РОЗРОБКА КОМБІНОВАНОЇ ДИФТЕРІЙНОЇ ВАКЦИНИ НА ОСНОВІ ДИФТЕРІЙНОГО АНАТОКСИНУ З АД'ЮВАНТОМ МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ У СВІТІ СУЧАСНИХ СТРАТЕГІЙ КОНСТРУЮВАННЯ ПРОФІЛАКТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Єлисеєва І.В., Бабич Є.М., Ждамарова Л.А., Білозерський В.І., Колпак С.А.

ДУ «ІМІ НАМН»

Розробка вакцин як стратегія, яка захищає не тільки вакцинованих осіб, але може опосередковано захищати навколишнє співтовариство через формування колективного імунітету проти різних захворювань, зокрема дифтерії, правця, поліомієліту, кору, паротиту, краснухи, гепатиту В та менінгіту, зменшила смертність на 97–99% [3]. Однак навіть за допомогою декількох успішних кампаній вакцинації інфекційні захворювання залишаються другою провідною причиною смерті в усьому світі, непропорційно вражаючи дітей віком до 5 років та людей з низьким рівнем доходу [4]. Насправді п'ять з перших десяти провідних причин смерті в країнах з низьким рівнем доходу спричинені інфекційними агентами: наприклад, пневмонією, ВІЛ / СНІД, діареєю, малярією та туберкульозом. Хоча деяким з цих збудників зараз не вистачає вакцини, необхідної для боротьби з хворобами, за оцінками, 20 % цих випадків є наслідком захворювань, що попереджаються вакциною, що свідчить про необхідність значного вдосконалення технології одержання вакцин та їх застосування [4–6].

Наріжним каменем конструювання багатьох сучасних засобів специфічної імунопрофілактики стало вчення про вроджений імунітет як рушійний механізм імунного захисту макроорганізму, витоки якого лежать у вченні видатного мікробіолога, цитолога, ембріолога, імунолога, фізіолога і патолога з науковим ім'ям світового рівня І. І. Мечникова про фагоцитоз, яке було оцінено присвоєнням Нобелевської премії у галузі фізіології та медицини за 1908 рік. Минуло майже 140 років з часу відкриття цього фундаментального явища. У той час як інші дослідники спостерігали поглинання чужорідних частинок клітинами простих і складних організмів, він зрозумів значення цього явища у відповіді макроорганізму на травми та інфекції та створив міцну основу для розуміння запалення та гомеостазу тканин. На теперішній час вдосконалені інструменти клітинної та молекулярної біології для вивчення фагоцитозу і його ролі у фізіологічних та патологічних процесах дозволили набагато глибше дізнатися про механізми клітинного захисту організму, визначити функцію рецепторів клітин імунної системи у вродженому і набутому імунітеті [1].

Важливим елементом ініціації вроджених імунних реакцій, таких як запалення, є розпізнавання мікробних збудників через типові молекулярні структури, пов'язані з патогенами (PAMP), опосередковане рецепторами розпізнавання образів (PRR), кодованими зародковими лініями та експресованими клітинами вродженої імунної системи, такими як дендритні клітини (DC), макрофаги, моноцити, нейтрофіли та епітеліоцити. Після розпізнавання PAMP, PRR ініціюють програму сигналізації, першу лінію захисних реакцій господаря, необхідну для знищення інфекційних агентів.

Центральну роль у ініціюванні імунних реакцій з числа PRR відіграють так звані Toll-подібні рецептори (TLR), які розпізнають широкий спектр PAMP. TLR є трансмембранними білками типу I і містять ектодомен, до складу якого входять повтори лейцину, котрі опосередковують розпізнавання PAMP, трансмембранної області та доменів цитозольного Toll-IL-1 рецептора (TIR), які активують спадні сигнальні шляхи. Вони експресуються в основному або на клітинній поверхні антиген-презентуючих клітин, таких як DC, макрофаги та В-клітини (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) та розпізнають компоненти мікробних мембран, або пов'язані з внутрішньоклітинними везикулами (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR13) та розпізнають нуклеїнові кислоти, які вивільняються після поглинання вірусів та інших патогенів або інфікованих клітин [3]. TLR11, родич TLR5, експресований на клітинній поверхні, експресується також у внутрішньоклітинних відділеннях [4]. Кожен TLR виявляє окремі PAMP, вірусні, бактеріальні, мікобактеріальні, грибкові та паразитарні. До них відносяться ліпопротеїди, розпізнавані TLR1, TLR2 та TLR6, дволанцюгові РНК, розпізнавані TLR3, ліпополісахарид, розпізнаваний TLR4, флагеллін (відповідно, TLR5), одноланцюгові РНК (TLR7 і TLR8) та ДНК (TLR9) [5]. Після розпізнавання відповідних PAMP, TLR набирають специфічний набір адаптерних молекул, які містять домен TIR, такі як MyD88 та TRIF, і ініціюють події спадної сигналізації, що призводять до секреції запальних цитокінів, інтерферону (IFN) типу I, хемокінів та антимікробних пептидів [6]. Ці реакції викликають рекрутинг нейтрофілів, активацію макрофагів та індукцію генів, стимульованих IFN, що призводить до прямого знищення патогенів. Більше того, активація TLR-сигналізації призводить до дозрівання DC, які відповідають за мобілізацію другої лінії захисту господаря, адаптивного імунітету [2]. Окремі TLR експресуються різними субпопуляціями DC [2].

На теперішній час, крім TLR, знайдено інші PRR, які також беруть участь у розпізнаванні PAMP і контролі вродженого імунітету. До них відносяться мембранно пов'язані рецептори лектину С (CLR), цитозольні білки, такі як нуклеотид-зв'язуючий олігомеризаційний домен – NOD-подібні рецептори (NLR) і RIG-I-подібні рецептори (RLR), AIM-2 подібні рецептори, а також сімейство ферментів, які функціонують як внутрішньоклітинні датчики нуклеїнових кислот, включаючи білки OAS та cGAS [6, 7, 8, 9, 10, 11].

CLR є великою надродиною мембранних білків, що містять один або кілька доменів, подібних до лектину типу С, які значною мірою викликають

DOI: 10.5281/zenodo.3885130

запальні реакції шляхом розпізнавання грибкових та бактеріальних PAMP.

RLR, до складу яких входять RIG-I, MDA5 та LGP2, є РНК-геліказами, які розпізнають види РНК, що вивільняються в цитоплазму в різних типах клітин і координують антивірусні програми за допомогою індукції IFN типу I. Сім'я NLR налічує понад 20 членів. NLR експресуються внутрішньоклітинно і реагують на різні PAMP, викликаючи запальні реакції. Кілька NLR, такі як NALP1 (NLRP1) і NALP3 (NLRP3), утворюють запалення разом з ASC і Caspase-1 і опосередковують обробку про-IL-1β для дозрівання IL-1β для вивільнення. DAI та IFI16 є цитозольними датчиками dsDNA-кандидата та індукують вироблення IFN типу I, тоді як AIM2 розпізнає dsDNA та індукує секрецію IL-1β [12, 13].

Інтактні мікробні збудники зазвичай містять багато PAMP, які активують численні PRR. Крім того, різні PRR можуть розпізнавати один і той же PAMP. Отже, TLR спільно з іншими PRR організовують як патоген-специфічні, так і клітинні специфічні імунні відповіді макроорганізму для боротьби з інфекціями. Встановлення ефективних імунних реакцій визначається перехресним спілкуванням між TLR та іншими PRR [2].

Вроджений контроль адаптивного імунітету зараз є усталеною парадигмою. Фізіологічна роль різних PRR у зондуванні мікробів та індукції антиген-специфічних адаптивних імунних відповідей продовжує досліджуватися, але загалом наявні докази однозначно підтверджують думку про те, що зондування, опосередковане PRR, мобілізує адаптивні імунні реакції: конкретно, PRR визначають походження антигенів, розпізнаних рецепторами, експресованими на Т-клітинах і В-клітинах, а також визначають тип інфекції, з якою стикається організм, і навчають лімфоцити індукувати відповідний ефекторний клас імунної відповіді [14].

Сучасною гілкою у вакцинології є нова парадигма конструювання профілактичних препаратів широкого спектру дії, що базуються на тренованому імунітеті (TIbV). Йдеться про вакцинні препарати, що індукують навчання або тренування вроджених імунних клітин, суть якого полягає у їх тривалих метаболічних і епігенетичних змінах, які призводять до підсиленої клітинної реакції на другий антигенний стимул тим самим або непов'язаним специфічним мікробним подразником [15, 16]. Вони не передбачають постійних генетичних змін, таких як мутації та рекомбінація, які мають важливе значення для адаптивного імунітету [17]. Оскільки тренований імунітет, як правило, запускають рецептори розпізнавання образів (PRR) імунних клітин, TIbV має формуватися саме з мікробних структур, що містять відповідні PRR-ліганди, так звані патоген-асоційовані молекулярні паттерни (PAMP).

На відміну від звичайних вакцин, які спрямовані на отримання лише специфічних відповідей на антигени, пов'язані з вакциною, TIbV спрямовані на стимулювання більш великого кола реакцій. Широкий захист може бути досягнуто шляхом підвищення неспецифічної ефекторної реакції вроджених імунних клітин (наприклад, моноцитів/макрофагів) на патогени та використання стану активації DC для посилення адаптації Т-клітинної відповіді як на специфічні, так і на неспоріднені (побічні) антигени. Ця здатність TIbV сприяти реакціям, що перевищують їх номінальні антигени, може бути особливо корисною, коли звичайні вакцини недоступні або коли у сприйнятливих людей виникають багаторазові ко-інфекції та/або повторювані інфекції. Оскільки обраний набір PRR-лігандів має важливе значення не тільки для стимулювання тренованого імунітету, але і для формування адаптивного імунітету, точність конструкції TIbV має покращитися на основі знань про функціональні зв'язки між різними PRR [15].

Концепція TIbV, як свідчать численні дані літератури, знаходиться на етапі формування, але низка сучасних протиінфекційних вакцин, імуностимуляторів і навіть вакцинних ад'ювантів вже може розглядатися з позицій категорії TIbV. Регулювання тренованого імунітету передбачає його індукцію як PAMP, так і DAMP, молекулярних фрагментів, асоційованих з ушкодженнями, здатними ініціювати неінфекційну запальну відповідь, а його пригнічення – молекулярними інгібіторами численних процесів. Індукція може бути досягнута різними шляхами, що сприяють підвищенню імунітету, які можуть бути залучені бактеріями, грибками (β-глюкан) або метаболічними «тренерами», а також деякими цитокінами [18].

TLR-ліганди, такі як монофосфорилліпід А (TLR4-ліганд), CpG-ДНК (TLR9-ліганд) та імідазохіноліни (ліганд TLR7) вже використовуються у якості ад'ювантів у вакцинах проти інфекційних захворювань, алергії та пухлин [2]. Для створення TIbV можуть використовуватися також мікробні ліганди, котрі викликали неспецифічний імунний захист проти ряду інфекцій в експерименті, такі як компонент пептидоглікану мурамілдіпептид, флагеллін, індукований DC IL-18, який, у свою чергу, призводить до вироблення IL-22 епітеліальними клітинами, продукт ліпідного обміну, окислений ліпопротеїд низької щільності (oxLDL), який відносять до DAMP [17].

Серед механізмів, що регулюють тренований імунітет, одним з найбільш важливих процесів є метаболічна перебудова вроджених імунних клітин. Ключовою частиною цієї перебудови є перехід від окисного фосфорилювання до аеробного гліколізу, який призводить до активації вроджених імунних клітин і виділенню прозапальних цитокінів [18]. Наприклад, ін'єкція однієї дози рекомбінантного IL-1 за три дні перед інфікуванням культурою *Pseudomonas aeruginosa* захищала мишей проти смертності [17].

Серед нових принципів розпізнавання вродженої імунної системи та контролю за адаптаційним імунітетом з'явилися чутливі шляхи імунної системи, які виявляють специфічні харчові та мікробні метаболіти, включаючи коротколанцюгові жирні кислоти та вітаміни [20-22]. Крім того, було встановлено, що виявлення бактеріальних пігментів арильним вуглеводневим рецептором регулює

DOI: 10.5281/zenodo.3885130

антибактеріальну відповідь [23]. Було виявлено, що чутливість ксенобіотичних речовин за допомогою цього рецептора відіграє роль у підвищенні бар'єрного імунітету за рахунок виробництва IL-22 та інших механізмів [24]. Було знайдено, що інший датчик ксенобіотичних речовин, PXR, контролює запалення кишечника за допомогою зондування бактеріальних метаболітів [25]. Наскільки всі ці шляхи вписуються в сучасні моделі імунного розпізнавання – покажуть майбутні дослідження.

Вакцини змінюють адаптивну популяцію імунних клітин та гетерологічні імунні відповіді. Неспецифічні ефекти відрізняються між різними вакцинами, а їх вплив на гетерологічну адаптивну імунну відповідь може також включати активацію спостерігача, тобто активацію Т-клітин, специфічних для антигену X під час імунної відповіді проти антигену Y, перехресні реакції та інші, поки ще не визначені механізми. Це має великі наслідки для майбутньої розробки вакцин та планування вакцинації [26].

Новою парадигмою для конструювання ліків і терапевтичних втручань, спрямованих на попередження та лікування інфекційних захворювань є пригнічування патогенезу і його наслідків через націлювання на певні фактори бактеріальної вірулентності [27-29]. Однією з багатьох антивірулентних мішеней є адгезія. Якщо можна пригнічувати адгезію, відповідно, можна і пригнічувати відповідну інфекцію. Цей підхід формує основу анти-адгезивних стратегій, котрі було винайдено для попередження різноманітних бактеріальних інфекцій [30].

Спеціалізовані PAMP мікроорганізмів, розташовані на поверхні мікробних клітин, такі як пілі або фімбрії, ліпотейхоєві кислоти, тощо, беруть участь у процесі адгезії та колонізації збудником вхідних воріт інфекції. Таким чином, розробка вакцин, які перешкоджають розвитку початкової стадії інфекції, знаходиться у руслі анти-адгезивної стратегії конструювання вакцинних препаратів [31, 32].

У ДУ «ІМІ НАМН» на етапі доклінічних випробувань знаходиться комбінована дифтерійна вакцина на основі нативного очищеного дифтерійного анатоксину (НОДА) з ад´ювантом мікробного походження [33, 34]. Чому саме при наявності широкого вибору вакцин різних виробників, які вже давно застосовуються для масової вакцинопрофілактики дифтерії знадобилося звертатися до удосконалення саме цього препарату? Відповідь обумовлюється трьома основними причинами. По-перше, це неможливість впливати на рівень бактеріоносійства і циркуляцію збудника серед населення за допомогою дифтерійного анатоксину при тому, що в світі зберігаються ендемічні регіони з високим рівнем захворюваності на дифтерію [35]. По-друге, це захворюваність і навіть летальність від дифтерії серед щеплених від цієї інфекції осіб [36-43]. По-третє, це висока реактогенність дифтерійних вакцин, ризик якої зростає з кожною наступною ін'єкцією [44-51]. Збільшується кількість публікацій про віддалені побічні ефекти хімічних ад´ювантів солей алюмінію, які обумовлюють нейротоксичні ускладнення та навіть є тригером аутоімунних процесів в організмі [52, 53, 54, 55].

В якості ад´юванту в комбінованій дифтерійній кандидат-вакцині використовується препарат нативних поверхневих антигенів *C.diphtheriae, var.gravis, tox+*, які не зазнали модифікації або навіть денатурації хімічними речовинами і тому містять молекулярні структури максимально подібні до природних PAMP збудника і забезпечують спрямований антигенний стимул клітин вродженої системи імунітету, отриманий за допомогою фізичних засобів дезінтеграції мікробних клітин (ультразвук та електромагнітне випромінення надзвичайно високої частоти) [56, 57].

Проведені дослідження показали, що нативність антигенних препаратів-кандидатів у ад´юванти є ключовою ланкою їх ефективності. Так, експерименти по визначенню впливу досліджуваних експериментальних зразків різних антигенних препаратів на активність фагоцитозу та їх ад´ювантну дію щодо нативного очищеного дифтерійного анатоксину (НОДА), показали, що застосування препаратів поверхневих антигенів *C.diphtheriae*, адсорбованоих у гелі гідроксиду алюмінію, лізату протопластів *C.diphtheriae* або навіть препарату клітинних стінок збудника не дало позитивних результатів: титри антитіл в піддослідних тварин залишалися нульовими, показники фагоцитозу не відрізнялися від контрольного рівня [58, 59]. Цей пул експериментів з негативним результатом виявився в цілому дуже позитивним щодо підтвердження ролі саме поверхневих антигенних структур щодо стимуляції неспецифічної, а надалі й специфічної протидифтерійної імунної відповіді, оскільки експериментальні зразки дифтерійних бактеріальних поверхневих антигенів проявили себе і як ад´юванти щодо дифтерійного анатоксину, здатні замінити нейротоксичний гідроксид алюмінію, так і імуномодулятори, які підвищують фагоцитарну активність при першому та повторних антигенних стимулах, а також сприяють звільненню слизових носоглотки кролів, вакцинованих експериментальними зразками комбінованої дифтерійної вакцини та інфікованих культурою *C.diphtheriae* від патогену [60, 61].

Більшість інфекційних захворювань трапляється після перетину збудником одного з захисних слизових бар'єрів організму. Саме тому формування імунологічно сильного бар'єру слизової оболонки вважається ефективною стратегією запобігання зараженню в місці контакту між мікробами та хазяїном. Однак, сучасні стандарти технології одержання вакцини зазвичай стосуються лише патогенів, які вже перетинули слизовий бар'єр. Більшість ліцензованих вакцин вводять підшкірно або внутрішньом'язово. Отримана імунна відповідь, як правило, обмежується системним гуморальним імунітетом (наприклад, виробленням антитіл проти збудника або токсину) з обмеженим клітинним імунітетом (наприклад, Т-опосередкованим клітинами) та лише слабким захистом, що утворюється

DOI: 10.5281/zenodo.3885130

на поверхнях слизової [62, 63]. На противагу цьому вакцинація на поверхнях слизової оболонки, в тому числі пероральний шлях введення вакцини дозволяє успішно стимулювати гуморальну та клітинну імунну відповідь як на системних, так і на слизових ділянках вхідних воріт інфекції для встановлення більш широкого і тривалого захисту [64].

Експериментальні зразки комбінованої дифтерійної вакцини з бактеріальним ад'ювантом було випробовувано з використанням перорального шляху введення вакцини у комбінованих схемах щеплення, і, як показали результати експериментів, ад´ювантна та фагоцитоз стимулююча дія досліджуваних кандидат-вакцин зберігалася. Одержані дані продемонстрували перспективу широкого застосування пероральної імунізації як найбільш природного, фізично і психологічно безболісного способу введення вакцин як за екстреними показаннями у вогнищі дифтерії, так і для підтримування колективного протидифтерійного імунітету шляхом бустер-імунізації [65, 66].

Однак пероральна доставка є складним завданням, яке вимагає спеціального складу для подолання суворих шлунково-кишкових середовищ та уникнення індукції толерантності для досягнення ефективного захисту. Тут ми торкаємося обґрунтування пероральних вакцин, включаючи ключові біологічні та фізико-хімічні аспекти розробки оральних вакцин нового покоління [64].

Ще одним напрямком підвищення безпечності дифтерійних вакцин при повторних щепленнях, яке відкриває перспективи специфічного імунного захисту осіб з алергічними реакціями, стало експериментальне застосування принципів специфічної імунотерапії при щепленнях піддослідних тварин. Одержані результати свідчать, що попереднє пероральне введення антигенних препаратів *C.diphtheriae* попереджувало розвиток шкірної алергічної реакції в піддослідних кролів при подальшому підшкірному введенні дифтерійних вакцин [66, 67].

Проведені дослідження з розробки комбінованої дифтерійної вакцини з ад'ювантом бактеріального походження переконливо показали імуногенність отриманих експериментальних зразків кандидат-вакцини та можливість поєднання ефективності та безпечності препарату при визначеному дозуванні та ступені очищення антигенного препарату. Але для подальших досліджень суттєво важливим буде розширення знань про чутливі шляхи вродженої імунної системи та визначення правил взаємодії, що визначають функції цих шляхів у контексті дифтерійної інфекції.

Імуногенність, властивість, пов'язана зі здатністю викликати імунну відповідь, часто використовується як сурогат для захисного імунітету при розробці та випробуваннях вакцин. Тому спеціальної уваги заслуговує вивчення протективної дії препарату. Чи буде дана імунна відповідь захисною або не буде, визначається рядом причин: її специфічністю, класом ефектору, місцем розташування, величиною чи тривалістю. Окремим напрямком досліджень запропонованої комбінованої кандидат-вакцини може стати вивчення закономірностей формування антибактеріального протидифтерійного імунітету та визначення оптимальних співвідношень НОДА та бактеріального антигену у складі вакцини.

Development of a combined diphtheria vaccine based on diphtheria anatoxin with microbial adjuvant in the light of modern strategies of vaccines development
Yelyseyeva I.V., Babich Ye.M., Zhdamarova L.A., Bilozersky V.I., Kolpak S.A.

The review article is devoted to the consideration of approaches to the practical implementation of the main provisions of modern ideas about the role and mechanisms of innate immunity for the development of vaccines. Initiation of the body's immune defenses occurs through the recognition of microbial pathogens using typical molecular structures associated with pathogens (PAMPs), mediated by image recognition receptors (PRRs), which are expressed by cells of the innate immune system. The so-called Toll-like receptors (TLR) play a central role in initiating immune responses. Other PRRs such as membrane-bound lectin C receptors (CLR), cytosolic proteins such as the nucleotide-binding oligomerization domain - NOD-like receptors (NLR) and RIG-I-like are involved in the recognition of PAMP and the control of innate immunity. receptors (RLR), AIM-2-like receptors, and a family of enzymes that function as intracellular nucleic acid sensors, including OAS and cGAS proteins also involved in the recognition of PAMP and control of innate immunity. Innate control of adaptive immunity is now an established paradigm. PRR determines the origin of antigens recognized by receptors expressed on T cells and B cells, as well as determine the type of infection with which collides with the body, and teaches lymphocytes to induce an appropriate effector class of the immune response. A modern branch of vaccinology is a new paradigm for the development of broad-spectrum prophylactic drugs based on trained immunity (TIbV). These are vaccines that induce the learning or training of innate immune cells, the essence of which lies in their long-term metabolic and epigenetic changes, which lead to an enhanced cellular response to the second antigenic stimulus by the same or unrelated specific microbial stimulus. Because trained immunity is typically triggered by PRRs, TIbV must be formed from microbial structures containing the appropriate PRR ligands, namely, PAMPs. Unlike conventional vaccines, which aim to obtain only specific responses to vaccine-associated antigens, TIbV aims to stimulate a wider range of reactions. Broad protection can be achieved by enhancing the nonspecific effector response of innate immune cells to pathogens and using the dendritic cells activation state to enhance the adaptation of the T cell response to both specific and unrelated antigens. The concept of TIbV is in its infancy, but a number of modern anti-infective vaccines, immunomodulators and vaccine adjuvants can already be considered from the standpoint of the TIbV category. Induction can be achieved in various ways that enhance immunity, which can be involved by bacteria, fungi (β-glucan) or metabolic "trainers", as well as some cytokines. A new paradigm for

DOI: 10.5281/zenodo.3885130

drug development and therapeutic interventions for the prevention and treatment of infectious diseases is also the defeat of bacterial virulence as an alternative to antimicrobial therapy. One of the many antivirulence targets is adhesion. If it is possible to suppress adhesion, accordingly, it is possible to suppress the corresponding infection. This approach forms the basis of anti-adhesive strategies that have been invented to prevent various bacterial infections. Thus, the development of vaccines that prevent the initial stage of infection is in line with the anti-adhesive strategy. A combined diphtheria vaccine based on native purified diphtheria toxoid (NODA) with an adjuvant of microbial origin is developed at the SI "IMI NAMN" at the stage of preclinical trials. As an adjuvant in the candidate vaccine, a preparation of C.diphtheriae, var.gravis, tox + native surface antigens is used, which have not undergone modification or even denaturation with chemicals and therefore contain molecular structures as similar as possible to natural PAMPs and provide targeted antigen stimulation of cells of the innate immune system, obtained by physical means of disintegration of microbial cells (ultrasound or electromagnetic radiation of extremely high frequency). Studies have shown that the nativeness of antigenic candidate drugs for adjuvants is a key element of their effectiveness. Experimental samples of diphtheria bacterial surface antigens have shown themselves as adjuvant for diphtheria toxoid, capable of replacing neurotoxic aluminum hydroxide, and immunomodulator, which increase phagocytic activity in the first and repeated antigenic stimuli, and also promote the release of nasopharyngeal mucosa of rabbits vaccinated with experimental samples of the combined diphtheria vaccine and infected with a culture of C. diphtheriae. The formation of an immunologically strong mucosal barrier is considered to be an effective strategy to prevent infection at the point of contact between microbes and the host. However, modern standards of vaccine technology usually apply only to pathogens that have already crossed the mucosal barrier. In contrast to licensed vaccines, vaccination on mucosal surfaces, including the oral route of administration of the vaccine, can successfully stimulate the humoral and cellular immune response in both systemic and mucosal areas of the entrance gate of infection to establish a broader and longer-lasting protection. Experimental samples of the combined diphtheria vaccine with bacterial adjuvant were tested using the oral route of administration of the vaccine in combined vaccination regimens, and, as the results of experiments showed, the adjuvant and phagocytosis stimulating effect of the studied candidate vaccines was maintained. The obtained data demonstrated the prospect of widespread use of oral immunization as the most natural, physically and psychologically painless way to administer vaccines both for emergencies in the diphtheria outbreak and to maintain collective diphtheria immunity by booster immunization. However, oral delivery is a complex task that requires a special composition to overcome harsh gastrointestinal environments and avoid the induction of tolerance to achieve effective protection, which requires detailed justification of oral vaccines, including key biological and physicochemical aspects of next-generation oral vaccines. Another way to increase the safety of diphtheria vaccines during repeated vaccinations, which opens up prospects for specific immune protection of persons with allergic reactions, was the experimental application of the principles of specific immunotherapy in vaccinations of experimental animals. The obtained results indicate that the previous oral administration of antigenic drugs C. diphtheriae prevented the development of allergic skin reactions in experimental rabbits with subsequent subcutaneous administration of diphtheria vaccines. Studies on the development of a combined diphtheria vaccine with an adjuvant of bacterial origin convincingly showed the immunogenicity of the obtained experimental samples of the candidate vaccine and the possibility of combining the efficacy and safety of the drug at a certain dosage and degree of purification of antigenic drug. But for further research, it will be essential to expand knowledge about the sensitive pathways of the innate immune system and to determine the rules of interaction that determine the functions of these pathways in the context of diphtheria infection. Special attention should be paid to the study of the protective effect of the drug, the study of patterns of formation of antibacterial diphtheria immunity and the determination of optimal ratios of NODA and bacterial antigen in the vaccine.

Key words: trained innate immunity, adaptive immunity, development of vaccines, bacterial adjuvants, C.diphtheriae, mucosal vaccines, specific immunotherapy.

References

1. Gordon S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process // Immunity. 2016. Vol. 44, N 3. C. 463–475.
2. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity // Immunity. 2011. Vol. 34, N 5. C. 637–650.
3. Blasius A. L., Beutler B. Intracellular toll-like receptors // Immunity. 2010. Vol. 32. P. 305–315.
4. Pifer R., Benson A., Sturge C.R.,Yarovinsky F .UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to Toxoplasma gondii // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286. P. 3307–3314.
5. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity // Cell. 2006. N 124. C. 783–801.
6. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors // Nat. Immunol. 2010. Vol. 11. C. 373–384.
7. Wu J., Chen Z. J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids // Annu. Rev. Immunol. 2014. Vol. 32. P. 461–488.
8. Rathinam V. A., Vanaja S. K., Fitzgerald K. A. Regulation of inflammasome signaling // Nat. Immunol. 2012. Vol. 13. P. 333–342.
9. Osorio F., Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recogniztion and host defense // Immunity. 2011. Vol. 34. P. 651–664.
10. Loo Y.-M., Gale Jr., M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. // Immunity. 2011. Vol. 34. P. 680–692.

DOI: 10.5281/zenodo.3885130

11. Elinav E., Strowig T., Henao-Mejia J., Flavell R. A. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins // Immunity. 2011. Vol. 34. P. 665–679.
12. Barbalat R., Ewald S. E., Mouchess M. L., Barton G. M. Nucleic acid recognition by the innate immune system // Annu. Rev. Immunol. 2011. Vol. 29. P. 185–214.
13. Barber G. N. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses // Curr. Opin. Immunol. 2011. Vol. 23. P. 10–20.
14. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system // Nat Immunol. 2015. Vol. 16, N 4. P. 343-53.
15. Sánchez-Ramón S, Conejero L, Netea MG. [et al.] Trained Immunity-Based Vaccines: A New Paradigm for the Development of Broad-Spectrum Anti-infectious Formulations // Front Immunol. 2018. N 9. P. 2936. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6304371/
16. Yelyseyeva IV, Zhdamarova LA, Belozersky VI. [et al.] Study of the dynamics of phagocytic activity of neutrophils after repeated vaccinations of laboratory animals with experimental diphtheria bacterial antigenic drug // Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sports. 2020. Vol. 5, N 1 (23). Pp 50–55.
17. Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, [et al.] Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease // Science. 2016. Vol. 352, N 6284.
18. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, Cross JR, Jung E, Thompson CB, Jones RG, Pearce EJ. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation // Blood. 2010 . Vol. 115, N 23. P. 4742–4749.
19. Mulder WJM., Ochando J, Joosten LAB. [et al.] Therapeutic targeting of trained immunity // Nat Rev Drug Discov. 2019. Vol. 18, № 7. P. 553–566.
20. Tan J, McKenzie C, Potamitis M. [et al.] The role of short-chain fatty acids in health and disease // Adv. Immunol. 2014. Vol. 121. P. 91–119.
21. Spencer SP, Wilhelm C, Yang Q. [et al.] Adaptation of innate lymphoid cells to a micronutrient deficiency promotes type 2 barrier immunity // Science. 2014. Vol. 343. P. 432–437.
22. Spencer SP, Belkaid Y. Dietary and commensal derived nutrients: shaping mucosal and systemic immunity // Curr. Opin. Immunol. 2012. Vol. 24. P. 379–384.
23. Moura-Alves P, Faé K, Kaufmann SHE. [et al.] AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence // Nature. 2014. Vol. 512. P. 387–392.
24. Stockinger B, Di Meglio P, Gialitakis M, Duarte JH. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system // Annu. Rev. Immunol. 2014. Vol. 32. P. 403–432.
25. Venkatesh M, Mukherjee S, Wang H. [et al.] Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4 // Immunity. 2014. Vol. 41. P. 296–310.
26. Messina NL, Zimmermann P, Curtis N. The impact of vaccines on heterologous adaptive immunity // Clin Microbiol Infect. 2019. Vol. 25, N 12. P. 1484-1493.
27. Cusumano C. K., Hultgren S. J. Bacterial adhesion – a source of alternate antibiotic targets // Drugs. 2009. Vol. 12, N 11. P.699–705.
28. Cegelski L., Marshall G. R., Eldridge G. R., Hultgren S. J. The biology and future prospects of antivirulence therapies // Nat Rev Microbiol. 2008. Vol. 6, No 1. P. 17–27. tions. Quad Sclavo Diagn. 1986. Vol. 22, N 1. P. 68–77.
29. Zigangirova N. A., Gintsburg A. L. Target-specific screening of antivirulence preparations for chronic infection therapy // Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2011. N 4. P. 107–115.
30. Shoaf-Sweeney K. D., Hutkins R. W. Adherence, anti-adherence, and oligosaccharides preventing pathogens from sticking to the host // Adv Food Nutr Res. 2009. Vol. 55. P. 101–161.
31. Yelyseyeva IV, Babych YeM, Zhdamarova LA. Anti-adhesive Therapies as a Contemporary Means to Fight Infectious Diseases and Adherence Factors of Corynebacteria diphtheriae // Annals of Mechnikov Insitute. 2014. N 2. C. 7–19. URL : http://www.imiamn.org.ua/journal/2_2014/PDF/4.pdf
32. Yelyseyeva IV, Babych YeM, Zhdamarova LA. [et al.] Anti-adhesive strategy in the development of complex anti-diphtheria vaccines as a promising measure to reduce the circulation of C. diphtheriae among the population // Children's infections. Moscow: 2015. N 3. P. 30–33.
33. Yelyseyeva IV, Babych YeM, Zhdamarova LA. [et al.] Trained innate immunity as a basis for new strategies in vaccine development // Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sports. 2019. Vol. 4, N 5 (21). P. 9–17.
34. Yelyseyeva IV, Babych EM, Belozersky VI. [et al.] Surface antigens of diphtheria pathogen obtained by physical factors as a biological platform for the development of a combined diphtheria candidate vaccine // Bulletin of problems biology and medicine. 2018. N 3 (145). P. 251–256.
35. Chaplin DD. Overview of the immune response // J Allergy Clin Immunol. 2010. Vol. 125, N 2 Suppl 2. P. 3-23.
36. Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV, Hirata R. Júnior. Diphtheria remains a threat to health in the developing world – an overview // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2003. Vol. 98. P. 987–989.
37. Petrusevich TV. Causes of diphtheria in vaccinated: author's ref. dis. … PhD. Science: 14.02.02. Kyiv, 2004. 32 p.
38. 33. 46. Global Vaccine Action Plan 2011 – 2020. Immunization, Vaccines and Biologicals. URL : https://www.path.org/resourc es/global-vaccine-action-plan-2011-2020/
39. Mokrousov I. Corynebacterium diphtheriae: genome diversity, population structure and genotyping perspectives // Infect Genet Evol. 2009. Vol. 9, N 1. P. 1-15.
40. Kolodkina V, Titov L, Sharapa T. [et al] Molecular epidemiology of C. diphtheriae strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus // BMC Infect Dis. 2006. Vol. 6. P. 129–137.
41. Chyudnaya LM, Oksiyuk VG, Krasyuk LS. [et al.] The epidemic situation of diphtheria in Ukraine //

DOI: 10.5281/zenodo.3885130

Epidemiology and Infectious Diseases. 1999. N 1. P. 10–12.
42. Nosov SD. Diphtheria. Infectious diseases in children in the past and present (clinical and epidemiological aspects of the evolution of infectious diseases): collection of articles. L .: Medicine, 1980. P. 38-50.
43. Yelyseyeva IV, Babich EM, Zhdamarova LA. [et al.] On the development of a complex diphtheria vaccine with bacterial adjuvant // Bulletin of problems of biology and medicine. 2019. Vol. 3 (152). P. 264–268.
44. Edsall G, Elliott MW, Peebles TC, Eldred MC. Excessive use of tetanus toxoid boosters // JAMA: the journal of the American Medical Association. 1967. Vol. 202. P. 111–113.
45. Danilova E, Shiryayev A, Skogen V. [et al.] Short-term booster effect of diphtheria toxoid in initially long-term protected individuals // Vaccine. 2005. Vol. 23. P. 1446–1450.
46. Scheifele DW, Halperin SA, Ochnio JJ. [et al.] A modified vaccine reduces the rate of large injection site reactions to the preschool booster dose of diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine – results of a randomized controlled trial // The Pediatric Infectious Disease Journal. 2005. Vol. 24. P. 1059–1066.
47. Yelyseyeva IV, Babych YeM, Zhdamarova LA. [et al.] Adverse reactions to vaccines and ways of its prevention // Аннали Мечниковського інституту. 2011. N 1. C. 5–12. URL : http://www.imiamn.org.ua/journal/1_2011/PDF/3.pdf
48. Chervonskaya GP. Vaccinations: myths and reality. URL : https://www.rulit.me/books/privivki-mify-i-realnost-read-193258-1.html
49. Braginskaya VP, Sokolova AF. Active immunization of children: monograph. Moscow: Medicine, 1990.203 p.
50. Scheifele DW, Ochnio JJ, Halperin SA. Cellular immunity as a potential cause of local reactions to booster vaccination with diphtheria and tetanus toxoids and acellular pertussis antigens // Pediatr Infect Dis J. 2009. Vol. 28, N 11. P. 985–989.
51. Yelyseyeva IV, Babych EM, Belozersky VI. [et al.] Possible ways to increase the safety of diphtheria vaccines // Bulletin of problems of biology and medicine. 2018. Vol. 1, N 1 (142). P. 252–256.
52. Yelyseyeva IV, Babych EM, Belozersky VI. [et al.] Negative effects induced by vaccine adjuvants // Actual problems of modern medicine. Poltava, 2016. Vol. 16. N 2 (54). P. 279–286.
53. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. 'ASIA' - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants // J. Autoimmun. 2011. Vol. 36, N 1. P. 4–8.
54. Shaw CA, Li Y, Tomljenovic L. Administration of aluminium to neonatal mice in vaccine-relevant amounts is associated with adverse long term neurological outcomes // J. Inorg. Biochem. 2013. Vol. 128. P. 237–244.
55. Gherardi RK, Eidi H, Crépeaux G. [et al.] Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines // Front Neurol. 2015. Vol. 6. P. 4.
56. UA. Patent. N. 86891. Спосіб отримання бактерійного дифтерійного антигену. заявл. 06.08.2013; опубл. 10.01.2014, Бюл. № 1. 4 с.
57. Yelyseyeva IV, Babych EM, Belozersky VI. [et al.] Surface antigens of the diphtheria pathogen obtained by physical factors as a biological platform for the development of a combined diphtheria candidate vaccine // Bulletin of problems biology and medicine. 2018. N 3 (145). P. 251–256.
58. Yelyseyeva IV, Babych EM, Zhdamarova LA. [et al.] Antigenic and adjuvant properties of experimental samples of drugs of subcellular complexes of the diphtheria pathogen in vaccination of laboratory animals // Annals of the Mechnikov Institute. 2009. N 2. P. 58–66. URL : http://www.imiamn.org.ua/journal/2_2009/PDF/13.pdf
59. Yelyseyeva IV, Babych EM, Zhdamarova LA. [et al.] Вивчення впливу експериментальних зразків препаратів субклітинних комплексів збудника дифтерії на активність фагоцитозу при щепленні лабораторних тварин // Аннали Мечниковського інституту. 2009. N 4. C. 19–23. URL : http://www.imiamn.org.ua/journal.htm#/
60. Yelyseyeva IV, Zhdamarova LA, Belozersky VI. [et al.] Study of the dynamics of phagocytic activity of neutrophils after repeated vaccinations of laboratory animals with experimental diphtheria bacterial antigenic drug // Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sports. 2020. Vol. 5, N 1 (23). P. 50–55.
61. Yelyseyeva I., Babych Eu., Kivva F. New approaches to development of diphtheria vaccine. Anti-colonization strategy for the development of a combined diphtheria vaccine with bacterial antigen component : monographic study. Publishing House: LAP LAMBERT Academic Publishing. 2018. 104 p.
62. Wang J, Thorson L, Stokes RW. [et al.] Single mucosal, but not parenteral, immunization with recombinant adenoviral-based vaccine provides potent protection from pulmonary tuberculosis // J. Immunol. 2004. Vol. 173. P. 6357–6365.
63. Lycke N, Bemark M, Mucosal adjuvants and long-term memory development with special focus on CTA1-DD and other ADP-ribosylating toxins // Mucosal Immunol. 2010. Vol. 3. P. 556–566.
64. Yelyseyeva IV, Babych EM, Sklyar NO. [et al.] Prospects for the use of oral vaccinations against diphtheria // Medicine today and tomorrow. 2007. N 3. P. 139–143.
65. Yelyseyeva IV, Babych EM, Belozersky VI. [et al.] Possible ways to increase the safety of diphtheria vaccines // Bulletin of problems biology and medicine. 2018. Vol. 1, N 1 (142). P. 252–256.
66. Yelyseyeva IV, Babych EM, Zhdamarova LA. [et al.] Study of the effect of oral administration of antigenic drugs of the diphtheria pathogen on the development of skin reaction in rabbits // Annals of Mechnikov Insitute. 2013. N 1. C.40–43. URL : http://www.imiamn.org.ua/journal/1_2013/PDF/9.pdf
67. Yelyseyeva IV, Babych EM, Zhdamarova LA. [et al.] Study of the desensitizing action of purified antigenic fractions of the diphtheria pathogen obtained by physical factors // Bulletin of problems biology and medicine. 2012. Vol. 2. N 2 (93). P. 176–179.

DOI: 10.5281/zenodo.3885130