

## ИЗУЧЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА, ИНДУЦИРОВАННОГО ВАКЦИНОЙ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ Ag85, TB10 И FliC

Еремеев В.В.<sup>1</sup>, Духовлинов И.В.<sup>2</sup>, Орлов А.И.<sup>2</sup>, Шепелькова Г.С.<sup>1</sup>, Федорова Е.А.<sup>2</sup>, Балазовский М.Б.<sup>3</sup>, Гергерт В.Я.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ЗАО «Фарма ВАР», Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Вот уже около ста лет БЦЖ остается единственной широко используемой противотуберкулезной вакциной. Известно, что интенсивность индуцированного БЦЖ иммунного ответа по типу Th1 со временем снижается и сходит на нет в течение 10-15 лет. Это существенно отличает БЦЖ от вакцин, обеспечивающих пожизненную протекцию, таких как вакцины против полиомиелита или кори, и может быть связано с естественным ограничением длительности персистенции индуцированных БЦЖ CD4<sup>+</sup>T-клеток. Накапливаются данные о недостаточной способности БЦЖ стимулировать длительную иммунологическую память. Ранее в нашей лаборатории на модели заражения лабораторных мышей относительно резистентной к туберкулезу линии С57BL/6 вирулентным лабораторным штаммом *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) H37Rv по результатам определения высеваемости бактерий из органов и продолжительности жизни животных после заражения была продемонстрирована высокая (сравнимая с BCG Russia) протективная активность трех субъединичных вакцинных препаратов. Целью настоящей работы было изучение характеристик и длительности иммунного ответа, индуцируемого наиболее эффективным из этих препаратов. Группы мышей С57BL/6 вакцинировали внутримышечно два раза с двухнедельными интервалами 10 мкг белка, конъюгированного с 200 мкл эмульсии гидроксида алюминия. Мониторинг иммунного ответа (продукция специфических антител, стимулированная вакцинным белком продукция интерферона-гамма и пролиферация) осуществляли на протяжении 10 месяцев после вакцинации. Установлено, что испытуемый препарат стимулирует у мышей формирование длительной иммунологической памяти к бактериальному антигену. При этом добавление глутоксима смещает спектр иммунологической памяти к «протективно-му» типу, т.е. стимулирует преобладание клеточного компонента иммунного ответа над гуморальным. Следующим этапом исследования данной вакцины будет изучение эффективности ее применения для ревакцинации после первичной иммунизации БЦЖ.

*Ключевые слова:* туберкулез, вакцина, иммунологическая память

### Адрес для переписки:

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

### Address for correspondence:

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

### Образец цитирования:

В.В. Еремеев, И.В. Духовлинов, А.И. Орлов, Г.С. Шепелькова, Е.А. Федорова, М.Б. Балазовский, В.Я. Гергерт «Изучение продолжительности иммунного ответа, индуцированного вакциной на основе рекомбинантных белков Ag85, TB10 и FliC» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 271-276. doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-271-276  
© Еремеев В.В. и соавт., 2018

### For citation:

V.V. Yeremeev, I.V. Dukhovlinov, A.I. Orlov, G.S. Shepelkova, E.A. Fedorova, M.B. Balazovsky, V.Ya. Gergert "Duration of immune response induced by the vaccine based on recombinant Ag85, TB10 and FliC proteins", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 271-276. doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-271-276

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-271-276

## DURATION OF IMMUNE RESPONSE INDUCED BY THE VACCINE BASED ON RECOMBINANT Ag85, TB10 AND FliC PROTEINS

Yeremeev V.V.<sup>a</sup>, Dukhovlinov I.V.<sup>b</sup>, Orlov A.I.<sup>b</sup>, Shepelkova G.S.<sup>a</sup>, Fedorova E.A.<sup>b</sup>, Balazovsky M.B.<sup>c</sup>, Gergert V.Ya.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Pharma VAM, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Already about one hundred years BCG remains the only widely used tuberculosis (TB) vaccine. It is known that intensity of the BCG-induced Th1 immune response decreases over time and comes to naught within 10-15 years. It significantly distinguishes BCG from the vaccines providing a lifelong protection such as vaccines against poliomyelitis or measles, and can be bound to natural restriction of duration of a persistence of the BCG-induced CD4<sup>+</sup> T-cells. Data on insufficient ability of BCG to stimulate life-long immunological memory is accumulating. Earlier in our lab on the model of rather resistant to TB C57BL/6 mice infection with the virulent laboratory strain of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) H37Rv protective activity (comparable to that of BCG Russia) of 3 subunit vaccine variants was demonstrated as assessed by lung and spleen CFU counts and life span of animals after infection. The aim of this study was to study the characteristics and duration of the immune response induced by the most effective variant of these vaccines. Groups of C57BL/6 mice were vaccinated intramuscularly twice with two-week intervals with 10 µg protein conjugated to 200 µl of an aluminum hydroxide emulsion. Immune response (production of specific antibodies, vaccine protein-stimulated production of interferon gamma and proliferation in vitro) was monitored during 10 months after vaccination. We have shown that the test vaccine induces in mice the formation of long-term immunological memory to a bacterial antigen. Moreover, in the presence of glutoxim the immunological memory spectrum shifts to a "protective" type, i.e. the predominance of the cellular component of the immune response over the antibody response is stimulated. The next step will be the investigation of vaccine effectiveness for revaccination after primary BCG immunization.

*Keywords:* tuberculosis, vaccine, immune memory

### Введение

Вот уже около ста лет BCG остается единственной широко используемой противотуберкулезной вакциной. Известно, что интенсивность индуцированного BCG иммунного ответа по типу Th1 со временем снижается и сходит на нет в течение 10-15 лет. Это существенно отличает BCG от вакцин, обеспечивающих пожизненную протекцию, таких как вакцины против полиомиелита или кори, и может быть связано с естественным ограничением длительности персистенции индуцированных BCG CD4<sup>+</sup>T-клеток. Однако накапливаются данные о недостаточной способности BCG стимулировать длительную иммунологическую память. Прямое сравнение особенностей и длительности иммунологической памяти, индуцированной BCG в сравнении с субъединичной вакциной H1/CAF01 (синтетический белок на основе генетической конструкции из Ag85B и ESAT-6, применяется с адьювантом из липосом) у мышей, показало, что в то время как субъединичная вакцина эффективно поддерживает генерацию T-клеток центральной памяти (TCM) в течение 2 лет после вакцинации, при вакцинации BCG экспрессия TCM транзиторна, напротив, индуцируется форми-

рование эффекторных T-клеток памяти (TEM), активно продуцирующих IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  [9]. Подобная картина наблюдается и при хроническом течении туберкулеза у мышей. На этом фоне буст субъединичной вакциной поддерживает значительную популяцию TCM в инфицированных органах, в то время как инъекция BCG таким животным стимулирует ответ по типу терминально-дифференцированных эффекторных T-клеток и неспособность контролировать размножение микобактерий [10]. В полном соответствии с данным наблюдением находится тот факт, что нарушение выхода TCM из лимфоузлов не влияет на индуцируемую BCG протекцию, что указывает на преимущественную направленность T-клеточного ответа на BCG в сторону тканеворезидентных TEM и T-эффекторов [4]. Таким образом, недостаточная стимуляция формирования долгоживущих TEM, возможно, является одним из основных недостатков BCG [10, 12]. Действительно, в недавно проведенном исследовании результатов вакцинации БЦЖ у новорожденных было установлено, что несмотря на то, что активированные вакцинацией T-клетки имеют фенотип, близкий к TCM, их цитокиновый профиль (преимущественная продукция IFN $\gamma$ ) и снижен-

ная пролиферативная активность обуславливают их функциональное сходство с эффекторными Т-клетками [14].

В предыдущем исследовании в нашей лаборатории на модели заражения лабораторных мышей относительно резистентной к туберкулезу линии C57BL/6 вирулентным лабораторным штаммом *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) H37Rv по результатам определения высеваемости бактерий из органов и продолжительности жизни животных после заражения была продемонстрирована высокая (сравнимая с BCG Russia) протективная активность трех субъединичных вакцинных препаратов [2]. **Целью настоящей работы** было изучение характеристик и длительности иммунного ответа, индуцируемого наиболее эффективным из этих препаратов.

## Материалы и методы

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

Основная композиция представляет собой сочетание вариантов химерного белка на основе Ag85B-TB10.4-FliC и плазмидной ДНК, кодирующей антиген Ag85A Mtb. Химерный белок Ag85B-TB10.4-FliC получали с использованием штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21, трансформированного векторной плазмидой pet28a-Ag85B-TB10.4-FliC. Плазмидную ДНК получали с использованием штамма *Escherichia coli* DH10/B, трансформированного векторной плазмидой pEXag85A. В состав второй композиции дополнительно включен глутоксим, обладающий, по нашим данным, активирующим влиянием на макрофаги мышей [1].

Группы по 15 мышей (2 группы животных соответственно каждой композиции) B6 вакцинировали внутримышечно два раза с двухнедельными интервалами 10 мкг белка, конъюгированного с 200 мкл эмульсии гидроксида алюминия. Мышам контрольной группы вводили 200 мкл эмульсии гидроксида алюминия (отрицательный контроль). Положительный контроль — мыши, однократно иммунизированные 10e5 КОЕ живой вакцины BCG (штамм Russia).

Через 1,5; 3,5; 6,25 и 9,75 мес. после вакцинации у 4-5 мышей из группы брали кровь на сыворотку, а после умерщвления цервикальной дислокацией у тех же 4-5 мышей из группы забирали селезенку и лимфоузлы. Полученные органы тщательно растирали в стеклянных гомогенизаторах и выделяли лимфоциты. Выделенные лимфоциты культивировали 72 часа при 37 °С и

5% CO *in vitro* в среде RPMI 1640, содержащей необходимые добавки, в присутствии белкового антигена, использованного для вакцинации. Для определения уровня продукции IFN $\gamma$  иммуноферментным методом через 48 часов от начала культивирования из опытных и контрольных культур отбирали аликвоты супернатанта. Для определения антиген-специфической пролиферативной активности лимфоцитов последние 24 часа культивирования проводили в присутствии меченного тритием тимидина, с последующим определением количества включенной клетками метки на сцинтилляционном счетчике.

Собранные на всех этапах мышинные сыворотки были использованы для определения титра антимикобактериальных антител иммуноферментным методом. С этой целью высокоадсорбирующие 96-луночные планшеты для ИФА (Nunc, США) покрывали раствором комплекса белков вакцинной композиции в концентрации 30 мкг/мл PBS и инкубировали 18 ч при 4 °С. Далее планшеты отмывали раствором 0,1% Твин 20 в PBS и блокировали 1% раствором БСА в PBS в течение 1 ч при 37 °С. После блокировки планшеты снова отмывали и инкубировали с опытными и контрольными сыворотками в разведениях (PBS) 1/100, 1/200 и 1/400 2 ч при 37 °С. Далее планшеты отмывали и инкубировали с мечеными пероксидазой хрена антителами к IgG мыши в разведении (PBS) 1/1000 2 ч при 37 °С. Затем, после отмывки, добавляли высокочувствительный субстрат пероксидазы ТМБ (Thermo, США). Через 5 мин реакцию останавливали 0,167 М раствором серной кислоты. Реакцию читали на ридере VICTOR2 (Perkin Elmer, США) при длине волны 450 нм.

## Результаты

Проведенные исследования показали, что выбранная для данной серии экспериментов схема иммунизации мышей экспериментальным комплексным антигеном стимулирует развитие долгосрочной иммунологической памяти, что, в частности, подтверждается наличием специфических антител в сыворотке через 10 месяцев после вакцинации (рис. 1).

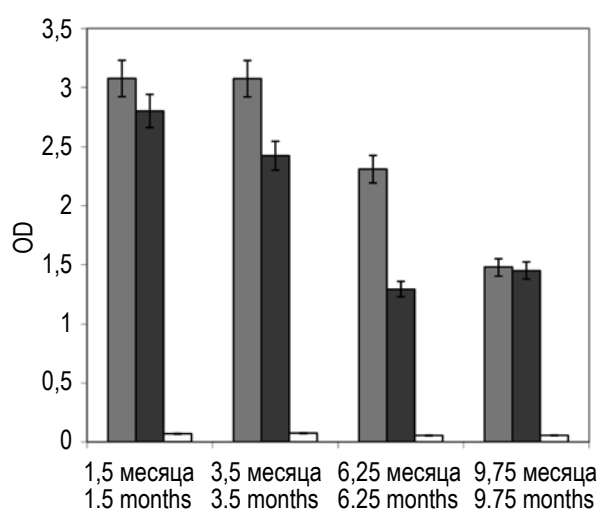
Реакции адаптивного клеточного иммунитета — антиген-зависимая пролиферация лимфоцитов и продукция IFN $\gamma$  — все еще отчетливо выраженные через 3,5 месяца после вакцинации, существенно теряют интенсивность через полгода после последней инъекции вакцины (рис. 2, табл. 1).

Интересно отметить, что интенсивность пролиферации, определяемая по индексу стимуляции пролиферативной реакции лимфоцитов, и продукция IFN $\gamma$  существенно выше в группе мышей, провакцинированных комбинацией экспериментального комплексного антигена с глю-

**ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ IFN $\gamma$  (пг/мл) В СУПЕРНАТАНТАХ СТИМУЛИРОВАННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ БЕЛКОВЫМ АНТИГЕНОМ КУЛЬТУР ЛИМФОЦИТОВ В РАЗНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ**

**TABLE 1. LEVELS OF IFN $\gamma$  (pg/ml) IN SUPERNATANTS FROM EXPERIMENTAL PROTEIN ANTIGEN STIMULATED LYMPHOCYTE CULTURES AT DIFFERENT TIME POINTS POST-VACCINATION**

	1,5 месяцы months	3,5 месяцы months	6,25 месяцы months	9,75 месяцы months
<b>Вакцина</b> Vaccine	272,6	28,6	0,0	0,0
<b>Вакцина + глютоксим</b> Vaccine + glutoxim	404,9	175,0	0,0	0,0
BCG	249,3	0,0	0,0	0,0



**Рисунок 1. Динамика продукции специфических антител после вакцинации**

Примечание. Серые столбики – вакцина, черные столбики – вакцина + глютоксим, белые столбики – BCG.

Figure 1. Dynamics of vaccination-induced specific antibody production

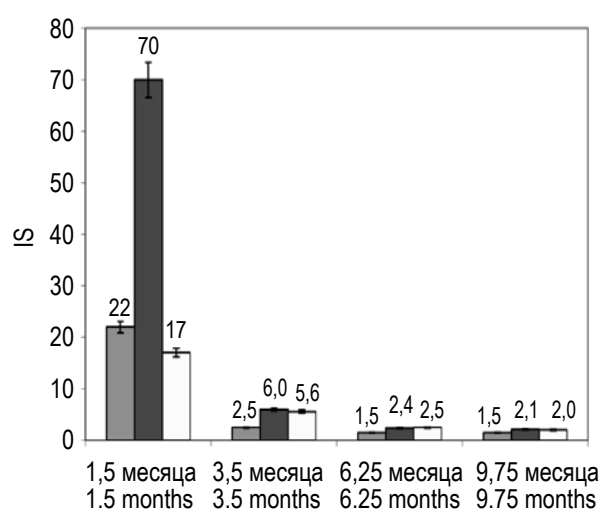
Note. Grey bar, novel vaccine; black bar vaccine + glotoxim; white bar, BCG.

токсिमом, по сравнению с группами, получившими вакцину без дополнительного адьюванта или BCG (рис. 2, табл. 1).

Через 3,5 месяца после вакцинации специфическая пролиферативная активность регистрировалась в группах провакцинированных комбинацией экспериментального комплексного антигена с адьювантом или BCG, но не белком без дополнительного адьюванта. При этом пролиферация успешно активировалась как экспериментальным белком, так и отдельными белками культурального фильтрата микобактерий (рис. 2 и неопубликованные данные).

## Обсуждение

Исходя из незначительной протективной эффективности ревакцинации BCG, в настоящее



**Рисунок 2. Пролиферативный ответ стимулированных экспериментальным белковым антигеном культур лимфоцитов в разные сроки после вакцинации**

Примечание. Серые столбики – вакцина, черные столбики – вакцина + глютоксим, белые столбики – BCG.

Figure 2. Experimental protein antigen-stimulated lymphocyte proliferation at different time points post-vaccination

Note. Grey bar, new vaccine; black bar, vaccine + glotoxim; white bar, BCG.

время ВОЗ не рекомендует повторные инъекции BCG в регионах с высокой заболеваемостью туберкулезом (ТБ). Идеальная вакцина должна создавать эффективную иммунологическую память, способную защитить людей в эндемичных по ТБ регионах. В большинстве случаев единичная вакцинация не способна обеспечить генерацию длительной памяти, что обуславливает необходимость бустерных инъекций для повышения эффективности уже привитой иммунной системы [11, 15]. В настоящее время стратегия повторных вакцинаций применяется в ряде клинических и доклинических испытаний противотуберкулезных вакцин. При этом для повторных инъекций используют либо гомологичные (те же что и для прививания), либо гетерологичные (отличные от прививаемой) вакцины. Схе-

ма гетерологичной ревакцинации подразумевает применение различных средств доставки антигена, таким образом, что иммунизация осуществляется антигеном в составе одного вектора, а буст-иммунизация происходит тем же антигеном в составе другого вектора [6]. Привлекательность данного подхода заключается в преимущественной стимуляции ТБ-специфичных пресуществующих ТСМ к общим антигенам первичной и буст-вакцин. Несмотря на теоретически существующую возможность использования субъединичных вакцин в качестве примиряющих, обычный подход заключается в примирении BCG с последующим бустом субъединичной вакциной, поскольку буст вакциной BCG неэффективен. Целый ряд антигенов *Mtb*, таких как ESAT6, MPT63, Ag85A, Ag85B, Mtb32a, Mtb39a и Hsp60, при использовании в качестве буст-вакцины, стимулировали существенное повышение протекции по сравнению с единичной инъекцией BCG [3, 8, 13]. К настоящему времени несколько субъединичных вакцин находятся на I или II стадии клинических испытаний [7].

В настоящем исследовании мы показали, что двукратное введение сложной по составу вакцины, состоящей из белкового компонента и плазмидной ДНК в сочетании с набором адьювантов, не только генерирует протективный иммунный ответ, но и стимулирует формирование длительной иммунологической памяти. При этом динамика продукции специфических антител после вакцинации значительно отличается от динамики пролиферативного ответа (рис. 1, 2) и продукции  $IFN\gamma$  (табл. 1). Во-первых, отмечалось наличие антител в сыворотке проиммунизированных экспериментальным антигеном мышей в течение всего срока наблюдения, хотя некоторое снижение зарегистрировано к 10-му месяцу после вак-

цинации (рис. 1). Во-вторых, вакцинация BCG очень слабо индуцирует формирование антител к экспериментальному антигену. И, в-третьих, дополнительный адьювант в вакцине до некоторой степени снижает специфическое антителообразование в первые полгода после вакцинации. Показатели специфического антителообразования выравниваются в группах с дополнительным адьювантом и без него лишь к 10-му месяцу после иммунизации животных (рис. 1).

О роли антител в противотуберкулезном иммунитете написаны многочисленные обзоры. Лидирующей концепцией является представление о преимущественно негативном влиянии антител на эффективность защиты организма от туберкулезной инфекции и, напротив, о важной роли реакций клеточного иммунитета в протекции от туберкулеза, хотя имеются и альтернативные мнения [5]. В связи с этим представляется важным отмеченное нами альтернативное воздействие адьюванта на результат вакцинации: стимуляция клеточного компонента на фоне частичного подавления специфического антителообразования. Однако для подтверждения данной концепции требуются дополнительные исследования.

Таким образом, установлено, что испытуемый препарат стимулирует у мышей формирование длительной иммунологической памяти к бактериальному антигену. При этом добавление дополнительного адьюванта смещает спектр иммунологической памяти к «протективному» типу, т.е. стимулирует преобладание клеточного компонента иммунного ответа над гуморальным. Следующим этапом исследования данной вакцины будет изучение эффективности ее применения для ревакцинации после первичной иммунизации BCG.

## Список литературы / References

1. Еремеев В.В., Гергерт В.Я. Изучение способности препарата глутоксим влиять на антимикобактериальную активность фагоцитов чувствительных и устойчивых к туберкулезу мышей // Туберкулез и болезни легких, 2013. № 7. С. 43-47. [Yeremeev V.V., Gergert V.Ya. Investigation of the ability of glutoxim to affect the antimycobacterial activity of phagocytes in tuberculosis susceptible and resistant mice. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2013, no. 7, pp. 43-47. (In Russ.)]
2. Еремеев В.В., Духовлинов И.В., Орлов А.И., Маленко А.Ф., Федорова Е.А., Балазовский М.Б., Гергерт В.Я. Исследование протективных свойств вакцинного препарата на основе рекомбинантных белков Ag85, TB10 и FliC // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С.197-202. [Yeremeev V.V., Dukhovlinov I.V., Orlov A.I., Malenko A.F., Fedorova E.A., Balazovsky M.B., Gergert V.Ya. Studies on protective effects of a vaccine, based on recombinant Ag85, TB10 and FliC proteins. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 197-202. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-197-202.
3. A Randomized, Placebo Controlled, Partially Blinded Phase II Study to Evaluate Safety, Immunogenicity, and Prevention of Infection With *Mycobacterium tuberculosis* of AERAS-404 and BCG Revaccination in Healthy Adolescents (040-404). Available from: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT02075203>.
4. Connor L.M., Harvie M.C., Rich F.J., Quinn K.M., Brinkmann V., Le Gros G., Kirman J.R. A key role for lung-resident memory lymphocytes in protective immune responses after BCG vaccination. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, no. 9, pp. 2482-2492.
5. Coppola M., Arroyo L., van Meijgaarden K.E., Franken K.L., Geluk A., Barrera L.F., Ottenhoff T.H.M. Differences in IgG responses against infection phase related *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) specific antigens in individuals exposed or not to *Mtb* correlate with control of TB infection and progression. *Tuberculosis*, 2017, Vol. 106. pp. 25-32.

6. Fournillier A., Frelin L., Jacquier E., Ahlén G., Brass A., Gerossier E., Holmström F., Broderick K.E., Sardesai N.Y., Bonnefoy J.Y., Inchauspé G., Sällberg M. Heterologous prime/boost vaccination strategy enhances the immunogenicity of therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 208, no. 6, pp. 1008-1019.
7. Kaufmann S.H., Weiner J., von Reyn C.F. Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *Int. J. Infect. Dis.*, 2017, Vol. 56, pp. 263-267.
8. Leroux-Roels I., Forgue S., De Boever F., Clement F., Demoitié M.A., Mettens P., Moris P., Ledent E., Leroux-Roels G., Ofori-Anyinam O.I. Improved CD4<sup>+</sup> T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* in PPD-negative adults by M72/AS01 as compared to the M72/AS02 and Mtb72F/AS02 tuberculosis candidate vaccine formulations: A randomized trial. *Vaccine*, 2013, Vol. 31, no. 17, pp. 2196-2206.
9. Lindenstrom T., Agger E.M., Korsholm K.S., Darrach P.A., Aagaard C., Seder R.A., Rosenkrands I., Andersen P. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 12, pp. 8047-8055.
10. Lindenstrom T., Knudsen N.P., Agger E.M., Andersen P. Control of chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD4 KLRG1- IL-2-secreting central memory cells. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 12, pp. 6311-6319.
11. Lu S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr. Opin. Immunol.*, 2009, Vol. 21, no. 3, pp. 346-351.
12. Orme I.M. The Achilles heel of BCG. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2010, Vol. 90, no. 6, pp. 329-332.
13. Reither K., Katsoulis L., Beattie T., Gardiner N., Lenz N., Said K., Mfinanga E., Pohl C., Fielding K.L., Jeffery H., Kagina B.M., Hughes E.J., Scriba T.J., Hanekom W.A., Hoff S.T., Bang P., Kromann I., Daubenberger C., Andersen P., Churchyard G.J. Safety and immunogenicity of H1/IC31(R), an adjuvanted TB subunit vaccine, in HIV-infected adults with CD4<sup>+</sup> lymphocyte counts greater than 350 cells/mm<sup>3</sup>: a phase II, multi-centre, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 12, e114602. doi: 10.1371/journal.pone.0114602.
14. Soares A.P., Kwong Chung C.K., Choice T., Hughes E.J., Jacobs G., van Rensburg E.J., Khomba G., de Kock M., Lerumo L., Makhetha L., Maneli M.H., Pienaar B., Smit E., Tena-Coki N.G., van Wyk L., Boom W.H., Kaplan G., Scriba T.J., Hanekom W.A. Longitudinal changes in CD4(+) T-cell memory responses induced by BCG vaccination of newborns. *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 207, no. 7, pp. 1084-1094.
15. Tyagi A.K., Nangpal P., Satchidanandam V. Development of vaccines against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 2011, Vol. 91, no. 5, pp. 469-478.
16. Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

---

**Авторы:**

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

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

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

**Шепелькова Г.С.** — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

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

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

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

---

**Authors:**

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

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

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

**Shepelkova G.S.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

**Fedorova E.A.**, Research Fellow, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

---

Поступила 03.07.2017

Отправлена на доработку 22.09.2017

Принята к печати 25.09.2017

---

Received 03.07.2017

Revision received 22.09.2017

Accepted 25.09.2017