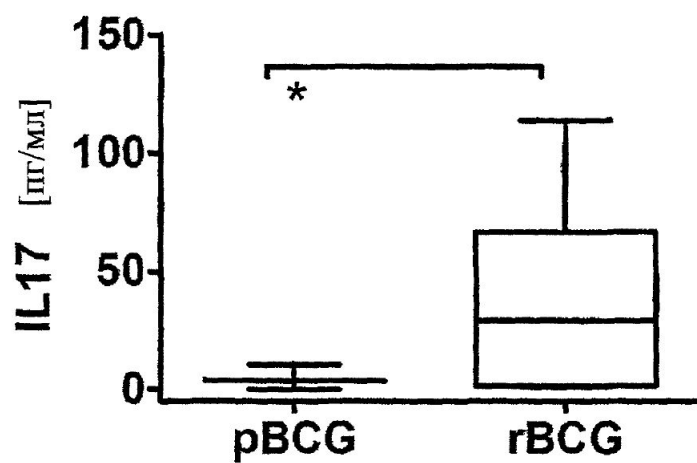


Fig.12

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601