

Обзор
УДК 615.371

Перспективы создания новых вакцин для профилактики туберкулеза

А.П. Ткачук, А.С. Карягина, Д.Ю. Логунов, А.Л. Гинцбург

ФГБУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Минздрава России, г. Москва.

Резюме.

Туберкулез остается одним из самых смертоносных инфекционных заболеваний в настоящее время, являясь причиной около 1,4 млн. смертей ежегодно. Вакцинопрофилактика туберкулеза основана на использовании одной из старейших вакцин современности – вакцины БЦЖ, которая позволяет предотвратить большинство случаев детского туберкулеза и, что особенно важно, его диссеминированных форм. Однако БЦЖ не предотвращает реактивацию латентных форм инфекции, и ее невозможно применять при сочетанных иммунодефицитах. Отсюда следует высокая актуальность разработки вакцин нового поколения, которые могли бы дополнить действие БЦЖ, а в будущем и заменить ее. Основными направлениями в разработке вакцин являются предотвращение инфицирования («преинфекционные» вакцины), предотвращение реактивации латентной инфекции («постинфекционные» вакцины) и терапевтические вакцины для предотвращения рецидивов у больных туберкулезом. К числу наиболее перспективных разработок в настоящее время относятся рекомбинантные модифицированные вакцины БЦЖ, аттенуированные штаммы *M. tuberculosis*, субъединичные вакцины и ДНК-вакцины. Настоящий обзор посвящен анализу современных достижений и направлений развития в области создания вакцин для профилактики и борьбы с туберкулезной инфекцией, рассмотрены современные тенденции в области вакцинопрофилактики туберкулеза, особенности взаимодействия иммунитета человека и микобактерий.

Введение.

Несмотря на достигнутый прогресс в области лечения и профилактики инфекционных болезней, они остаются главной причиной заболеваемости и смертности населения [2]. В частности, туберкулез (ТБ) является причиной около 1,4 млн. смертей ежегодно [3]. По результатам оценки вновь регистрируемых случаев заболевания ТБ Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) Россия включена в число 22 стран с наибольшим бременем ТБ. В

России регистрируют около 2,1 % всех новых случаев ТБ, зарегистрированных в мире, и 38,4 %, зарегистрированных в Европе [6].

Большое число смертей от туберкулеза, несмотря на существующую весьма эффективную вакцину БЦЖ и химиотерапевтические средства, связано с тем, что туберкулез является одной из основных причин смерти больных с синдромом приобретенного иммунодефицита. Помимо этого вызывает серьезные опасения распространение лекарственно-резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* и, в особенности, появление штаммов с тотальной лекарственной устойчивостью, распространяющейся на любые из известных в настоящее время противотуберкулезных препаратов [5].

Единственной применяемой в мире вакциной против туберкулеза является БЦЖ (BCG, *Bacillus Calmette-Guerin*), полученная в 1921 г., которая представляет собой живой, аттенуированный штамм *Mycobacterium bovis*. Вакцина достаточно эффективно защищает детей от миллиарного туберкулеза и туберкулезного менингита, но не предотвращает первичного инфицирования. Кроме того БЦЖ не предотвращает реактивацию латентной легочной инфекции, которая является основным источником бациллярного распространения среди населения. Протективный иммунитет, сформированный БЦЖ, со временем снижается, и к 20–25 годам практически исчезает, что приводит к незащищенности взрослого населения как от первичной инфекции, так и от реактивации латентного ТБ [35].

Таким образом, неблагоприятная эпидемическая ситуация с ТБ, распространение сочетанных инфекций и лекарственно-устойчивых штаммов возбудителя на фоне отсутствия иммунопрофилактических препаратов для борьбы с латентной инфекцией и открытыми легочными формами ТБ, делают задачу поиска новых вакцин востребованной в настоящее время.

По оценкам ВОЗ около 2 миллиардов человек на планете уже инфицированы *M. tuberculosis*, из них клиническая картина заболевания проявится только у 10 %, однако микобактерии в покоящемся (дормантном) состоянии у оставшихся 90 % носите-

лей потенциально могут реактивироваться под воздействием самых разнообразных причин, и вызвать открытую форму заболевания. В этой связи важной задачей становится не только создание эффективной профилактической вакцины, но и разработка «постинфекционной» вакцины [10].

Кандидатные вакцины должны вызывать стойкий специфический иммунитет; иметь минимум побочных эффектов и быть приемлемыми по цене для повсеместного использования, что особенно актуально в связи с тем, что 80% всех возникающих вновь случаев ТБ приходится на бедные и социально неблагополучные страны [44]. Кроме того, новые вакцины должны эффективно защищать все группы населения, как ранее вакцинированные БЦЖ, так и инфицированные *M. tuberculosis* и/или ВИЧ, и предупреждать реактивацию микобактерий в дормантном состоянии и возникновение легочных форм туберкулеза.

Особенности вакцинопрофилактики туберкулеза. Вакцина БЦЖ.

БЦЖ представляет собой одну из наиболее широко используемых в настоящее время вакцин, а вакцинация против ТБ до сих пор остается единственным способом ограничения распространения заболевания, охватывая более 80% новорожденных и детей грудного возраста в странах, где она является компонентом национальной программы иммунизации детей [1]. Полученная еще в 1921 г. ослабленная живая вакцина на основе *M. bovis* - штамм БЦЖ, введена в календарь вакцинации России, предусмотрена расширенной программой по иммунизации населения и выпускается 18-ю производителями по всему миру [4]. Для производства вакцины в разных странах используют различные штаммы на основе *M. bovis* - штамм БЦЖ, имеющие генотипические и фенотипические особенности. Благодаря штаммовым особенностям, выпускаемые препараты вакцин имеют некоторые различия по иммуногенности, реактогенности, степени вирулентности [13].

К преимуществам вакцины БЦЖ относят то, что она недорога в получении, достаточно эффективно защищает детей от диссеминированного (милиарного) туберкулеза. Однако, по результатам мета-анализа данных по эффективности БЦЖ, мировое медицинское сообщество в лице ВОЗ пришло к выводу, что вакцина БЦЖ «...не предотвращает первичного инфицирования и, что более важно, не предотвращает реактивацию латентной легочной инфекции, являющейся основным источником ба-

цилярного распространения среди населения. Таким образом, влияние вакцинации БЦЖ на передачу *M. tuberculosis* является ограниченным» [1].

Несмотря на недостатки этой вакцины, ВОЗ по-прежнему рекомендует одну дозу БЦЖ новорожденным, или как можно раньше после рождения, в странах с высокой распространенностью туберкулеза. Основаниями для этой рекомендации являются обеспечение значительной защиты против туберкулеза, угрожающего жизни детей раннего возраста, высокая вероятность раннего контакта с *M. tuberculosis* и короткий инкубационный период при туберкулезном менингите и милиарном туберкулезе.

Особенности взаимодействия *M. tuberculosis* с иммунной системой человека.

Сложность оценки эффективности существующей вакцины для профилактики туберкулеза и разработки новых безопасных и эффективных противотуберкулезных вакцин во многом объясняется тем, что биологическое взаимодействие между *M. tuberculosis* и иммунной системой человека все еще остается не до конца ясным.

Причиной инфекции является проникновение небольшого числа микобактерий в легочные альвеолы, где микобактерии захватываются альвеолярными макрофагами и дендритными клетками и, благодаря своей способности модулировать созревание фагосом и слияние фагосом с лизосомами, остаются там в качестве внутриклеточного паразита [10].

При попадании в организм *M. tuberculosis* не продуцирует токсины и вызывает как клеточный, так и гуморальный иммунные ответы. При этом центральным звеном иммунологической специфичности и памяти в отношении данного возбудителя является клеточный (Th1) ответ. Протективность ассоциируется с Th1 ответом, который активирует продукцию гамма-интерферона (ИНФ-гамма) популяцией CD4+ Т-клеток. ИНФ-гамма выполняет важную роль в защитном иммунитете, активируя макрофаги. Основной комплекс гистосовместимости класса I, представленный популяцией CD8+ Т-клеток, также, по-видимому, выполняет важную роль в обеспечении протективного ответа. Кроме того, антитела, вероятно, влияют на результаты инфицирования, хотя их роль еще предстоит уточнить [19].

Однако развитие иммунологических реакций на вторжение *M. tuberculosis* начинается еще до активации клеточного звена адаптивного иммунитета. Первыми на инфекцию отвечают сами первично инфицированные фагоциты, т.е., элементы врож-

денного иммунитета. Рецепторы врожденного иммунитета фагоцитов, такие как TLR2, 4, 9, лектиновые рецепторы и др., связывают эволюционно консервативные структурные детерминанты (паттерны) разных микроорганизмов. Последующие сигналы от этих рецепторов регулируют экспрессию цитокинов, хемокинов и вспомогательных молекул, участвующих в активации Т-клеток и взаимодействии с другими клетками иммунной системы [19].

В тех случаях, когда инфекцию удается контролировать, *M. tuberculosis* обычно сохраняются в тканях хозяина всю жизнь в латентном состоянии. Реактивация находящихся в состоянии покоя бактерий часто ассоциируется с иммунодефицитом, например у ВИЧ-инфицированных пациентов, однако точные механизмы, приводящие к реактивации, пока непонятны.

Знание механизмов взаимодействия микобактерий с иммунной системой человека при первичном контакте и достижения в области иммунологии реактивации дормантных форм микобактерий имеют важное значение для рациональной разработки будущих лечебных противотуберкулезных вакцин. По мнению многих исследователей с иммунологической точки зрения кандидатная вакцина должна вызывать иммунный ответ со стороны организма, который бы сдерживал размножение микобактерий, ограничивал повреждение тканей и блокировал развитие болезни. Кроме того, вакцина в первую очередь должна активировать клеточное звено иммунитета – пролиферацию CD4+ и CD8+ Т-клеток, синтез ИФН-гамма – который, в отличие от гуморального, определяет устойчивость организма к *M. tuberculosis* [14].

Современные кандидатные вакцины для борьбы с туберкулезом.

Лучшее понимание иммунологических недостатков БЦЖ и расшифровка геномов многих видов микобактерий, клинических изолятов, лабораторных и некоторых вакцинных штаммов БЦЖ открывают возможности для разработки новых перспективных препаратов. В последние годы произошло резкое увеличение числа противотуберкулезных вакцин-кандидатов, проходящих оценку в научных лабораториях (рис. 1).

Основными направлениями в разработке вакцин являются (1) предотвращение инфицирования здоровых людей («преинфекционные» вакцины), (2) предотвращение реактивации латентной инфекции («постинфекционные» вакцины) и (3) предотвращение рецидивов («терапевтические» вакцины) у

больных туберкулезом. К числу наиболее перспективных разработок в настоящее время относятся рекомбинантные модифицированные вакцины БЦЖ, аттенуированные штаммы *M. tuberculosis*, субъединичные вакцины и ДНК-вакцины.

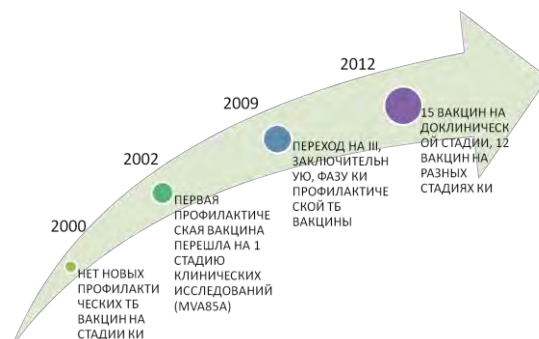


Рисунок 1. Прогресс разработки вакцинных препаратов для предотвращения и лечения туберкулеза первое десятилетие XXI века

Цельноклеточные вакцины. Один из методов модификации существующей вакцины направлен на введение в состав генома вакцинного штамма БЦЖ *M. bovis* дополнительных генов белков, обладающих протективными свойствами, или генов некоторых цитокинов, например, интерлейкина-12 (ИЛ-12), ИФН-гамма, для повышения эффективности вакцины [12]. Например, в работе Вао L. и др. показано, что рекомбинантные штаммы rBCG-1 и rBCG-2, экспрессирующие ESAT-6, индуцировали продукцию ИФН-гамма в спленоцитах, синтез специфических IgG и защищали мышей от заражения ТБ сопоставимо с исходным штаммом БЦЖ [12].

Успешно прошли первую стадию клинических испытаний две кандидатные вакцины: VPM1002 и rBCG30. Вакцина VPM1002 создана на основе штамма rBCG Prague, несущего ген листериолизина *Listeria monocytogenes*, который проникает в фагосому, где находятся бактерии *M. tuberculosis*. Кроме того, из БЦЖ был удален ген уреазы C, который в норме нейтрализует кислотность фагосомы, создавая для действия листериолизина оптимальные условия [23]. Второй кандидат rBCG30 – это штамм rBCG Tice, экспрессирующий Ag85B [25].

Кроме работ по усовершенствованию штамма BCG, проводятся исследования, направленные на получение вакцинных штаммов на основе других видов микобактерий - *Mycobacterium indicus pranii*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium vaccae* [21; 20; 45].

Однако получение и использование цельноклеточных вакцин сопряжено с целым рядом трудностей. Производство препаратов дорогостоящее, требует больших временных затрат и соблюдения повышенных мер безопасности. Необходимо контролировать сохранность реактогенных свойств у цельноклеточных (живых) препаратов. Применение вакцинного штамма может вызвать развитие заболевания, в особенности, у больных с дефицитом иммунной системы. Вакцинные штаммы могут нести факторы патогенности природного возбудителя, вызывать избыточную стимуляцию иммунной системы хозяина балластными белками самого штамма и агентами, используемыми для аттенуации.

ДНК-вакцины. Разработка ДНК-вакцин связана с получением генов протективных белков в составе плазмидного вектора или генома рекомбинантного вируса, экспрессирующих гены белков в иммунизируемом организме. В работах Denis O. и др. и Lozes E. и др. на разных моделях показано, что применение препарата, кодирующего белок Ag85A, стимулировало специфическую продукцию ИФН-гамма у экспериментальных животных [16; 31]. Введение ДНК-вакцины, экспрессирующей Ag85B, на порядок увеличивало количество Т-клеток, продуцирующих ИФН-гамма, наблюдалось снижение бактериальной нагрузки в селезенке, легких у мышей линии C57Bl/6 [26].

На разных стадиях клинических испытаний находятся препараты: Oxford MVA85A/ AERAS-485 – модифицированный вакцинный вектор Ancara, экспрессирующий белок Ag85A [33]; CrucellAg35/AERAS-402 – вектор на основе рекомбинантного аденовируса серотипа 35, экспрессирующий белки Ag85A, Ag85B, TB10.4 [24]. Среди ДНК-вакцин, проходящих доклинические испытания, можно отметить препарат HG856A, в состав которого входит ДНК, кодирующая белки Ag85A, Ag85B, ESAT-6 [30].

Разрабатываемые препараты ДНК-вакцин являются весьма перспективными, однако в сравнении с цельноклеточными вакцинами обладают значительно меньшей иммуногенностью; нуждаются в особых условиях хранения. До конца не решенным остается вопрос о контроле экспрессии протективных антигенов внутри организма после инъекции препарата и судьбе ДНК-вектора.

К сожалению, последние данные об эффективности наиболее изученной кандидатной вакцины MVA85A/AERAS-485 показали ее неэффективность в качестве бустерной вакцины для предотвращения инфицирования детей. Испытания MVA85A на детях

были проведены в Южной Африке, в окрестностях Кейптауна, с 2009 по 2011 год. В них приняли участие, в общей сложности, около трех тысяч здоровых младенцев в возрасте от четырех до шести месяцев, ранее получивших прививку БЦЖ. По случайной выборке половина из них были привиты MVA85A, а остальные дети – плацебо, после чего каждые три месяца проводился мониторинг состояния их здоровья вплоть до трехлетнего возраста. На протяжении этого периода туберкулезом заразились 32 ребенка, привитых MVA85A, и 39 детей, получивших плацебо. Таким образом, эффективность вакцины составила около 17 процентов, что авторы сочли статистически незначимым показателем [41].

Субъединичные вакцины. Основу субъединичных вакцин составляют отдельные полученные генно-инженерным способом очищенные иммуногенные белки. Такие препараты считаются наиболее перспективными, поскольку содержат антигены с известными биологическими свойствами, лишены балластных белков и нуклеиновых кислот, вызывающих дополнительную стимуляцию иммунитета. На разных стадиях клинических испытаний находятся вакцинные препараты: Hybrid-I+IC-31, в состав которого входит слитный белок Ag85B-ESAT-6 [17]; GSK M72 на основе рекомбинантных антигенов микобактерий – белков Rv1196 и Rv0125 в сочетании с липосомным адъювантом [36] и HyVac 4/AERAS-404, который также содержит несколько рекомбинантных белков микобактерий в качестве антигена и адъювант на основе лигандов рецепторов врожденного иммунитета – CpG олигонуклеотидов [39].

Субъединичная вакцина GSK M72.

Компания GlaxoSmithKline Biologicals (GSK) совместно с Aeras приступает ко второй стадии клинических испытаний субъединичной вакцины GSK M72 в сочетании с адъювантом AS01 собственной разработки. Первые результаты испытаний показали, что вакцина хорошо переносится и индуцирует образование популяции CD4+ Т-лимфоцитов, характерных для Th1 ответа, которые сохраняются не менее трех лет. При использовании вакцины не было отмечено никаких серьезных осложнений, что позволило продолжить клинические испытания и перейти к исследованиям действия вакцины на контингенте ВИЧ-инфицированных добровольцев и пациентов с выявленным ТБ, на которых предполагается оценить возможность использования вакцины после курса антибиотикотерапии для сокращения сроков лечения [29].

**Субъединичные вакцины *HuVac4/AERAS-404*,
Hybrid-1 + IC31, *Hybrid-1 + CAF01* и *SSI H56-IC31*.**

Датский институт вакцин (The Statens Serum Institute (SSI)), ведет разработку сразу нескольких субъединичных вакцин на основе рекомбинантных антигенов *M. tuberculosis*. Стратегия создания вакцин включает в себя объединение нескольких иммунодоминантных антигенов *M. tuberculosis* в одну белковую молекулу и ее формулирование с адъювантами разных типов – лигандами TLR9 рецепторов, CpG олигонуклеотидами, иммобилизованными на поликатионном пептиде KLK (адъювант под названием «IC31») [9]; либо с липосомным адъювантом CAF01 [22]. Вакцина *HuVac4/AERAS-404* (известна также как SSI/SP H4-IC31) содержит в своем составе антиген H4, полученный путем слияния микобактериальных белков Ag85B и TB10.4, сорбированный на IC31. SSI разрабатывает эту вакцину совместно с Aeras, TBVI, Intercell и Sanofi Pasteur. Aeras заканчивает 1 стадию клинических испытаний нового препарата на здоровых добровольцах. H1 вакцина по своему строению очень похожа на *HuVac4*, но вместо антигена TB10.4 содержит ESAT6 – секреторный белок микобактерий, обнаруживаемый на ранних стадиях болезни. Исследования эффективности кандидатных вакцин, особенно в сочетании с адъювантом IC31, показали, что данные препараты индуцируют образование CD4+ Т-лимфоцитов, продукцию ими ИНФ-гамма, что важно для борьбы с ТБ, а также формирование клеток памяти на срок не менее 2,5 лет, причем как у лиц, не

вакцинированных предварительно БЦЖ, так и у добровольцев, вакцинированных БЦЖ.

Наиболее перспективным препаратом SSI можно считать их последнюю разработку – вакцину H56, которая включает в себя помимо белков ранней фазы заболевания, белок, характерный для латентной инфекции (см. далее).

К недостаткам субъединичных препаратов можно отнести дорогостоящую очистку вакцинного антигена, особенно от балластных белков штамма-продуцента и ЛПС в случае экспрессии в *E. coli*; сложность в получении препаратов, обладающих сильными иммуногенными и протективными свойствами. Однако, несмотря на недостатки, субъединичные генно-инженерные противотуберкулезные препараты считаются одними из самых перспективных, т.к. они менее реактогенны по сравнению с цельноклеточными вакцинами, лишены дополнительных факторов патогенности, обладают хорошими иммунологическими характеристиками в сочетании с адъювантами. Грамотный выбор адъюванта решает проблему недостаточной иммуногенности рекомбинантных белков субъединичных вакцин и позволяет стимулировать нужный тип иммунного ответа.

В настоящее время доклинические испытания на разных стадиях проходят уже около 15 препаратов и еще 12 находятся на стадии клинических исследований (табл.1).

Таблица 1. Кандидатные вакцины для профилактики и лечения туберкулеза.

Стадия разработки	Название препарата	Состав, ссылки	Производитель	Механизм действия	Целевой контингент
3 фаза клинических исследований	MIP (<i>M. indicus pranii</i>)	Инактивированная цельноклеточная вакцина на основе сапрофитного штамма микобактерий <i>M. indicus pranii</i>	Министерство науки и технологии Индии, M./s Cadila Pharmaceuticals, Индия	Иммунотерапия	Все категории больных ТБ
	<i>M. vaccae</i>	Инактивированная цельноклеточная вакцина на основе сапрофитного штамма микобактерий <i>M. vaccae</i>	NIH, Immudilon	Иммунотерапия, boost, постинфекционная вакцина	БЦЖ-вакцинированные ВИЧ+ взрослые

2 фаза клинических исследований	MVA85A/AERAS-485	Рекомбинантный вирусный вектор Анкара, экспрессирующий микобактериальный антиген Ag85A	Oxford-Emergent Tuberculosis Consortium (OETC), AERAS	Бустерная постинфекционная вакцина, иммунотерапия	БЦЖ-вакцинированные взрослые и подростки, ВИЧ-инфицированные взрослые
	AERAS402/Crucell Ad35	Вакцина на основе аденовирусного вектора серотипа 35, экспрессирующего Ag85A, Ag85B, TB10.4	Crucell, Aeras	Бустерная постинфекционная вакцина, иммунотерапия	Подростки/взрослые
	M72+ AS01	Рекомбинантный белок, полученный путем слияния двух микобактериальных антигенов – белков Rv1196 и Rv0125 в сочетании с адъювантом AS01 (липосомальный адъювант с MPL и QS21)	GSK, Aeras	Бустерная постинфекционная вакцина	Дети/подростки/взрослые
	Hybrid1+ IC31	Рекомбинантный белок, полученный слиянием микобактериальных антигенов – белков Ag85B и ESAT6 в сочетании с адъювантом IC31 на основе полилизинного пептида, на поверхности которого иммобилизованы CpG олигонуклеотиды	SSI, TBVI, EDCTP, Intercell	Prime, boost, постинфекционная	Подростки/взрослые
	RUTI	Фрагменты клеточных стенок микобактерий, объединенные в липосомы	Archivel Farma	Терапевтическая вакцина	Подростки/взрослые
	VPM 1002	Живая вакцина - рекомбинантная БЦЖ (BCG Prague), экспрессирующая листериолизин и несущая делецию урезы UreC	Max Plank, Vakzine Projekt Management GmbH, TBVI	Prime, boost	Все категории, замена БЦЖ

1 фаза клинических исследований	AdAg85A	Аденовирусный вектор 5, экспрессирующий антиген Ag85A	McMaster University	Prime, boost, постинфекционная	Взрослые/ подростки, ВИЧ инфицированные
	Hybrid1+ CAF01	Рекомбинантный белок, полученный слиянием микобактериальных антигенов – белков Ag85B и ESAT6 в сочетании с адъювантом CAF01, состоящим из иммуностимулирующего синтетического гликолипида TDB (Trehalose-Dibehenate), заключенного в катионные DDA (Dimethyldioctadecylammonium bromide) липосомы	SSI, TBVI	Prime, boost, иммунотерапия	Подростки/ взрослые
	Hybrid56+ IC31	Рекомбинантный белок, полученный слиянием микобактериальных антигенов – белков Ag85B, ESAT6 и Rv2660 (белок латентной фазы) в сочетании с адъювантом IC31(см. выше)	SSI, Aeras, Intercell	Prime, boost, постинфекционная	Подростки/ взрослые
	HyVac4/AERAS-404+IC31	Рекомбинантный белок, полученный слиянием микобактериальных антигенов – белков Ag85B, TB10.4 в сочетании с адъювантом IC31 (см. выше)	SSI, Aeras, Intercell, Sanofi-pasteur	Boost	Дети
	AERAS-422	Живая вакцина – рекомбинантная БЦЖ, суперэкспрессирующая белки Ag85A, Ag85B и Rv3407	Aeras	Prime, замена БЦЖ	Дети
	<i>M. smegmatis</i>	Цельноклеточная вакцина на основе непатогенного вида микобактерий <i>M. smegmatis</i>	AERAS	Иммунотерапия	Взрослые/ подростки, ВИЧ инфицированные
	rBCG30	Живая вакцина – рекомбинантная БЦЖ, суперэкспрессирующая белок Ag85B	UCLA, NIH, NIAID, AERAS	boost, постинфекционная	Все категории

Доклинические исследования	НВНА	Метилированный 21 кДа природный белок из <i>M. bovis</i> BCG	Institute Pasteur of Lille, INSERM, TBVI, Aeras	Prime, boost, иммунотерапия, постинфекционная	Дети/ подростки/ взрослые
	HG85A	ДНК вакцина – вектор, кодирующий белок Ag85A	Shanghai H&G Biotech	Boost, иммунотерапия	Взрослые/ подростки
	MTBVAC	Живая вакцина на основе аттенюированного штамма <i>M. tuberculosis</i> с делецией <i>phoP</i> и <i>fadD26</i> без генов антибиотикоустойчивости	Institute Pasteur, BIOFABRI	Prime, замена БЦЖ	Дети/ подростки/ взрослые

Гетерогенная ревакцинация как метод повышения эффективности иммунопрофилактики туберкулеза.

Важным фактором успеха иммунопрофилактики инфекционных заболеваний является не только состав вакцины, но и схема иммунизации. Было установлено, что повторное введение вакцины приводит к значительному росту титра антител и, как следствие, к лучшему протективному ответу на проникновение патогена. Однако, такое положение дел характерно, прежде всего, для инфекций, вызывающих преимущественно гуморальный иммунный ответ. *M. tuberculosis* является внутриклеточным патогеном, и роль гуморального ответа в защите от него все еще остается дискуссионной. Ключевую же роль играет клеточный иммунитет. В этом случае ревакцинация не приводит к увеличению эффективности вакцинации.

Один из предлагаемых подходов для повышения эффективности вакцинации – это схема так называемой гетерологичной прайм-буст (prime-boost, от англ. поддержка главного) вакцинации, когда для первичной иммунизации («prime») используется вакцина БЦЖ, а для последующих ревакцинаций («boost») – разрабатываемые препараты нового поколения [28].

Механизм действия прайм-буст иммунизации до конца не выяснен. Выдвинуто несколько гипотез, которые пытаются объяснить этот феномен. В частности, предполагается, что ревакцинация (буст) увеличивает протективность вакцинации в целом за счет того, что вторичная иммунизация гетерологичной вакциной приводит к активации небольшой группы уже существующих долговременных Т-клеток CD4+ и CD8+ фенотипа, которые сформировались под действием иммунодоминантных антигенов первичной (прайм) вакцины [33].

Впервые такая стратегия вакцинации была апробирована на вакцине на основе модифицированного вируса Анкара для стимулирования Т-клеточного иммунного ответа против малярии [38]. Успех «prime-

boost» иммунизации положил начало направлению создания новых бустерных вакцин, создаваемых в качестве препаратов поддержки БЦЖ.

Стратегии увеличения эффективности противотуберкулезных субъединичных вакцин с помощью современных молекулярных адъювантов.

Сегодня адъюванты, наряду с вакцинным(и) антигеном(ами), являются одним из неотъемлемых компонентов вакцин. При введении в организм молекулы адъюванта способны не только депонировать вакцинный антиген (обеспечивают длительное сохранение антигена в организме, положительно влияющее на эффективность иммунизации), но и напрямую повышают его иммуногенность, дополнительно стимулируя развитие иммунных реакций.

Изучение молекулярных механизмов активации и регуляции реакций врожденного и приобретенного иммунитета позволило определить принцип действия широко применяемых по настоящий день адъювантов. Так, используемый в качестве адъюванта гидроксид алюминия способен индуцировать иммунные реакции (секрецию ИЛ-1 β , ИЛ-18; усиление фагоцитоза антигенов), активируя рецептор NLRP3, который относится к семейству цитоплазматических NOD-подобных рецепторов [18]. Полный адъювант Фрейнда обеспечивает мощную стимуляцию иммунных реакций посредством активации сразу нескольких паттерн-распознающих рецепторов, принадлежащих к различным семействам – TLR2 (Toll-подобный рецептор 2) и TLR4 [42]. В результате такого взаимодействия происходит выброс цитокинов и хемокинов, привлекающих в очаг введения антигена иммунокомпетентные антиген-презентирующие клетки. Это в свою очередь играет решающую роль в формировании эффективной иммунной памяти к вакцинному антигену [27].

Таким образом, сегодня становится понятным, что способность адъювантов повышать иммуногенность вакцинного антигена при совместном их применении реализуется через взаимодействие с паттерн-распознающими рецепторами, активация которых приводит к дополнительной стимуляции иммунных реакций. Согласно полученным данным, представляется возможным использовать вместо эмпирически подобранных адъювантов препараты, содержащие изолированные лиганды паттерн-распознающих рецепторов. В отличие от классических адъювантов, (оксид алюминия, адъювант Фрейнда и др.) молекулярные адъюванты представляют собой высокоочищенные или химически синтезированные молекулы микробного происхождения, обладающие одновременно большей иммуностимулирующей активностью и безопасностью. Кроме того, в зависимости от химической природы (липептид, олигонуклеотид, гликопептид и др.), каждый молекулярный адъювант способен индуцировать свой специфический спектр иммунных реакций [32]. Использование таких молекулярных адъювантов позволит добиться не только направленной индукции развития тех иммунных реакций, которые необходимы для формирования максимально эффективной защиты организма против того или иного патогена, но и максимально снизить возможные побочные эффекты, которые могут приносить адъюванты.

Перспективность вышеописанного подхода подтверждается большим количеством стартовавших клинических испытаний, в которых изучается возможность использования различных лигандов паттерн-распознающих рецепторов в качестве молекулярных адъювантов.

Примером такого молекулярного адъюванта в составе кандидатной генно-инженерной субъединичной вакцины для борьбы с ТБ является разработка GlaxoSmithKline Biologicals - адъювант AS02 в виде эмульсии с малотоксичным производным липида А (MPLA) в сочетании с сапонином QS21 (производное коры южно-американского дерева *Quillaja saponaria*) и его модификация без MPLA (монофосфорил липид А) – AS01 [29]. За счет высокой иммуностимулирующей активности и безопасности все большую популярность приобретает адъювант IC31 на основе CpG олигонуклеотидов – лигандов TLR9, разрабатываемый Intercell. Не менее трех субъединичных вакцин, в составе которых в качестве адъюванта присутствует IC31, находятся сейчас на стадии клинических исследований. И наконец, стоит отметить адъювант CAF01 [22] на основе синтетического гликолипида TDB в составе липосом.

Эффективность применения молекулярных адъювантов была подтверждена также при использовании вакцин, содержащих помимо протективных антигенов, лиганды паттерн-распознающих рецепторов. Например, было показано, что рекомбинантный аденовирус, экспрессирующий слитый белок, состоящий из флагеллина (лиганд TLR5) и антигена Ag85B *M. tuberculosis* способен индуцировать более эффективный иммунный ответ против микобактериальной инфекции по сравнению с рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим немодифицированный белок Ag85B [7].

Помимо Toll-подобных рецепторов, взаимодействие представителей другого семейства паттерн-распознающих рецепторов NOD1 и NOD2 с собственными лигандами также приводит к активации транскрипционного фактора NF-κB, регулирующего развитие большинства иммунных реакций. Описанное свойство NOD рецепторов, а также их цитоплазматическая локализация позволяет рассматривать лиганды данных рецепторов в качестве перспективных молекулярных адъювантов, особенно при создании вакцин против внутриклеточных патогенов, таких как *M. tuberculosis*.

Полученные данные свидетельствуют о возможности создания адъювантов нового поколения, состоящих из композиций молекулярных адъювантов различных типов (лигандов различных рецепторов врожденного иммунитета), которые позволят при сохранении минимального побочного действия вакцинного препарата добиться значимого повышения иммуногенности вакцинного антигена и, как следствие, эффективности проводимой вакцинации.

Сегодня становится очевидным, что совершенствование существующих вакцинных препаратов может быть достигнуто не только за счет использования в составе вакцины высокоочищенных антигенов (или микробных культур), но и за счет грамотного направленного подбора современных молекулярных адъювантов, входящих в состав вакцины. Причем подбор адъюванта имеет не менее важное значение для формирования протективного иммунитета, чем выбор антигена.

Перспективные терапевтические вакцины для сокращения сроков лечения туберкулеза.

Терапевтические вакцины направлены на предотвращение реактивации латентного ТБ, и необходимы в качестве средства сопутствующей иммунотерапии для совместного применения с антибиотиками с целью сокращения сроков лечения ТБ, которые в настоящий момент времени могут дости-

гать 9 месяцев. Разработку и применение таких вакцин сдерживает возможный риск для здоровья пациента, связанный с развитием побочных иммунологических реакций гиперчувствительности на фоне введения высокой концентрации микобактериальных антигенов, описанный около 100 лет назад первооткрывателем возбудителя ТБ Робертом Кохом [37]. В связи с этим крайне важной задачей становится грамотный выбор антигенов и способов иммунотерапии.

Одним из первых препаратов, которые позиционируются как иммунобиологические препараты для комбинированного применения совместно с традиционной антибиотикотерапией для сокращения сроков лечения туберкулезной инфекции, является препарат RUTI [43]. RUTI представляет собой фрагменты клеточных стенок микобактерий, которые термически (автоклавирование) или химически (формальдегид) инактивированы. В качестве способа доставки авторы использовали липосомы. Доклинические исследования на мышинной модели ТБ показали, что использование RUTI совместно с антибиотиками сокращает число микобактерий, выживших после химиотерапии. На настоящий момент проведены успешные клинические испытания 1 и 2а фазы, в стадии завершения находится 2b стадия. Есть все основания полагать, что данный препарат сможет найти применение в клинике в ближайшее время, однако, однозначно ответить на вопрос об эффективности препарата можно будет только через некоторое время после применения в реальной практике. Недостатком препарата RUTI является сложность контроля его состава и невозможность однозначно объяснить механизм действия препарата.

Еще одна разрабатываемая терапевтическая вакцина - ID93/GLA-SE - построена по другому принципу. Препарат представляет собой генно-инженерную субъединичную вакцину, которая содержит 4 слитых микобактериальных антигена семейства Esx и PPE, в том числе один из белков, который экспрессируется в латентной фазе инфекции. Рекомбинантный антиген сформулирован с молекулярным адъювантом – агонистом TLR4 рецептора – глюкопираниозил-липидом А (GLA). Доклинические исследования, которые проводились на модели туберкулезной инфекции на линии инбредных чувствительных мышей (SWR/J) и обезьянах (*Macaca fascicularis*) показали достоверное снижение микобактериальной нагрузки в органах лабораторных животных при использовании препарата

после курса антибиотикотерапии, что позволило сократить на треть сроки лечения [11].

Есть попытки использовать в качестве терапевтических вакцин препараты на основе инактивированных родственных микобактерий - *M. indicus pranii*, *M. smegmatis*, *M. vaccae*. Один из первых препаратов такого рода был сделан на основе *M. indicus pranii* – вида непатогенных микобактерий, которые являются близкими «родственниками» *M. tuberculosis*. К этой же группе препаратов относятся вакцины на основе *M. smegmatis* и *M. vaccae*. Все кандидатные вакцины продемонстрировали свою эффективность в качестве иммуностимуляторов и могут позволить сократить сроки антибиотикотерапии у больных ТБ при совместном применении с традиционными лекарственными средствами [21; 20; 45]. В настоящее время все перечисленные препараты проходят клинические испытания.

Интересным препаратом, который претендует на роль не только профилактического, но и терапевтического средства, является модифицированный вариант рекомбинантной субъединичной вакцины H1 – вакцина H56, созданная на основе тригибридного белка, который включает в себя белки ранней фазы инфекции – Ag85B, ESAT6 и белок, синтезируемый *M. tuberculosis* в латентный период, Rv2660c. По результатам доклинических исследований, проведенных на мышинной модели ТБ и обезьянах, вакцина предотвращает реактивацию латентного туберкулеза и сокращает сроки антибиотикотерапии при совместном использовании с химиотерапевтическими препаратами [8]. В настоящее время начинаются клинические испытания этой вакцины.

К сожалению, отсутствие полной картины взаимодействия врожденного и адаптивного иммунитета человека с патогеном пока не позволяют создать эффективный терапевтический препарат с известным механизмом действия, а значит - с прогнозируемой эффективностью и токсичностью.

Заключение.

Всемирная организация здравоохранения и Международная некоммерческая организация TuBerculosis Vaccine Initiative (TBVI), деятельность которой сосредоточена на консолидации усилий мирового сообщества для поиска эффективных вакцин для профилактики и лечения туберкулеза, поставили перед собой весьма амбициозную, но выполнимую задачу – добиться снижения бремени туберкулеза на 50 % уже к 2015 году и полностью элиминировать туберкулез как социальную про-

блему (заболеваемость ниже 1 случая на 1 млн. чел.) к середине XXI века. Безусловно, что выполнение этих целей немыслимо без создания новых вакцин для борьбы с туберкулезом.

Прогресс в области молекулярной иммунологии, генетики и геномной инженерии позволяет надеяться на то, что в ближайшие 2-3 года мы увидим препарат, который сможет встать на защиту от ТБ инфекции вместе с БЦЖ, а к 2025 году появится эффективная вакцина, которая сможет не только предотвращать первичное инфицирование микобактериями, но и защищать уже инфицированных людей от реактивации латентных форм инфекции. По-видимому, такая вакцина будет представлять из себя препарат, состоящий из ряда высокоиммуногенных протективных рекомбинантных антигенов и безопасных молекулярных адъювантов, избирательно активирующих выбранные звенья иммунитета для быстрого сбалансированного ответа на вторжение в организм патогена и его элиминации, а также сохранения длительной иммунологической памяти с целью предотвращения повторной инфекции.

Список литературы.

1. ВОЗ. Вакцина БЦЖ. Документ по позиции ВОЗ, 2009
http://www.who.int/immunization/BCG_8May2008_RU.pdf
2. Доклад Всемирной организации здравоохранения о глобальной борьбе с туберкулезом / ВОЗ, 2012,
http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_execsummary_ru.pdf
3. Доклад Всемирной организации здравоохранения: шестьдесят пятая сессия всемирной ассамблеи здравоохранения / ВОЗ 2012,
http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA65/A65_22-ru.pdf
4. Национальный календарь профилактических прививок Российской Федерации.
URL:http://www.epidemiolog.ru/calendar/detail.php?ELEMENT_ID=3765
5. Татьков С. И., Дейнеко Е. В., Фурман Д. П. // Перспективы создания противотуберкулезных вакцин нового поколения.- Вавиловский журнал генетики и селекции – 2011. – №1 – С.114–129.
6. Туберкулез в Российской Федерации, 2010 г. / Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации. – М., 2011. – 280 с.
7. Щербинин Д.Н., Шмаров М.М., Народицкий Б.С. Исследование вакцинных противотуберкулезных препаратов на основе рекомбинантных аденовирусов в экспериментальной модели на мышах // Туберкулез и болезни лёгких. – 2010. – №10. – С. 50-53
8. Aagaard C., Hoang T., Dietrich J., Cardona P.J., Izzo A., Dolganov G., Schoolnik G.K., Cassidy J. P., Billeskov R., Andersen P. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure // *Nature medicine* – 2011. – Vol. 17, № 2. – P.189-194
9. Agger E.M., Rosenkrands I., Olsen A.W., Hatch G., Williams A., Kritsch C., Lingnau K., von Gabain A., Andersen C.S., Korsholm K.S., Andersen P. Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24, №26. – P. 5452–5460
10. Ahmad S. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection // *Respiratory Research*. – 2010. – Vol. 11, № 1. – P. 169.
11. Baldwin S.L., Bertholet S., Reese V.A., Ching L.K., Reed S.G., Coler R.N. The importance of adjuvant formulation in the development of a TB vaccine // *Journal of immunology*. – 2012. – Vol. 188, №5. – P. 2189–2197
12. Bao L. Virulence, immunogenicity, and protective efficacy of two recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin strains expressing the antigen ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* // *IAI*. – 2003. – Vol. 71, № 4. – P. 1656-1661.
13. Brosch R. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 104, № 13. – P. 5596-5601.
14. Cayabyab M.J., Macovei L., Campos-neto A., Izzo A., State C. Current and novel approaches to vaccine development against tuberculosis // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2012. – Vol. 2, №12. - P. 1–16.
15. Delogu G., Fadda G. The quest for a new vaccine against tuberculosis // *The Journal of Infection in Developing Countries*. – 2009. – Vol. 3, № 1. – P 5-15.
16. Denis O., Tanghe A., Palfliet K., Jurion F., van den Berg T.P., Vanonckelen A., Ooms J., Saman E., Ulmer J.B., Content J., Huygen K. Vaccination with plasmid DNA encoding mycobacterial antigen 85A stimulates a CD4+ and CD8+ T-Cell epitopic repertoire broader than that stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infection // *Infect Immun*. – 1998. - Vol. 66, № 4. – P. 1527-1533.

17. Dietrich J., Aagaard C., Leah R., Olsen A.W., Stryhn A., Doherty T.M., Andersen P. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy // *J. Immunol.* - 2005. - Vol. 174. - P. 6332-6339.
18. Eisenbarth S.C., Colegio O.R., O'Connor W., Sutterwala F.S., Flavell R.A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature.* - 2008. - №453. - P.1122-1126.
19. Ernst J.D. The immunological life cycle of tuberculosis // *Nature Reviews Immunology.* - 2012. - Vol. 12, № 8. - P. 581-591.
20. Faludi I., Szabó A.M., Burián K., Endrész V., Miczák A. Recombinant *Mycobacterium smegmatis* vaccine candidates // *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* - 2011. - Vol.58:13-22. doi: 10.1556
21. Faujdar J., Gupta P., Natrajan M., Das R., Chauhan D. S., Katoch V. M., Gupta U. D., *Mycobacterium indicus pranii* as stand-alone or adjunct immunotherapeutic in treatment of experimental animal tuberculosis // *Indian J Med Res.* - 2011. - Vol. 134, № 5. - P. 696-703
22. Gram G.J., Karlsson I., Agger E.M., Andersen P., Fomsgaard A. A novel liposome-based adjuvant CAF01 for induction of CD8(+) cytotoxic T-lymphocytes (CTL) to HIV-1 minimal CTL peptides in HLA-A*0201 transgenic mice. // *PLoS one.* - 2009. - Vol. 4, №9. - P.e6950
23. Grode L., Seiler P., Baumann S., Hess J., Brinkmann V., Nasser Eddine A., Mann P., Goosmann C., Bandermann S., Smith D., Bancroft G.J., Reyrat J.M., van Soolingen D., Raupach B., Kaufmann S.H. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin // *The Journal of Clinical Investigation.* - 2005. - Vol. 115, № 9. - P. 2472-2479.
24. Havenga M., Vogels R., Zuijdgeest D., Radosevic K., Mueller S., Sieuwerts M., Weichold F., Damen I., Kaspers J., Lemckert A., van Meerendonk M., van der Vlugt R., Holterman L., Hone D., Skeiky Y., Mintardjo R., Gillissen G., Barouch D., Sadoff J., Goudsmit J. Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells // *Journal of General Virology.* - 2006. - Vol. 87. - P. 2135-2143.
25. Horwitz M.A., Harth G., Dillon B.J., Maslesa-Galic S. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model // *PNAS.* - 2000. - Vol. 97, № 25. - P. 13853-13858.
26. Kamath A.T., Groat N.L., Bean A.G., Britton W.J. Protective effect of DNA immunization against mycobacterial infection is associated with the early emergence of interferon-gamma (IFN-g)-secreting lymphocytes // *Clinical and Experimental Immunology.* - 2000. - Vol. 120. - P. 476-482.
27. Kasturi S.P. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity // *Nature.* - 2011. - Vol. 470. - P.543-550
28. Kaufmann S.H.E. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost // *Trends in immunology.* - 2005. - № 12. - P.660-667
29. Leroux-Roels I., Forgas S., Boever F. De, Clement F., Demoitié M.A., Mettens P., Moris P., Ledent E., Leroux-Roels G., Ofori-Anyinam O. Improved CD4(+) 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.19, №5. - P. 2196-2206.
30. Li Z., Song D., Zhang H., He W., Fan X., Zhang Y., Huang J., Wang X., Liu Q., Xiong S. Improved humoral immunity against tuberculosis ESAT-6 antigen by chimeric DNA prime and protein boost strategy // *DNA and cell biology.* - 2006. - Vol. 25, № 1 - P. 25-30.
31. Lozes E., Huygen K., Content J., Denis O., Montgomery D.L., Yawman A.M., Vandebussche P., Van Vooren J.P., Drowart A., Ulmer J.B., Liu M.A. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex // *Vaccine.* - 1997. - Vol. 15, № 8. - P. 830-833.
32. McKee A.S., Munks M.W., Marrack P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants // *Immunity.* - 2007. - №5. - P.687-690.
33. McShane H., Hill A. Prime-boost immunisation strategies for tuberculosis. // *Microbes and infection / Institut Pasteur.* - 2005. - Vol. 7, № 5-6. - P. 962-967
34. McShane H., Pathan A.A., Sander C.R., Keating S.M., Gilbert S.C., Huygen K., Fletcher H.A., Hill A.V. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans // *Nat. Med.* - 2004. - Vol. 10, № 11. - P. 1240-1244.
35. Ottenhoff T. H. M., Kaufmann S. H. E. Vaccines against Tuberculosis : Where Are We and Where Do

- We Need to Go ? // *Plos pathogens*. – 2012. – Vol. 8, № 5. – P.e1002607
36. Reed S.G., Coler R.N., Dalemans W., Tan E.V., Dela E.C., Basaraba R.J., Orme I.M., Skeiky Y.A.W., Anderson M.R., Cowgill K.D., Prieels J., Abalos R.M., Dubois M., Cohen J., Mettens P., Lobet Y. Defined tuberculosis vaccine, Mtb72F/AS02A, evidence of protection in cynomolgus monkeys // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106, № 7. – P.1–6
37. Rook G.A., Stanford J.L.(.). The Koch phenomenon and the immunopathology of tuberculosis // *Curr.Top.Microbiol.Immunol*. – 1996. – Vol. 215. – P.239–262
38. Schneider J, Gilbert S.C., Blanchard T.J., Hanke T., Robson K.J., Hannan C.M., Becker M., Sinden R., Smith G.L., Hill A.V. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. // *Nat. Med.* – 1998. – № 4. – P.397-402.
39. Skeiky Y.A. W., Dietrich J., Lasco T.M., Stagliano K., Dheenadhayalan V., Goetz M.A., Cantarero L., Basaraba R.J., Bang P., Kromann I., McClain J.B., Sadoff J.C., Andersen P. Non-clinical efficacy and safety of HyVac4:IC31 vaccine administered in a BCG prime-boost regimen // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28, № 4. – P.1084–1093.
40. Sugawara I. Protective efficacy of recombinant (Ag85A) BCG Tokyo with Ag85A peptide boosting against *Mycobacterium tuberculosis*-infected guinea pigs in comparison with that of DNA vaccine encoding Ag85A // *Tuberculosis*. – 2007. – Vol. 87, № 2. – P. 94-101
41. Tameris M.D., Hatherill M., Landry B.S., Scriba T.J., Snowden M.A., Lockhart S., Shea J.E., McClain J.B., Hussey G.D., Hanekom W.A., Mahomed H., McShane H. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. // *Lancet*. – 2013. – №2. pii: S0140-6736(13)60177-4. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60177-4.
42. Tsuji S., Matsumoto M., Takeuchi O., Akira S., Azuma I., Hayashi A., Toyoshima K., Seya T. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin: involvement of toll-like receptors. // *Infect Immun*. – 2000. – Vol. 68, №12. – P.6883-6890.
43. Vilaplana C., Montané E., Pinto S., Barriocanal A.M., Domenech G., Torres F., Cardona P.J., Costa J. Double-blind, randomized, placebo-controlled Phase I Clinical Trial of the therapeutical antituberculous vaccine RUTI. // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28, №4. – P. 1106–1116.
44. WHO. Global Tuberculosis Report 2012. Geneva, Switzerland. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
45. Yang X.Y., Chen Q.F., Li Y.P., Wu S.M. *Mycobacterium vaccae* as adjuvant therapy to anti-tuberculosis chemotherapy in never-treated tuberculosis patients: a meta-analysis // *PloS one*. – 2011. – Vol. 6, № 9. – P. e23826