

POTENTIAL ADJUVANTS AND THEIR SYSTEMS FOR THE CREATION OF NEW VACCINES

T. Belemets, V. Krasinko, V. Udumovich, A. Chegrynets

National University of Food Technologies

Key words:

Vaccine market
HSV-2 vaccines
Adjuvants
Immunobiological drugs
Immunopotentiating agents

Article history:

Received 08.07.2024
Received in revised form 24.07.2024
Accepted 19.08.2024

Corresponding author:

V. Krasinko

E-mail:

krasinkovo@nuft.edu.ua

Citation: Белемєць Т. О., Красінко В. О., Удимович В. М., Чегринєць А. І. (2024). Потенційні ад'юванти та їх системи для створення новітніх вакцин. *Наукові праці НУХТ*, 30(4), 43—66.
DOI: 10.24263/2225-2924-2024-30-4-6

ABSTRACT

Nowadays, despite the sufficiently well-studied and practically developed technology for obtaining vaccine preparations, their production is still associated with a fairly large number of problems and risks. An important part of this issue is the choice of an effective, safe and affordable adjuvant in order to preserve the antigenicity and achieve the proper immunogenicity of vaccines.

With the use of modern scientific publications widespread, current and most promising adjuvants of synthetic and microbial origin in order to obtain the latest vaccines against HSV-2 were analyzed in the work.

It was found the use of previously licensed immunopotentiating agents and their systems – aluminum salts, Freund's adjuvant «IFA» and «CFA» (additionally contains killed bacterial cells of *Mycobacterium tuberculosis*), squalene-based adjuvants («MF59»), nanoemulsions of the «oil-in-water» type «AS03» and surfactant-based adjuvants («Span 85», «Tween»). The article also presents analysis of the advantages, disadvantages, prospects and effectiveness of their use for the purpose of obtaining vaccines of the new generation.

A promising approach now is the possibility of inducing a persistent immune response through the use of agonists of TLR receptors, in particular adjuvants «CpG1018» (TLR4 agonist), «AS01b» and «AS04» (TLR5,6,7) due to their ability to initiate persistent immune responses (T- and B-cell responses).

Special attention is paid to the expediency of using adjuvants of microbial origin: «Flagellin» isolated from the genetically engineered strain *Salmonella minnesota* R595 MPL-A, as a structural protein of the flagella of gram-negative bacteria *Escherichia coli*, spherical nanometric vesicles «OMV» of the outer membrane of *Escherichia coli*, as well as adjuvant system based on the combination of liposomes with *Salmonella typhi* porins.

It was possible to obtain these adjuvants thanks to the cultivation of the corresponding producers in the conditions of microbiological laboratories, which is ecological, safe and may have potential economic feasibility.

DOI: 10.24263/2225-2924-2024-30-4-6

ПОТЕНЦІЙНІ АД'ЮВАНТИ ТА ЇХ СИСТЕМИ ДЛЯ СТВОРЕННЯ НОВІТНІХ ВАКЦИН

Т. О. Белемець, В. О. Красінько, В. М. Удимович, А. І. Чегринєць
Національний університет харчових технологій

Нині, незважаючи на вже достатньо добре вивчені та опрацьовані практично технології отримання вакцинних препаратів, їх виробництво й досі пов'язано з досить великою кількістю проблем і ризиків, серед яких вибір ефективного, безпечного та доступного ад'юванта задля збереження антигенності й досягнення належної імуногенності вакцин.

З використанням сучасних наукових публікацій у статті здійснено аналіз розповсюджених, актуальних і найбільш перспективних ад'ювантів синтетичного та мікробного походжень з метою отримання новітніх вакцин проти ВПГ-2.

Виявлено, що й досі науково обґрунтованим залишається використання раніше ліцензованих імунопотенціюючих агентів та їх систем — солей алюмінію, ад'юванта Фрейнда «IFA» та «CFA» (додатково вміщує вбиті бактеріальні клітини *Mycobacterium tuberculosis*), ад'ювантів на основі сквалєну («MF59»), наноемульсій типу «масло у воді» «AS03» та ад'ювантів на основі ПЛАР («Span 85», «Tween»). Проаналізовано переваги, недоліки, перспективність та ефективність застосування з метою отримання вакцин нового покоління.

Перспективним підходом нині є можливість індукції стійкої імунної відповіді за рахунок застосування агоністів TLR рецепторів, зокрема ад'ювантів «CpG1018» (агоніст TLR4), «AS01b» й «AS04» (TLR5,6,7) завдяки їх здатності до ініціації стійких імунних відповідей (T- та B-клітинні відповіді).

Особлива увага звертається на доцільність застосування ад'ювантів мікробного походження, зокрема MPL-A, виділеного з генетично сконструйованого штаму *Salmonella minnesota R595*, флагеліну — структурного білка джгутиків грамнегативних бактерій *Escherichia coli*, сферичних нанометричних везикул OMV зовнішньої мембрани *Escherichia coli*, а також ад'ювантної системи на основі комбінації ліпосом з поринами *Salmonella typhi*. Ці ад'юванти вдалось отримати завдяки культивуванню відповідних продуцентів у контрольованих умовах біотехнологічного процесу, що є екологічно, безпечно та може мати потенційну економічну доцільність.

Ключові слова: ринок вакцин, вакцини проти ВПГ-2, ад'юванти, імунобіологічні препарати, імунопотенціюючі агенти.

Постановка проблеми. На сьогодні не існує ефективнішої стратегії для зниження статистичних показників захворюваності й смертності, ніж здійснення вакцинації. Адже саме вакцинація є найбільш раціональним та економічно вигідним інструментом вирішення проблематики імунологічного захисту людства від найбільш розповсюджених інфекційних агентів. Згідно з наявними опублікованими даними з початком глобальної світової імунізації спостерігається зниження рівнів смертності проти шести найбільш розповсюджених збудників захворювань на дифтерію, кашлюк, поліомієліт, туберкульоз, кір та правець. У сучасному світі лише

завдяки глобальній імунізації людству вдалось подолати масштабну світову пандемію, спричинену зооантропонозним інфекційним агентом — SARS-CoV-2 (Karch, & Burkhard, 2016).

На часі нагальною є проблематика поширення захворювань на генітальну герпетичну інфекцію, викликану вірусом простого герпесу 2-го типу (ВПГ-2) — *Herpes simplex virus*, який характеризується щорічною провокацією 23 млн нових випадків. За оцінкою ВООЗ, 417 млн людей у віці 15...49 років (станом на січень 2022 р.) інфіковані вірусом ВПГ-2 типу. Зокрема, у пацієнтів з ослабленим імунітетом в анамнезі захворювання спостерігається важкі й, часто, летальні випадки, обумовлені ураженням центральної нервової системи. Тому варто наголосити, що лише попереднє щеплення залишається єдиним доступним і раціональним методом лікування за рахунок специфічної імунізації проти ВПГ-1/2, яке можна вважати найбільш виправданим і перспективним. Саме в неактивній формі ВПГ є взагалі нечутливим до дії лікарських засобів, а спроби подіяти є свідомо марною тратою часу, фінансів і дискредитацією самої ідеї можливості лікування герпесвірусних інфекцій (Stanfield, Kousoulas, & Gershburg, 2021; Alareeki та ін., 2023).

Актуальність літературного дослідження визначається високим рівнем розповсюдженості ВПГ-2 та викликаним цим попитом українців на новітню вітчизняну вакцину проти ВПГ-2 з ефективним і безпечним ад'ювантом, обумовлену відсутністю єдиного раніше існуючого імпортного препарату та неможливістю наявної противірусної медикаментозної терапії повним чином запобігти рецидивам і викоріненню захворювання.

Отримання вакцини дасть змогу вирішити наявну соціально-економічну проблему захворювання працездатних людей репродуктивного віку, а також сприятиме позитивній тенденції щодо запобігання розповсюдженню інфекції. Проте за умови вже достатньо вивчених і опрацьованих практично технологій отримання вакцин виробництво імунобіологічних препаратів пов'язано з численними ризиками й проблемами, зокрема за рахунок характеру обраних імунопотенціюючих агентів (ад'ювантів).

У середньому розробка нового вакцинного препарату займає 5...7 років та безпосередньо залежить від низки факторів: фінансування, соціальної зацікавленості, специфіки роботи з патогеном, технологічного забезпечення тощо. Наразі ж виробники прагнуть розробляти імунобіологічні препарати, які будуть ефективними у запобіганні або зменшенні тяжкості перебігу інфекційного захворювання за умови застосування мінімальної кількості доз. Тому зміни, що відбуваються в технологіях виробництва вакцин, пов'язані з необхідністю отримання стабільного антигенного матеріалу з належною імунною відповіддю (обумовленою використанням дієвих ад'ювантів) й обов'язковим високим рівнем безпеки (O'Rourke та ін., 2020).

З метою задоволення сучасних вимог до новітніх імунобіологічних препаратів важливим є етап підбору раціонального і безпечного ад'юванта задля збереження антигенності й досягнення належної імуногенності вакцин. Варто зазначити, що один і той самий ад'ювант може мати здатність як до стимуляції імунітету, так і до інертності залежно від типу вакцинного антигену. Дозволені наразі до використання імунопотенціюючі агенти виконують це завдання завдяки імітації спе-

цифічних наборів еволюційно консервативних молекул, які включають: ліпополісахариди (LPS), компоненти клітинної стінки бактерій, ендцитовані нуклеїнові кислоти, такі як ssDNA, dsRNA, а також неметильований CpG динуклеотид, що містить ДНК (Shah та ін., 2017).

Наразі схвалення нових джерел ад'ювантів може зазнавати значних часових затримок і високих економічних витрат унаслідок нормативних проблем, пов'язаних з питанням їх вивчення, використання, застосування клітинних субстратів або заяви на внесення змін у технологічні процеси отримання — аспекти перешкоди, які стримують новинки, а також затримують доступність вакцин (особливо в країнах з низьким рівнем ресурсів) (Mohan та ін., 2013; Facciola та ін., 2022).

Зважаючи на все вище сказане, питання розгляду та підбору потенційних ад'ювантів з науково доведеною ефективністю й безпечністю для отримання новітніх вакцин не втрачає своєї важливості та перспективності. Варто також зазначити, що абсолютно всі наразі наявні програми вакцинації у світі потребують адекватної підтримки, визнання своєї цінності та економічних вкладень з метою розроблення технологій імунобіологічних препаратів нового покоління.

Метою статті є огляд та узагальнення літературних джерел, які стосуються питань досліджень механізмів і біотехнологічних аспектів отримання й використання актуальних імунопотенціюючих агентів як перспективних ад'ювантів при розробленні новітніх вакцин, зокрема для удосконалення технології отримання вакцин проти ВПГ-2.

Матеріали і методи. Матеріалами досліджень є новітні публікації вітчизняних і зарубіжних науковців у провідних та спеціалізованих періодичних виданнях, що стосуються питань платформ, механізмів і біотехнологічних аспектів підбору ад'ювантів (з акцентом на ад'юванти мікробного походження) для отримання новітніх імунобіологічних препаратів.

Також було використано актуальні та найбільш поширені світові наукометричні бази даних (Google Scholar, Web of Science, PubMed), матеріали провідних закордонних видавництв (Science immunology, Cell, Medicine, Vaccines, Biochemical pharmacology).

Викладення основних результатів дослідження. Обсяг ринку вакцин України та очікувані темпи його розвитку. Загальноприйнято вважати, що вакцинація — цінна інвестиція у здоров'я громадян країни з позитивною економічною віддачею. При чому вакцинацію вважають важливою для системи охорони здоров'я незалежно від виду її переваг (запобігання смерті, збереження років життя: DALY — років життя з поправкою на інвалідність, QALY — набутих років життя із поправкою на якість), про які повідомляється; своєчасне щеплення може забезпечити економію завдяки запобіганню видаткам на охорону здоров'я, пов'язаних з лікуванням ряду відповідних захворювань (<https://www.unicef.org/ukraine/stories/vaccination-for-grown-ups-during-war>).

На сьогодні на світовому ринку існує декілька розроблених вакцин проти ВПГ-2 типу, що сприяють розвитку клітинної імунної відповіді, проте жодна не здатна надати повної гарантії (80...90%) та має певні недоліки. Так, «Chiron» (Британія; препарат на основі двокомпонентних білків та ад'юванта «MF-59») — має різний вплив на організм, обумовлений статтю, «GEN-003» (США; стимулює імуноглобуліни сироватки крові для інактивації вірусу) — знаходиться на стадії

клінічних досліджень, «BNT163» (Німеччина, на основі мРНК, кодує глікопротеїни ВПГ-2, що запобігають проникненню вірусу в клітини й подальшому поширенню) — знаходиться на першому етапі клінічної розробки (Watanabe та ін., 2023; O'Rourke та ін., 2020).

До початку повномасштабної війни на ринку України були представлені ще дві протигерпетичні вакцини — «Герповакс» і «Вітагерпевак» на основі ліофілізованого інактивованого антигену вірусу I і II, що був вирощений на перешеплювальній лінії клітин нирок зеленої мавпи — «Vero B» (є дозволеними ВООЗ як субстрат для виробництва противірусних вакцин) та офіційно зареєстрований у державному реєстрі лікарських засобів України (Calabro та ін., 2022).

Наразі у підконтрольних територіях України наявні деякі види вакцин для імунопрофілактики населення відповідно до чинного «Календаря профілактичних щеплень». Поставки цих імунобіологічних препаратів значною мірою активізувалися впродовж липня-серпня 2022 р., але в імпорті відсутні вакцини проти ВПГ-1 та ВПГ-2.

Отже, вакцинація й нині залишається одним із найбільш ефективних профілактичних методів можливості протидії інфекційним захворюванням й входить до гарантованих державних послуг України. Перелік профілактичних щеплень, які обов'язкові для включення до «Календаря профілактичних щеплень» (складається із 44 обов'язкових вакцин), наведений у *ст. 12 Закону України «Про захист населення від інфекційних хвороб» від 06.04.2000 р. № 1645-III*. Календар у 2020 р. був розширений відповідно до затвердженого наказу МОЗ України на додаткову вакцинацію від 10 інфекційних збудників (проти гемofil'ної інфекції, гепатиту В, паротиту, краснухи та ін.); станом на 2022 р. запланованим було також додаткове впровадження вакцинації проти пневмококової інфекції. Тут варто зауважити, що жоден із нині прийнятих і поданих на розгляд законопроектів України не містить положень щодо впровадження обов'язкової вакцинації проти ВПГ1/2 до «Календаря профілактичних щеплень» (Смілянська, Волянський, Дідоренко, & Карлова, 2024).

Імунологічні особливості використання актуальних ад'ювантів у складі новітніх вакцин. Усі нині існуючі та доступні до використання ад'юванти у складі вакцин умовно можна розподілити та декілька видів залежно від їх функціоналу: можливості зменшення кількості доз введення вакцини, необхідних для активації імунної відповіді або антигену; посилення імуногенності рекомбінантних або очищених антигенів; прискорення імунної відповіді; підвищення ефективності й збільшення тривалості захисту у популяціях зі слабкими імунними відповідями (особи похилого віку, новонароджені, ВІЛ-інфіковані та ін.), а також застосування як системи доставки антигену та його асиміляції у слизовій оболонці епітеліальними клітинами (Mohan та ін., 2013).

Одна з найбільш популярних існуючих класифікаційних систем ад'ювантів базується на механізмах їх дії та має дві основні категорії: імунні потенціатори (частинки) та системи доставки.

Окрім того, усі нині ліцензовані ад'юванти можна також класифікувати за п'ятьма потенційними способами дії: підтримка презентації антигенного матеріалу, індукція CTL (цитотоксичних Т-лімфоцитів), модифікація мереж цитокінів

(імуномодуляція), створення депо й націлення на конкретні імунокомпетентні клітини для подальшої їх диференціації в сенсibilізовані форми (Facciola та ін., 2022).

Загалом, узагальнений механізм активації імунної відповіді (активації клітинної та гуморальної ланок імунітету), наведено на рис. 1. Причому варто зазначити, що в системах доставки ад'ювант не лише пов'язаний з антигеном вакцини, але й функціонує як носій антигену й депо зі здатністю до індукції місцевої прозапальної відповіді шляхом активації вродженої ланки імунітету, що призводить до залучення імунних клітин до місця ін'єкції (Ong та ін., 2021).

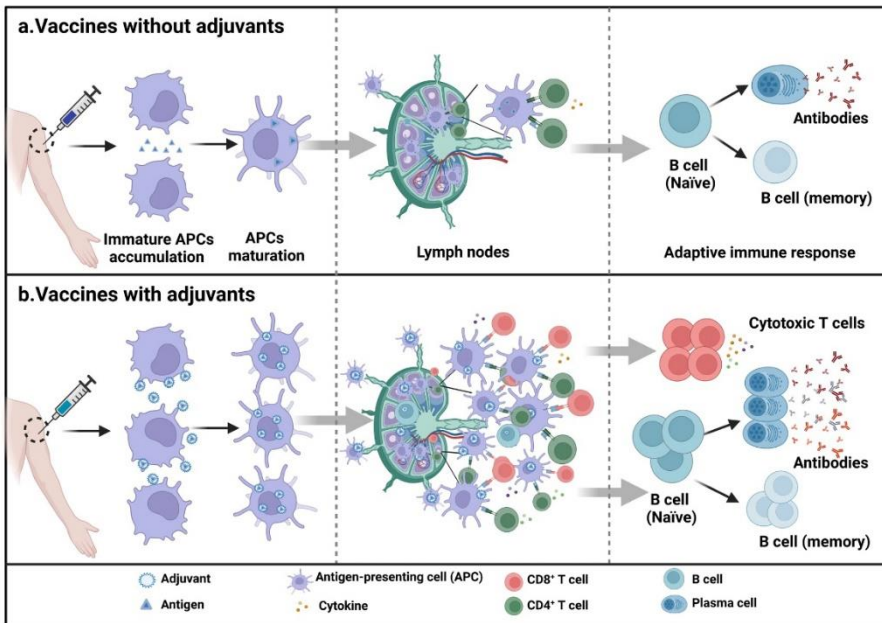


Рис. 1. Узагальнена схема імуногенності вакцин: а. Вакцини без використання ад'ювантів; б. Вакцини з ад'ювантами у своєму складі (Zhao та ін., 2023)

Як видно з рис. 1, вакцини у складі яких ад'юванти відсутні, індуюють більш помірну імунну (адаптивну) відповідь, що характеризується меншою кількістю утворення В-клітин пам'яті та плазматичних клітин; зменшення кількості останніх корелює зі зменшення титру антитіл в імунній сироватці. Варто також зауважити, що щеплення цими вакцинами не призводить до утворення цитотоксичних Т-лімфоцитів.

На противагу першим вакцини, що містять у своєму складі ад'юванти, сприяють дозріванню більшої кількості антигенпрезентуючих клітин (АПК), посиленій взаємодії між антигенпрезентуючими клітинами та субпопуляцією Т-лімфоцитів (CD8, CD4), продукції більшої кількості й різноманітності поляризованих цитокінів, багатофункціональних Т-клітин, а також антитіл. Як результат, імунологічні реакції більш широкого та стійкого типу без потреби у збільшенні дози використаного антигену.

Нині Європейським агентством лікарських засобів (EMA) та Управлінням із

санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів (FDA), ліцензовано ряд ад'ювантів загальновідомих вакцин у світі (табл.1).

Таблиця 1. Узагальнений список ліцензованих ЕМА та FDA ад'ювантів у складі людських внутрішньом'язових вакцин (Facciola та ін., 2022; Apostolico та ін., 2016; Vanderslott, & Marks, 2021)

Торговельна назва	Тип вакцини	Вид ад'юванта
SYNFLORIX	Пневмококова полісахаридна кон'югована вакцина	Фосфат алюмінію (0,5 мг Al ³⁺)
ADACEL	Відновлений дифтерійний анатоксин, правцевий анатоксин та вакцина проти коклюшу	Фосфат алюмінію (0,3 мг Al ³⁺)
VAXELIS	Гепатиту В (рекомбінантна), поліомієліту (інактивована), коклюшу, правця, дифтерії (ацелюлярний компонент), вакцина проти <i>Haemophilus influenzae</i> типу В	Фосфат алюмінію (0,17 мг Al ³⁺); аморфний сульфат гідроксифосфату алюмінію (0,15 мг Al ³⁺)
AVAXIM	Гепатит А (інактивована)	Гідроксид алюмінію (0,3 мг Al ³⁺)
PREVENAR 13	Пневмококова 13-валентна (полісахаридна кон'югована)	Гідроксид алюмінію (0,125 мг Al ³⁺)
BOOSTRIX	Дифтерія, правець, коклюш (безклітинний компонент, знижений вміст антигену)	Гідроксид алюмінію (0,3 мг Al ³⁺) та фосфат алюмінію (0,2 мг Al ³⁺)
TETRAVAC	Дифтерія, правець, коклюш (ацелюлярний компонент), поліомієліт (інактивована)	Гідроксид алюмінію (0,3 мг Al ³⁺)
GARDASIL 9	9-ти валентна вакцина ВПЛ (рекомбінантна)	Аморфний гідроксифосфат сульфату алюмінію (0,5 мг Al ³⁺)
FENDRIX	Гепатит В (рекомбінантна)	AS04, що містить 3-О-дезацил-4'-монофосфорилліпід А (MPL) 50 мкг, адсорбований на гідроксиді алюмінію (0,5 мг Al ³⁺)
CERVARIX	ВПЛ (16, 18-ти типова, рекомбінантна)	AS04, що містить 3-О-дезацил-4'-монофосфорилліпід А (MPL) 50 мкг, адсорбований на гідроксиді алюмінію (0,5 мг Al ³⁺)
SHINGRIX	Оперізуючий герпес (рекомбінантна)	AS01B, що містить екстракт рослини <i>Quillaja saponaria</i> Molina, фракція 21 (QS-21) 50 мкг, 3-О-дезацил-4'-монофосфорилліпід А (MPL) із <i>Salmonella minnesota</i> 50 мкг
FLUAD	Грип (інактивована, поверхневий антиген)	MF59, що містить 9,75 мг сквалену; 1,175 мг полісорбату 80; 1,175 мг сорбітантріолеату; 0,66 мг цитрату натрію; 0,04 мг лимонної кислоти
NUVAXOVID	COVID-19 (рекомбінантна, з ад'ювантом)	Matrix-M, що містить фракцію А (42,5 мкг) і фракцію С (7,5 мкг) екстракту <i>Quillaja saponaria</i> Molina

Інформація, наведена в табл. 1, підтверджує, що більшість нині використовуваних імунобіологічних препаратів з ліцензією ЕМА й FDA характеризуються наявністю ад'ювантів різної природи, але переважно синтетичного походження (солі алюмінію, на основі/з вмістом сквалену). Загалом, така закономірність є цілком зрозумію, адже ці ад'юванти є одними з першочергово ліцензованих для використання в рецептурах вакцинних препаратів.

Впровадження до використання у складі вакцин нових видів ад'ювантів, зокрема мікробного походження, має часову пролонгацію, обумовлену необхідністю дотримання всіх наявних вимог без впливу на безпеку нових імунопотенціюючих агентів, що є складним завданням для науковців і фармацевтичних компаній при виборі джерел їх одержання. Саме тому на сьогодні у світі існує надмірно малий відсоток ад'ювантів, які включено до складу широко використовуваних ліцензованих вакцин. Отже, потреба в розширенні джерел отримання та пошук способів виділення нових видів ад'ювантів з метою підвищення безпеки й ефективності отриманих вакцинних препаратів, зокрема вакцин проти ВПГ-2 є актуальним завданням сьогодення (Malik та ін., 2018).

На підтвердження цієї потреби можна привести ситуацію з нещодавною пандемією COVID-19, яка підкреслила особливу важливість суспільного доступу до ефективних вакцин задля протистояння потенційній загрозі нових спалахів захворювань. Ад'ювантні властивості імунопотенціюючих агентів у вже ліцензованих протиковідних вакцинах (РНК-вакцинах) пов'язані з ліпосомальними компонентами, що використовуються як носії кодууючої РНК. Причому найновіша ліцензована вакцина проти COVID-19 у своєму складі має «Matrix-M» — ад'ювант на основі природних компонентів з фракцією-А та фракцією-С екстракту *Quillaja saponaria* Molina (Brito, Malyala, & O'Hagan, 2013).

З огляду на все сказане вище, при розробці новітніх вакцин проти ВПГ-2 важливим є підбір не лише природнього, але й раціонального та ефективного імунопотенціюючого агента, що відповідатиме таким вимогам: не вступатиме в небажані реакції взаємодії з іншими компонентами вакцини, буде доступним, матиме просту технологію виділення, а також наукові та експериментальні шляхи підтвердження своєї імуностимулюючої активності. При цьому важливо також враховувати можливий термін зберігання, економічну життєздатність й фармацевтичні характеристики ад'юванта — рівень ендотоксину, рН, осмоляльність, термостійкість тощо.

Ліцензовані ад'юванти як імунопотенціюючі агенти у складі вакцин. Важливою умовою входу вакцин у практику є наявність ліцензованих ад'ювантів, що мають підтверджену дієвість відповідними нормативними документами, отриманими на основі результатів проведених наукових досліджень. Саме тому дослідження різноманіття сімейства молекулярних сполук, які підвищують тривалість імунної відповіді та імуногенність вакцин, мають важливе значення для науково обґрунтованої максимізації захисного ефекту імунобіологічних препаратів шляхом підвищення величини та тривалості імунної відповіді (Pulendran та ін., 2021).

Ад'юванти на основі алюмінію (алюміній гідроксид або алюмінієвий галун) нині застосовують у складі щонайменше 146 схвалених вакцин для профілактики захворювань. Деякі з них вже згадувались у табл. 1. Натепер ад'юванти на основі

солей алюмінію можуть існувати у трьох типах: алюмінію фосфат, алюмінію сульфат та алюмінію гідроксид.

Ефективність цього виду імунопотенціюючих агентів забезпечується за рахунок створення «депо» для антигену, що локалізується у місці ін'єкції, подальшим уповільненням його вивільнення (за рахунок сорбції пролонгується контакт вакцини з клітинами), а також потужною гуморальною відповіддю за слабкої індукції клітинно-опосередкованої імунної відповіді. Варто зауважити, що з метою запобігання розвитку абсцесу за підшкірної інокуляції введення вакцин із солями алюмінію необхідно здійснювати виключно внутрішньом'язово. Це, у свою чергу, суттєво зменшує коло імунобіологічних препаратів з цим видом ад'ювантів (Гулянич, Недосеков, & Годовський, 2017; Powell, Andrianov, & Fusco, 2015).

Загалом, механізм імуностимулюючої дії гідроксиду алюмінію та інших ад'ювантів на їх основі добре описаний науковцями (Ho та ін., 2018; Pulendran, Aruna-chalam, & O'Hagan, 2021). Він полягає в утворенні агрегатів задля безперервного вивільнення антигенів, часткових структур, які сприяють фагоцитозу антигенпрезентуючих клітин, а також ініціації локального запалення через інфламасому NLRP3 із подальшою презентацією антигенів (залучення й активація макрофагів зі збільшенням експресії молекул ГКГ II). Активація інфламасоми індукує секрецію зрілого IL-1 β й IL-18 дендритними клітинами, диференціювання клітин Т-хелперів Th2, сприяючи активації В-клітин й подальшому виробленню імуноглобулінів IgG. Однак у цих дослідженнях також окреслені незалежні від NLRP3 шляхи виробництва імуноглобулінів і нефагоцитарний спосіб дії гідроксиду алюмінію.

Хоча ад'юванти на основі солей алюмінію набули широкого використання у вакцинних препаратах, для більшої ефективності потенціювання імунної відповіді необхідно приділити особливу увагу попередженню впливу цього ад'юванта на стабільність антигенної композиції. Загалом, алюмінієвий галун да змогу збільшити титр антитіл проти патологій вірусного або бактеріального характеру, проте алюмінієвий гідроксид вважається генотоксичною речовиною, яка за надлишкової кількості в організмі здатна призводити до погіршення пам'яті, психічних розладів, незворотніх змін, а також хвороб Альцгеймера та Паркінсона. Окрім того, існує ризик підвищення розвитку атеросклерозу та епілепсії (Rivas та ін., 2005).

Групою вчених (Gherardi та ін., 2001) на початку двохтисячних років експериментальним шляхом було підтверджено утворення довгострокових (упродовж десятиліть) локальних відкладень солей алюмінію у місцях ін'єкцій — макрофагальний міофасцит. Спочатку вважалося що депо-ефект є важливим для ад'ювантної активності галуну, але це в подальшому було спростованим завдяки демонстрації їх ад'ювантної дії навіть після виведення депо. Однак на сьогодні будь-який шкідливий патофізіологічний вплив довготривалих відкладень солей алюмінію в тканинах і пов'язаний з ними макрофагальний міофасцит залишається предметом наукових дискусій (Principi, & Esposito, 2018; Duwe, & Niedzwiecki, 2018; Badran та ін., 2022).

Нині раціональний дизайн новітніх безпечних та ефективних вакцин передбачає вибір відповідного ад'юванта з урахуванням очікуваного ефекту, впливу на безпечність та ефективність вакцини, отриманої з його використанням, економічної доступності, а також умов застосування імунопотенціатора, що відповідатиме

бажаному імуногенному потенціалу — виклику доречної імунної відповіді за найменшого ризику для здоров'я людини. При цьому застосування найбільш раціонального та безпечного ад'юванта — важливе для опосередкованої ним індукції імунітету різних типів вакцин, адже навіть якщо компоненти антигену та ад'юванта є безпечно поєднуваними індивідуально, утворена ними суміш може бути неоптимальною, несумісною і впливати на безпечність та ефективність отриманих новітніх протиінфекційних засобів (De Gregorio, & Rappuoli, 2014).

Згідно з доступними для широкого загалу працями, висвітленими у світових наукометричних базах даними, дослідження вчених останніми роками (Ong, Lian, Kawasaki, & Kawai, 2021; Hennessy, & McKernan, 2021; Mu, Dong, & Wang, 2023; Hao та ін., 2020; Mekonnen, Mengist, & Jin, 2022) були зосереджені на задіянні у виробництві новітніх ад'ювантів, імуностимулююча дія яких обумовлена безпосередньою взаємодією рецепторів розпізнавання патернів вроджених клітин імунної системи людини (PRR).

Така увага обумовлена роллю клітин вродженого імунітету у формуванні імунологічної реакції під час зустрічі із збудником захворювання, зокрема здійснення модулюючої функції (сигналів) імунної системи за рахунок організації адаптивної імунної реакції та націленню на специфічні імунні відповіді, що значною мірою доведено для точного налаштування відповідей Т-клітин й продукції антитіл плазматичними клітинами. Наприклад, ад'юванти, націлені на TLR як CpG1018 (TLR9) та MPL, вже включені до складу ліцензованих вакцин разом з кількома іншими: R848, TLR7/8 ліганд, що продемонстрували великі перспективи у стимуляції стійких і тривалих Т- і В-клітинних відповідей. Незважаючи на те, що нове покоління ад'ювантів — багатообіцяюче, механізми їх дії й досі є недостатньо вивченими (Kwissa та ін., 2012).

Відповідно до даних, опублікованих у (Harandi та ін., 2018), найбільш широко використовуваними ад'ювантами наразі є імунопотенціюючі агенти на основі масляно-водної емульсії. Загалом, упродовж більше 70 років, починаючи від першої ліцензії ад'юванта у 1920-х роках, галуни (нерозчинні солі алюмінію) залишаються єдиними ад'ювантами, включеними до складу ліцензованих імунобіологічних препаратів — вакцин проти правця, кашлюку, дифтерії, гепатиту В, а також проти ВПЛ (вірусів папіломи людини). Однак у 1990-х роках до ліцензованого у Європі для дорослих старше 65 років продукту «Fluad» — тривалентної інактивованої вакцини проти сезонного вірусу грипу, вперше було включено ад'ювант MF59 «масло-у-воді».

У дослідженнях (Cid, & Bolívar, 2021) зазначається, що за минулі 20 років лише 4 інші ад'юванти були ліцензовані та, відповідно, включені до складу вакцин, а саме: «AS04» (3- О -деацил-4'-монофосфорилліпід) — проти ВПЛ «Cervarix» та гепатиту В «Fendrix», «AS03» (полісорбат 80, сквален, DL- α -токоферол) — проти грипу «Pandemrix» та «Arepanrix», «AS01» (монофосфорильований ліпід А, сапонін QS-21) — проти оперізуючого лишая «Shingrix» і малярії «Mosquirix» та імуностимулятор «CpG 1018» (неметильовані цитозин-фосфат-гуанінові олігодезоксинуклеотиди) — проти гепатиту В «Hepelisav-B».

Наразі одним з ад'ювантів масляно-водної емульсії, що набув широкого розповсюдження в експериментальних наукових дослідженнях, є ад'ювант Фрейнда у

повний «ІФА» (додатково вміщує вбиті бактеріальні клітини *Mycobacterium tuberculosis* для залучення макрофагів й інших вроджених клітин імунної системи до місця ін'єкції; здебільшого використовують за первинної імунізації) та неповний «СФА» формах. Типова ж композиція «СФА» має у своєму складі 1 мг вбитих бактеріальних клітин (нагріванням) *Mycobacterium tuberculosis* та висушених з 0,85 мл парафіну й 0,15 мл Arlacel® 83 (суміш олеїнової, пальмітинової, стеаринової та лінолевої ефірів з 2-(3,4-дигідрокситетрагідрофураніл)-етиленгліколем) (Malik та ін., 2018).

Використані активні компоненти згаданих вище ад'ювантів обумовлені наявністю *Mycobacterium tuberculosis*, дипептиду, N-ацетилмураміл-L-аланін-D-ізо-глутаміну — активує макрофаги й дендритні клітини через домен олігомеризації, що зв'язує нуклеотиди, які містять 2 (NOD2) і скелетні елементи стінки бактеріальної клітини. Варто також зауважити, що «СФА», окрім запалення, викликає агрегацію та преципітацію розчинних білкових агентів з утворенням частинок, які сприяють їх подальшому ефективному поглинанню антигенпрезентуючими клітинами; позитивно впливає на синтез імуноглобулінів IgG (на протипагу синтезу класу IgM) та субпопуляцій Т-хелперів Th1; сприяє реакціям відстроченої гіперчутливості, а також пригнічує індукцію толерантності. Однак за рахунок підтвердженої експериментальними дослідженнями токсичності й наявності ряду побічних реакцій цього ад'юванту, його подальше використання для отримання новітніх вакцин є неприйнятним, на протипагу «ІФА», який має меншу токсичність, завдяки чому підходить для клінічного використання (Beirne та ін., 2015; Tadepalli та ін., 2017).

На сьогодні широкого застосування у виробництві вакцинних препаратів набули ад'юванти на основі сквалену «MF59» (наноемульсія типу «масло у воді», містить сквален), «AS03» (містить α -токоферол) та ад'юванти-агоністи TLR рецепторів — «CpG1018» (агоніст TLR4), «AS01b» та «AS04» (TLR5,6,7). Додатково до переліку ліцензованих імунопотенціюючих агентів вакцин необхідно додати ад'юванти, які за своєю хімічною природою є поверхнево-активними речовинами — «Span 85» й «Tween 80». Слід також зазначити, що терпен (сквален) наразі використовується як допоміжний засіб для кількох різних вакцин з антигенами вірусів гепатитів (В і С), а також ВПГ-1 (вірус простого герпесу) (Galson та ін., 2016).

Дія іншого імунологічного ад'юванту на основі сквалену «MF59» асоціюється зі збільшенням активності Т-клітин, зокрема Т-хелперів, і вищою продукцією антитіл класів IgG1 та IgG2a. Також повідомляється, що MF59 здатний індукувати імунні відповіді Th1 клітин в CD8⁺ Т-лімфоцитів (Yang та ін., 2020).

Авторами статті (Clark та ін., 2009) експериментальним шляхом продемонстровано, що ад'ювант «MF59» здатний сприяти сероконверсії й серопротекції вже через 21 добу після введення першої дози вакцини проти вірусу грипу А/Н1N1. Також було виявлено, що застосування цієї вакцини характеризується вищим відсотком серопротекції та сероконверсії через 21 і 42 дні за умови використання ад'юванта. Причому повідомляється лише про помірні й легкі реакції (головний біль) на введення, що здебільшого локалізуються у місці здійснення ін'єкції (синці, біль у м'язах). Однак жодна з цих побічних реакцій не тривала більше 72 годин.

Іншими вченими (Desbien та ін., 2015) було протестовано декілька перспективних формул потенційних ад'ювантів, які вміщують сквален та інші сполуки у своєму складі — емульсія «масло у воді» зі скваленом «GLA-SE» та глікопіранозилліпідний ад'ювант «GLA». Було показано, що ад'ювант «GLA-SE» здатен індукувати сильну імунну відповідь шляхом передачі сигналів через TLR-4 шлях, IL-18, IFN- γ та каспази, що, у свою чергу, сприяло до відповіді Th1.

Ад'ювант «GLA-SE» використовується у складі вакцин проти туберкульозу, що відзначаються потужною продукцією антитіл з піковою кількістю після другої імунізації та незначними реакціями у легкій формі (втома, загальна слабкість і головний біль) (Coler та ін., 2018).

На сьогодні у світовій практиці було введено понад 20 млн доз вакцин з ад'ювантом «AS03» з результатами оцінки біобезпеки від прийнятих до відмінних (Reed та ін., 2009).

Так, у статті (Wimmers та ін., 2021) описані дослідження вакцини проти вірусу грипу з ад'ювантом на основі сквалену «AS03» на добровольцях. Згідно з результатами досліджень, використання цього ад'юванта спровокувало тривалі модифікації гістонів та епігенетичні зміни в моноцитах до 21-ї доби після вакцинації. Виявлено, що класичні моноцити при цьому зберігають підвищений рівень хроматину антивірусних локусів IRF, включно з ключовими противірусними імунними регуляторами (IRF1, IRF8, RIG-1 (DDX58)) та рядом генів стимульованими інтерферонами. Варто зауважити також й більшу ефективність моноклеарних клітин периферійної крові (PBMCs) у вакцинованих піддослідних заражених Данге та вірусом Зіка (контролювали «*in vitro*»). Про це свідчать зниження вірусного навантаження після вакцинації культури та кореляція титрів вірусів з рівнями експресії інтерферон-регуляторних факторів (IRF). Тож введення ад'юванта «AS03» до складу вакцини мало позитивний ефект.

Актуальним нині новим агоністом TLR7/8 рецепторів є «3М-052», який здатний індукувати потужні антигенспецифічні імунні відповіді за рахунок клітинних відповідей Т-хелперів Th1 у поєднання з імуноглобулінами та плазматичними клітинами. Проте, незважаючи на наявність доказової бази потужності «3М-052» як вакцинного ад'юванта, механізми його дії й досі залишаються недостатньо дослідженими. Усі наразі існуючі дані щодо вивчення ад'ювантного потенціалу «3М-052» є обмеженими характеристикою периферичної імунної відповіді у крові від ННР. При цьому важливим залишається факт відсутності ґрунтовних даних щодо подій, які відбуваються у лімфатичних вузлах як місцях ініціації імунних відповідей (Arunachalam та ін., 2020).

Загальновідомо, що після первинного щеплення активовані дендритні клітини з локального місця введення ін'єкції мігрують до дренуючих лімфатичних вузлів з метою представлення антигену Т-лімфоцитам й секреції цитокінів, де останні націлені на підтримку диференціації Т- та В-клітин, стимулюючи таким чином імунну відповідь (Liang та ін., 2017). Але, незважаючи на наявні свідчення про доведену потужну активацію вродженої і адаптативної ланок імунітету, дослідження, які б порівнювали імунні відповіді індуковані живими вірусними вакцинами, що можуть викликати стійку продукцію імуноглобулінів, із вакцинами з ад'ювантом «3М-052», — відсутні (Kasturi та ін., 2020).

У (Lee, Wimmers, & Pulendran, 2022; Kasturi та ін., 2020) описано дослідження на лабораторних мишах щодо молекулярного атласу імунітету до ад'ювантних живих та ослаблених вакцин. Для створення комплексної клітинної транскриптомної та епігеномної картин вродженої імунної відповіді у dLN на ранніх і пізніх термінах після імунізації антигеном з ад'ювантами «YF-17D» або «3M-052-Alum» було використано імунофлюоресцентний аналіз (проточну цитометрію), одноклітинне секветування АТАС (scATAC-seq) та РНК (scRNA-seq). Встановлено індукцію активації й рекрутингу мієлоїдних клітин у dLNs зі стійкою гуморальною відповіддю у мишей на 14 і 28-й день після імунізації антигеном плюс «3M-052/Alum», що вказує на високий титр антитіл класів IgG, IgG2c, IgG3. Окрім того, відмічається значне посилення відповіді зародкового центру, Т-фолікулярних хелперних клітин, а також підвищення титру імуноглобулінів після здійснення імунізації 5 мкг «3M-025-Alum» порівняно з використанням галуну окремо як ад'юванта.

Отже, кожен із перерахованих вище синтетичних ад'ювантів та їх систем характеризується різноплановістю негативного впливу з-поміж вже згаданих плюсів від використання. До прикладу емульсійні ад'юванти можуть мати токсичну дію у складі профілактичних вакцин, провокувати виразки та гранульоми (у місці введення), неповне формування імунної відповіді, запальні реакції тощо (Burny, Callegaro, & Clement, 2017). Так, емульсійний ад'ювант «MF59», окрім бажаної імуностимулюючої дії, володіє побічними ефектами у місці ін'єкції, а також може провокувати еритеми й ущільнення (Mori та ін., 2023).

Відповідно до результатів попередньо проведених наукових досліджень на мишах ін'єкції вакциною з ад'ювантом MF59 стимулюють позаклітинне вивільнення АТФ, інгібування якого місцевими ін'єкціями апірази може послаблювати імунну відповідь (Vono та ін., 2013). Відтак імунізація мишей MF59 призводить до некроптозу макрофагів лімфатичних вузлів і стимуляції антиген-специфічних CD8+ Т-клітин (Kim та ін., 2020).

Небажані побічні реакції також притаманні ад'юванту Фрейнда, що включають у себе посилення больових відчуттів у щеплених тварин з потенційними загрозами їх безпеці й здоров'ю. Тому навіть при здійсненні досліджень на тваринах висунуті певні рекомендації щодо використання СФА через обумовлені хворобливі реакції і можливості ушкодження тканин. Варто також зазначити, що ад'ювант Фрейнда володіє токсичними характеристиками для людей через високий вміст відпрацьованих масел — призводять до гранулом, уражень і запалень у місці ін'єкції; не піддаються біологічному розкладанню (Mohan та ін., 2013).

Окремо виділена група солей алюмінію, яка вже давно набула найбільшого розповсюдження як імунопотенціюючий агент у складі вакцин, ще й досі залишається предметом обговорення наукової спільноти. Адже поряд з низькою захисною ефективністю додатково характеризується потенційною токсичністю, можливими алергічними реакціями та здатністю сприяти виникненню автоімунного/запального синдрому (ASIA) (Owen та ін., 2021).

Беручи до уваги усе вищесказане, повною мірою аргументованим є більш детальний розгляд потенційної можливості використання ад'ювантів мікробного походження у складі новітніх вакцин.

Перспективні ад'юванти мікробного походження для створення новітніх вакцин. Нині питанням дослідження, вивчення та застосування ад'ювантів бактеріальної природи у вакцинології присвячено ряд зарубіжних праць. У (Parmaksiz, Pekcan, & Şenel, 2023) висвітлено перспективні аспекти створення ад'ювантної системи на основі комбінації нейтральних і катіонних ліпосом з поринами *Salmonella typhi* у формі наночасток з використанням модельного антигену овальбуміну.

Іншими вченими (Lee та ін., 2011) запропоновано ад'ювантний ефект від використання сферичних нанометричних везикул зовнішньої мембрани *Escherichia coli* (OMV) на антигенспецифічний праймінг Т-клітин.

У (Taleghani, Bozorg, & Zamani, 2019) розглянуто можливість застосування MPL-A (монофосфорилліпід А, виділений з генетично сконструйованого штаму *Salmonella minnesota* R595) — перший ліганд TLR, що був схвалений для використання як ад'ювант при створенні вакцин для людини.

Широко відомим ад'ювантом мікробного походження є ад'ювант бактеріальної природи — флагелін, що являє собою структурний білок джгутиків грамнегативних бактерій; складається із 494 амінокислот. Більшість білкових молекул флагелінів, після потрапляння в організм людини, залишаються у джгутиках бактерій, проте деякі з них все ж таки вивільняються у середовище, даючи змогу імунній системі бути розпізнаними (Hajam, Dar, & Lee, 2017).

Як показують дослідження (Murthy, Deb, & Salzman, 2004) гіперконсервативні N і C кінці флагеліну можуть розпізнаватись молекулами Toll-рецепторів імунних клітин та в діапазоні 1...10 nM і викликати максимальну інтенсивність сигналізації розпізнаним рецептором. Зокрема, йдеться про рецептор TLR-5, який експресується на макрофагах, лімфоцитах і дендритних клітинах.

Саме ж розпізнавання рецептора TLR-5 за використання флагеліну призводить до передачі сигналу двома шляхами — MyD88-залежним та MyD88-незалежним, які, у свою чергу, обумовлюють індукцію факторів транскрипції NF- κ B, IRF3 й AP-1, що призводить до продукції хемокинів й цитокінів — направляють (приваблюють) ДК, а також Т- та В-лімфоцити до лімфатичних вузлів. Тут варто зауважити, що флагелін може сприяти сильній антиген-специфічній Т-клітинній (CD4⁺) відповіді за рахунок взаємодії з рецепторами TLR-5 на CD11c⁺ клітинах. Як результат, високий титр імуноглобулінів, який демонструє потенціал ад'ювантної активності флагелліну (Bates, Uematsu, & Mizel, 2009).

Детальний опис суті проявлення ад'ювантних властивостей флагеліну описаний у (Huleatt, Nakaar, & Powell, 2008), де автори зазначають, що флагелін у вакцинних препаратах використовують шляхом спільного введення з основним антигеном, а також через злиті білки, одержані завдяки додаванню епітопів, пов'язаних з молекулою флагеліну. Доведено, що фізичне зв'язування антигенів імунобіологічних препаратів створює більш потужну вакцину, ніж звичайне змішування флагеліну з антигеном. Нині вже також визначено, у які саме ділянки молекули флагеліну необхідно вставити епітопи задля максимізації титру антитіл. Однак остаточні висновки досліджень з цього питання наразі поки відсутні.

Авторам статті (Song, Zhang, & Paessler, 2009) вдалось одержати оптимальні титри утворених антитіл шляхом введення в гіперваріабельну ділянку флагеліну епітопу гемаглютиніну (HA). L. Song з колегами розробили підхід зв'язування аго-

ністів TLR-5 та флагеліну з самодостатньою захисною субодиницею НА (глобулярною голівкою). Таке практичне рішення є вельми доречним, адже домен глобулярної голівки охоплює більшість нейтралізуючих епітопів НА та в контексті злитого білка флагеліну стабільно повторно згортається для точного формування цих конформаційно чутливих епітопів. Ці злиті білки — імунологічно потужні вакцини, що можуть бути експресовані у стандартних системах прокаріотичної ферментації, якими є *Escherichia coli*). За результатами здійснених досліджень встановлено, що тестована вакцинна R3 конфігурація (обидва кінця глобулярної голівки НА прив'язані до флагеліну) з-поміж декількох вакцин підтипу H5 (на основі вірусу грипу A/Vietnam/1203/2004 (VN04)), у якій домен D3 флагеліну замінено глобулярною голівкою НА, є найбільш ефективною для виявлення захисних титрів НАІ та захисту лабораторних мишей від захворювання й пов'язаних з ним летальних наслідків.

Як показують дослідження (Delaney, Phipps, & Mizel, 2010), вставка у гіперваріабельну ділянку епітопу L1R обумовлює продукцію імуноглобулінів, а за умови вставки у N-кінець флагеліну — утворення антитіл, здатних взаємодіяти з нативним L1R.

У праці (Lin та ін., 2016) продемонстровано, що вставка епітопів до іншого кінця білка (C-кінця) індукує передачу сигналів через NLRC4 і NAIP5. Результат — CD8⁺ Т-клітинні відповіді проти пухлинних клітин. Така експериментально продемонстрована різниця шляхів відповідей імунної системи свідчить про універсальність флагеліну як допоміжного засобу різної цільової направленості залежно від обраної області введення антигену. Проте для повного розкриття потенціалу використання ад'ювантних властивостей флагеліну необхідним є здійснення подальших фундаментальних наукових досліджень.

Варто також відмітити позитивні аспекти використання фрагментів джгутиків бактеріальних клітин, а саме: ефективність за низького дозування, відсутність токсичності пов'язаної з інтраназальним введенням на тваринних моделях та синтезу IgE.

У (Treanor, Taylor, & Shaw, 2010) підтверджується безпечність застосування ад'ювантних властивостей злитих білків флагеліну в досліджуваних вакцинах проти грипу А H1N1. Згідно з отриманими результатами, стабілізація всіх без винятку наявних побічних ефектів в одних дослідницьких групах відтворюється після 4 діб відпочинку; в інших — після прийому нестероїдних протизапальних засобів.

До перспективних ад'ювантів мікробного походження з точки зору науки та імунобіотехнологій нині також відносять везикули зовнішньої мембрани (OMV) отримані з використанням грамнегативних бактерій (*Escherichia coli*). OMV є сферичними протеоліпосомами (нанометричні везикули), що утворюються виступами на зовнішній мембрані та містять фактори вірулентності різної хімічної будови (білки, пептидоглікани, ліпополісахариди, екзотоксини, ДНК, РНК); являють собою новий підхід до розробки вакцин завдяки їх запальному потенціалу й стимуляції вродженої та адаптативної ланок імунітету. Оскільки бактеріальні везикули BMV (зовнішньої мембрани, позаклітинні) несуть велику кількість антигенних матеріалів і мають здатність індукувати імунну відповідь «*in vivo*», на сьогодні їх

одержують у значних кількостях з бактерій як дикого типу, так і з генномодифікованих. Зокрема, розповсюдженою наразі є розроблена система клонування на основі *Escherichia coli* та похідних OMV, злитих з ліпопротеїном I зовнішньої мембрани (OprI) *P. aeruginosa*. На практиці ця система виявила імуногенність стимулюванням дендритних клітин/макрофагів, демонструючи потенційну ад'ювантність (Daleke-Schermerhorn, Felix, & Luirink, 2014).

Як потужна й універсальна вакцинна платформа, бактеріальні везикули стимулюють CD4⁺ Т-клітинну і В-клітинну відповіді за рахунок розпізнавання молекул, зокрема ліпополісахаридів (LPS) на мембранах молекулами TLR та системою комплементу, що призводить до залучення АПК клітин. Така спільна стимуляція молекулами OMV є більш потужною за самостійну виключно за рахунок задіяння LPS. При цьому бактеріальні мембранні везикули не тільки індукують дозрівання дендритних клітин з метою посилення захоплення молекул антигену з подальшою його презентацією (зادля розвитку адаптативної відповіді), але й також активують В-клітини для виробництва різних класів імуноглобулінів (IgA, IgM, IgG) (Zingl, Leitner, & Schild, 2020).

Загалом, усі локальні різновиди бактеріальних везикул привабливі для розробки вакцинних препаратів завдяки здатності презентувати білки варіабельних розмірів (50...200 нм) з різних джерел, які можуть бути легко захоплені імунними клітинами (призводить до підвищення ефективності обробки і доставки антигену), а й також природній присутності патоген-асоційованих молекулярних патернів (PAMP) для виклику сильних імунних відповідей (Krishnan, Kubiawicz, & Zhang, 2022).

Вищезазначені впливи бактеріальних везикул на імунну систему детально описані в наукових працях (Vader та ін., 2016; Elsharkasy, Nordin, & Vader, 2020; Buschmann, Mussack, & Byrd, 2021), де також підкреслюється їх ад'ювантна здатність до індукції пролонгованих імунних відповідей (клітинних і гуморальних) у складі розроблюваних вакцин.

Дані властивості можна пояснити більш високою щільністю PAMP на BMV. Окрім того, завдяки біогенезу BMV — мають широкий спектр бактеріальних мембранних антигенів, що можуть служити основними мішенями для вакцин (Mehanny, Lehr, & Fuhrmann, 2021).

На сьогодні вже існує ряд експериментальних даних щодо застосування бактеріальних везикул в імунобіотехнологіях (Masfortol, Gil, & González, 2017). Деякі види вакцин з ад'ювантами OMV вже почали переходити на стадію клінічних випробувань завдяки попередньо продемонстрованій ними безпеці та ефективності: вакцини проти грипу, алергенів (фаза I клінічних випробувань) та *Shigella flexneri* (фаза I і II клінічних випробувань) (Martínón, Cisneros, Calderón-Vargas, 2019). Зазначені вакцини вводились інтраназально й стимулювали вироблення імуноглобулінів лише з незначними побічними ефектами (імуностимулюючі білки та LPS з OMV не реплікуються — підвищує їх безпеку), що додатково підкреслюють потенціал ад'ювантних властивостей бактеріальних везикул (Daleke-Schermerhorn, Felix, & Luirink, 2014).

У (Afrough, Karam, & Siadat, 2020) розроблено вакцину-кандидата на основі злиття PorA серогруп A, B (*N. Meningitidis*) та OMV із тестом на лабораторних

тваринах та контролі на порівнянні ефективностей OMV з іншими широко розповсюдженими ад'ювантами. У ході експериментальних досліджень здійснювали вакцинування (підшкірно) лабораторних мишей ін'єкцією із сумішами білків PorA, OMV і ад'ювантом Фрейнда. Після чого проводили аналіз бактерицидної активності сироватки (SBA), а імунні відповіді вимірювали методом ELISA. Отримані результати засвідчують значно вищий титр антитіл у групах мишей вакцинованих із використанням OMV порівняно з вакцинуванням з ад'ювантом Фрейнда. При цьому рекомбінантний білок PorA плюс ад'ювант OMV були здатні індукувати відповіді антибактеріальних антитіл проти серогруп A і B у модельних мишах BALB/c.

Іншими науковцями (Gan, Li, & Ding, 2021) було запропоновано використання EV, отриманих з грампозитивних бактерій, а також OMV грамнегативних бактерій — *Bacillus anthracis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, як системи доставки у боротьбі з інфекціями бактеріальних збудників. Проте застосування EV і OMV як ад'ювантів бактеріальної природи має свої недоліки через складність підтримання мембрани за рахунок відносної крихкості структури MB, що може вплинути на їх поглинання антигенпрезентуючими клітинами. Для вирішення даної проблеми автори статті пропонують використовувати покриття MVs на наночастинки для збільшення стабільності «*in vivo*» та часу циркуляції.

Нині OMV вже було включено до ліцензованої багатокомпонентної рекомбінантної менингококової вакцини 4CMenB «Bexsero» (широко використовується у багатьох країнах світу) (Acevedo, Fernández, & Perez, 2014). Тут слід підкреслити також виявлені перехресні здатності вакцини «Bexsero» та «MeNZB» OMV, описані австралійськими вченими.

Згідно з проведеними у праці (Semchenko, Tan, & Seib, 2019) дослідженнями оцінки утворення антитіл (імуноферментний аналіз) було встановлено, що антитіла проти гонококів, індуковані MeNZB-подібними білками OMV, можуть пояснити попередні спостереження щодо зниження захворюваності на гонорею після вакцинації MeNZB. При цьому високий рівень людських антигонококових антитіл NHBA, що утворюються під час вакцинації «Bexsero», забезпечує додатковий перехресний захист від захворювання на гонорею. Наукові пояснення причинно-наслідкового зв'язку перехресного впливу від вакцинації досі з'ясовуються.

Зазначені результати добре корелюються з думкою науковців з Нової Зеландії (Petousis-Harris, & Radcliff, 2019) щодо потенційного впливу вакцини проти менингококової інфекції з OMV ад'ювантом (MeNZB) на перехресний захист від гонореї, посиляючись у своїй гіпотезі на проаналізовані екологічні спостереження за статистикою зареєстрованих захворювань.

Узагальнюючи інформацію з проаналізованих наукових публікацій щодо плюсів і мінусів використання ад'ювантів мікробного походження, можна стверджувати, що ад'юванти OMVs потребують більш раціонального дизайну для виклику оптимальної імунної відповіді. Наявна надмірна кількість ендотоксинів у складі OMV обумовлює потребу у здійсненні їх постійного контролю. Важливим також є те, що OMV у поєднанні з деякими агоністами TLR здатні до виклику неконтрольованої імунної відповіді — фактора надмірного запалення (Gnoro, Watkins, & Putnam, 2017).

До мінусів застосування ліпополісахаридів як імунопотенціюючих агентів можна віднести їх токсичність, що досить ускладнює переклад використання LPS-ад'ювантів на клінічний сценарій разом із проблемами стабільності, а отже, виробництва та забезпечення якості (Facchini та ін., 2021).

Висновки

У запропонованому огляді розглянуто проблематику отримання новітніх вакцин проти ВПГ-2, що обумовлено різкою потребою в цьому імунобіологічному препараті для працездатного населення України. Окреслені сучасні та актуальні ад'юванти у межах механізмів індукції безпечної імунної відповіді (з урахуванням природи патогену), методів їх одержання й наукових досліджень щодо можливості застосування у складі вакцин.

Науково обґрунтованим нині залишається використання імунопотенціюючих агентів синтетичного походження — солей алюмінію, ад'юванта Фрейнда «IFA» та «CFA» (додатково вміщує вбиті бактеріальні клітини *Mycobacterium tuberculosis*), ад'ювантів на основі сквалену («MF59»), наноемульсій типу «масло у воді» «AS03» (додатково вміщує α -токоферол), а також ад'ювантів на основі ПАР («Span 85», «Tween»).

Позаяк наразі з'являється все більше наукових досліджень щодо доцільності застосування ад'ювантів мікробного походження на кшталт сферичних нанометричних везикул зовнішньої мембрани *Escherichia coli* (OMV), ад'ювантної системи на основі комбінації ліпосом (нейтральні й катіонні) з поринами *Salmonella typhi* у формі наночасток з використанням модельного антигену овальбуміну, MPL-A з генетично сконструйованого штаму *Salmonella minnesota* R595, а також структурного білка джгутиків грамнегативних бактерій — флагеліну.

З'ясовано, що все більшої актуальності досягає застосування агоністів TLR рецепторів, зокрема «CpG1018» (агоніст TLR4), «AS01b» й «AS04» (TLR5,6,7), адже ці ад'юванти здатні ініціювати стійкі Т- і В-клітинні відповіді.

Показовим є відсутність аналізу жодного вітчизняного наукового видання з питань підбору нових ефективних ті безпечних ад'ювантів різного походження. Першочергово це пов'язано з недостатньою кількістю праць вітчизняних українських досліджень за відповідною тематикою.

Усі ці фактори засвідчують необхідність докладання спільних зусиль наукової спільноти, економічних впливань і сприяння розвитку науки на рівні влади для сучасного розвитку біотехнології в Україні, що є особливо актуальним, беручи до уваги світову пандемію Covid-19 та приведені статистичні дані щодо поширеності захворювань на ВПГ-2.

Недостатнє використання вакцинних препаратів в Україні, із соціальної точки зору, є жертвою власного успіху самої вакцинації, що призвело до відсутності здорової оцінки ситуації населенням, серйозності хвороб, тяжкості яких можна запобігти методом своєчасної імунізації. Саме тому абсолютно всі наявні програми вакцинації у світі потребують визнання цінності, економічних вкладень, розширення «Календаря обов'язкових щеплень», а також розробки вакцин нового покоління з новітніми ад'ювантами й можливим перехресним захистом задля реалізації їх потенціалу повною мірою.

Література

- Karch, C. P., & Burkhard, P. (2016). Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochemical pharmacology*, 120, 1—14. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.05.001>.
- Stanfield, B. A., Kousoulas, K. G., Fernandez, A., & Gershburg, E. (2021). Rational Design of Live-Attenuated Vaccines against Herpes Simplex Viruses. *Viruses*, 13(8), 1637. <https://doi.org/10.3390/books978-3-0365-4038-2>.
- Alareeki, A., Osman, A. M., Khandakji, M. N., Looker, K. J., ..., & Abu-Raddad, L. J. (2023). Epidemiology of herpes simplex virus type 2 in Europe: systematic review, meta-analyses, and meta-regressions. *The Lancet Regional Health-Europe*, 25. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2022.100558>.
- O'Rourke, B., Oortwijn, W., & Schuller, T. (2020). The new definition of health technology assessment: A milestone in international collaboration. *International journal of technology assessment in health care*, 36(3), 187—190. <https://doi.org/10.1017/S0266462320000215>.
- Sampath, P. G. (2021). Market Shaping and Market Access in the Global Vaccines Market: *Approaches for the Future*. German International Agency (GIZ), (1), 3—21. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3945668>.
- Gennet, É., Mahalatchimy, A., Frischhut, M., Lau, P. L., ..., & Hawrot, T. (2022). *Health as a fundamental value*. Towards an inclusive and equitable pharmaceutical strategy for the European Union (Doctoral dissertation, European Health Policy Platform of the European Commission). <https://doi.org/10.1019/ST263452320000215>.
- Shah, R. R., Hassett, K. J., & Brito, L. A. (2017). Overview of vaccine adjuvants: introduction, history, and current status. *Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols*, 1—13. <https://doi.org/10.1080/08998280.2005.11928028>.
- Mohan, T., Verma, P., & Rao, D. N. (2013). Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *The Indian journal of medical research*, 138(5), 779. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.111211>.
- Facciola, A., Visalli, G., Laganà, A., & Di Pietro, A. (2022). An overview of vaccine adjuvants: current evidence and future perspectives. *Vaccines*, 10(5), 819. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050819>.
- Вакцинація дорослих: що важливо знати під час війни. Поради щодо ефективного захисту від небезпечних хвороб. (2023). Взято з <https://www.unicef.org/ukraine/stories/vaccination-for-grown-ups-during-war>.
- Calabro, G. E., Carini, E., Tognetto, A., Giacchetta, I., ..., & De Waure, C. (2022). The value (s) of vaccination: building the scientific evidence according to a value-based healthcare approach. *Frontiers in Public Health*, 10, 786662. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.786662>.
- Смілянська, М., Волянський, А., Дідоренко, Т., & Карлова, Т. (2024). Перспективи персоналіфікованої імунопрофілактики в Україні. *Scientific Collection «InterConf»*, (200), 169—173. <https://archive.interconf.center/index.php/conference-proceeding/article/view/6203>
- Watanabe, A. H., Veettil, S. K., Le, L. M., Bald, E., ..., & Chaiyakunapruk, N. (2023). Clinical and Economic Implications of Increasing Access to Herpes Zoster Vaccination Rate in Community Pharmacies. *Journal of the American Pharmacists Association*. <https://doi.org/10.1016/j.japh.2023.05.012>.
- O'Rourke, B., Oortwijn, W., & Schuller, T. (2020). The new definition of health technology assessment: A milestone in international collaboration. *International journal of technology assessment in health care*, 36(3), 187—190. <https://doi.org/10.1017/S0266462320000215>.
- Сенюта, І., Терешко, Х. Вакцинація у запитаннях і відповідях: метод. рекомендації. Національна асоціація адвокатів України, Комітет медичного права і фармацевтичного права та біоетики. (2023). Вилучено з https://unba.org.ua/assets/uploads/77b7b540396ed691df9b_file.pdf.
- Щеплення, вакцини, профілактика інфекційних захворювань у дорослих. (2023). Вилучено з <https://zdorovopokolenie.dp.ua/uk/doroslym/vaktsynatsiia-shchepлення>.
- Beirme, P. V., Hennessy, S., Cadogan, S. L., Shiely, F., ..., & MacLeod, F. (2015). Needle size for vaccination procedures in children and adolescents. *Cochrane database of systematic reviews*, (6), 32—37. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010720.pub2>.

Ong, G. H., Lian, B. S. X., Kawasaki, T., & Kawai, T. (2021). Exploration of pattern recognition receptor agonists as candidate adjuvants. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 968. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.745016>.

Zhao, T., Cai, Y., Jiang, Y., He, X., Wei, Y., Yu, Y., & Tian, X. (2023). Vaccine adjuvants: Mechanisms and platforms. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 283. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01557-7>.

Apostolico, J. D. S., Lunardelli, V. A. S., Coirada, F. C., Boscardin, S. B., & Rosa, D. S. (2016). Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing. *Journal of immunology research*. <https://doi.org/10.1155/2016/1459394>.

Vanderslott, S., & Marks, T. (2021). Charting mandatory childhood vaccination policies worldwide. *Vaccine*, 39(30), 4054—4062. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.04.065>.

Malik, A., Gupta, M., Gupta, V., Gogoi, H., & Bhatnagar, R. (2018). Novel application of trimethyl chitosan as an adjuvant in vaccine delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 7959—7970. <https://doi.org/10.2147/IJN.S165876>.

Brito, L. A., Malyala, P., & O'Hagan, D. T. (2013). Vaccine adjuvant formulations: A pharmaceutical perspective. In *Seminars in immunology* 25(2), 130—145. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.05.007>.

Pulendran, B. (2021). S Arunachalam P, O'Hagan DT. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov*, 20(6), 454—475. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00163-y>.

Гулянич, М., Недосєков, В., & Годовський, О. (2017). Ефективність вакцини, інактивованої проти інфекційного ринотрахеїту ВРХ. *Тваринництво України*, (3—4), 36—39. <https://doi.org/10.1080/08998882.2005.11238065>.

Powell, B. S., Andrianov, A. K., & Fusco, P. C. (2015). Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. *Clinical and experimental vaccine research*, 4(1), 23—45. <https://doi.org/10.7774/cevr.2015.4.1.23>.

Ho, N. I., Huis in't Veld, L. G., Raaijmakers, T. K., & Adema, G. J. (2018). Adjuvants enhancing cross-presentation by dendritic cells: the key to more effective vaccines? *Frontiers in immunology*, 9, 2874. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02874>.

Pulendran, B. S., Arunachalam, P., & O'Hagan, D. T. (2021). Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(6), 454—475. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00163-y>.

Rivas, E., Gómez-Arnáiz, M., Ricoy, J. R., Mateos, F., ..., & Cabello, A. (2005). Macrophagic myofasciitis in childhood: a controversial entity. *Pediatric neurology*, 33(5), 350—356. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2005.05.024>.

Gherardi, R. K., Coquet, M., Cherin, P., Belec, L., ..., & Authier, F. J. (2001). Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain*, 124(9), 1821—1831. <https://doi.org/10.1093/brain/124.9.1821>.

Principi, N., & Esposito, S. (2018). Aluminum in vaccines: Does it create a safety problem? *Vaccine*, 36(39), 5825—5831. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.08.036>.

Duwe, A., & Niedzwiecki, A. (2018). Aluminum toxicity in Alzheimer's disease, breast cancer and vaccine adjuvants. *Journal of Cellular Medicine and Natural Health*, 1—8. <https://jcmnh.org/2018/07/13/aluminum-toxicity-in-alzheimers-disease-breast-cancer-and-vaccine-adjuvants/>

Badran, G., Angrand, L., Masson, J. D., Crépeaux, G., & David, M. O. (2022). Physico-chemical properties of aluminum adjuvants in vaccines: Implications for toxicological evaluation. *Vaccine*, 40(33), 4881—4888. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.06.064>.

De Gregorio, E., & Rappuoli, R. (2014). From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 505—514. <https://doi.org/10.1038/nri3694>.

Ong, G. H., Lian, B. S. X., Kawasaki, T., & Kawai, T. (2021). Exploration of pattern recognition receptor agonists as candidate adjuvants. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 745016. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.745016>.

Hennessy, C., & McKernan, D. P. (2021). Anti-viral pattern recognition receptors as therapeutic targets. *Cells*, 10(9), 2258. <https://doi.org/10.3390/cells10092258>.

- Mu, R., Dong, L., & Wang, C. (2023). Carbohydrates as putative pattern recognition receptor agonists in vaccine development. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2023.08.006>.
- Hao, L., Wu, Y., Zhang, Y., Zhou, Z., Lei, Q., Ullah, N., ..., & Fan, X. (2020). Combinational PRR agonists in liposomal adjuvant enhances immunogenicity and protective efficacy in a tuberculosis subunit vaccine. *Frontiers in immunology*, 11, 575504. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575504>.
- Mekonnen, D., Mengist, H. M., & Jin, T. (2022). SARS-CoV-2 subunit vaccine adjuvants and their signaling pathways. *Expert Review of Vaccines*, 21(1), 69—81. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1991794>.
- Kwissa, M., Nakaya, H. I., Oluoch, H., & Pulendran, B. (2012). Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates. *Blood. The Journal of the American Society of Hematology*, 119(9), 2044—2055. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-388579>.
- Harandi, A. M. (2018). Systems analysis of human vaccine adjuvants. In *Seminars in immunology*, 39, 30—34. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.08.001>.
- Cid, R., & Bolívar, J. (2021). Platforms for production of protein-based vaccines: From classical to next-generation strategies. *Biomolecules*, 11(8), 1072. <https://doi.org/10.3390/biom11081072>.
- Malik, A., Gupta, M., Gupta, V., Gogoi, H., & Bhatnagar, R. (2018). Novel application of trimethyl chitosan as an adjuvant in vaccine delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 7959—7970. <https://doi.org/10.2147/IJN.S165876>.
- Beime, P. V., Hennessy, S., Cadogan, S. L., Shiely, F., ..., & MacLeod, F. (2015). Needle size for vaccination procedures in children and adolescents. *Cochrane database of systematic reviews*, (6), 32—37. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010720.pub2>.
- Tadepalli, G., Konduru, B., Murali, H. S., & Batra, H. V. (2017). Intraperitoneal administration of a novel chimeric immunogen (rOP) elicits IFN- γ and IL-12p70 protective immune response in BALB/c mice against virulent Brucella. *Immunology Letters*, 192, 79—87. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.10.013>.
- Galson, J. D., Trück, J., ..., & Kelly, D. F. Van der Most. (2016). Investigating the effect of AS03 adjuvant on the plasma cell repertoire following pH1N1 influenza vaccination. *Sci Rep*, 6, 37229. <https://doi.org/10.1038/srep37229>.
- Yang, J., Zhang, J., Han, T., Liu, C., ..., & Yang, X. (2020). Effectiveness, immunogenicity, and safety of influenza vaccines with MF59 adjuvant in healthy people of different age groups: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 99(7). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001905>.
- Clark, T. W., Pareek, M., Hoschler, K., Dillon, H., ..., & Stephenson, I. (2009). Trial of 2009 influenza A (H1N1) monovalent MF59-adjuvanted vaccine. *New England Journal of Medicine*, 361(25), 2424—2435. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907650>.
- Desbien, A. L., Reed, S. J., Bailor, H. R., Cauwelaert, N. D., ..., & Duthie, M. S. (2015). Squalene emulsion potentiates the adjuvant activity of the TLR4 agonist, GLA, via inflammatory caspases, IL-18, and IFN- γ . *European journal of immunology*, 45(2), 407—417. <https://doi.org/10.1002/eji.201444543>.
- Coler, R. N., Day, T. A., Ellis, R., Piazza, F. M., ..., & TBVPX-113 Study Team. (2018). The TLR-4 agonist adjuvant, GLA-SE, improves magnitude and quality of immune responses elicited by the ID93 tuberculosis vaccine: first-in-human trial. *npj Vaccines*, 3(1), 34. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0057-5>.
- Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., ..., & Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in immunology*, 30(1), 23—32. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.09.006>.
- Wimmers, F., Donato, M., Kuo, A., Ashuach, T., ..., & Pulendran, B. (2021). The single-cell epigenomic and transcriptional landscape of immunity to influenza vaccination. *Cell*, 184(15), 3915—3935. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.039>.
- Arunachalam, P. S., Charles, T. P., Joag, V., Bollimpelli, V. S., ..., & Pulendran, B. (2020). T cell-inducing vaccine durably prevents mucosal SHIV infection even with lower neutralizing antibody titers. *Nature medicine*, 26(6), 932—940. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0858-8>.
- Liang, F., Lindgren, G., Sandgren, K. J., Thompson, E. A., ..., & Loré, K. (2017). Vaccine priming is restricted to draining lymph nodes and controlled by adjuvant-mediated antigen uptake. *Science translational medicine*, 9(393), eaal2094. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal2094>.

- Kasturi, S. P., Rasheed, M. A. U., Havenar-Daughton, C., Pham, M., ..., & Pulendran, B. (2020). 3M-052, a synthetic TLR-7/8 agonist, induces durable HIV-1 envelope-specific plasma cells and humoral immunity in nonhuman primates. *Science immunology*, 5(48), eabb1025. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abb1025>.
- Burny, W., Callegaro, A., Bechtold, V., Clement, F., ..., & ECR-002 Study Group. (2017). Different adjuvants induce common innate pathways that are associated with enhanced adaptive responses against a model antigen in humans. *Frontiers in immunology*, 8, 943. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00943>.
- Moni, S. S., Abdelwahab, S. I., Jabeen, A., Elmobark, M. E., Aqaili, D., Ghoal, G., ..., & Mohammad Alowayni, A. M. H. (2023). Advancements in Vaccine Adjuvants: The Journey from Alum to Nano Formulations. *Vaccines*, 11(11), 1704. <https://doi.org/10.3390/vaccines11111704>.
- Vono, M., Taccone, M., Caccin, P., Gallotta, M., ..., & Seubert, A. (2013). The adjuvant MF59 induces ATP release from muscle that potentiates response to vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52), 21095—21100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319784110>.
- wen, A. M., Fults, J. B., Patil, N. K., Hernandez, A., & Bohannon, J. K. (2021). TLR agonists as mediators of trained immunity: mechanistic insight and immunotherapeutic potential to combat infection. *Frontiers in Immunology*, 11, 622614. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.622614>.
- Lee, A., Scott, M. K., Wimmers, F., Arunachalam, P. S., ..., & Pulendran, B. (2022). A molecular atlas of innate immunity to adjuvanted and live attenuated vaccines, in mice. *Nature communications*, 13(1), 549. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28197-9>.
- Parmaksız, S., Pekcan, M., Özkul, A., Türkmen, E., ..., & Şenel, S. (2023). In vivo evaluation of new adjuvant systems based on combination of Salmonella Typhi porins with particulate systems: Liposomes versus polymeric particles. *International Journal of Pharmaceutics*, 648, 123568. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123568>.
- Lee, D. H., Kim, S. H., Kang, W., Choi, Y. S., ..., & Shin, E. C. (2011). Adjuvant effect of bacterial outer membrane vesicles with penta-acylated lipopolysaccharide on antigen-specific T cell priming. *Vaccine*, 29(46), 8293—8301. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.102>.
- Taleghani, N., Bozorg, A., Azimi, A., & Zamani, H. (2019). Immunogenicity of HPV and HBV vaccines: adjuvanticity of synthetic analogs of monophosphoryl lipid A combined with aluminum hydroxide. *Apmis*, 127(3), 150—157. <https://doi.org/10.1111/apm.12927>.
- Hajam, I. A., Dar, P. A., Shah Nawaz, I., Jaume, J. C., & Lee, J. H. (2017). Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. *Experimental & molecular medicine*, 49(9), e373-e373. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.172>.
- Murthy, K. G., Deb, A., Goonesekera, S., Szabó, C., & Salzman, A. L. (2004). Identification of conserved domains in Salmonella muenchen flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5667—5675. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307759200>.
- Bates, J. T., Uematsu, S., Akira, S., & Mizel, S. B. (2009). Direct stimulation of *tlr5*^{+/+} CD11c⁺ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7539—7547. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804225>.
- Huleatt, J. W., Nakaar, V., Desai, P., Huang, Y., ..., & Powell, T. J. (2008). Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*, 26(2), 201—214. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.062>.
- Song, L., Zhang, Y., Yun, N. E., Poussard, A. L., ..., & Paessler, S. (2009). Superior efficacy of a recombinant flagellin: H5N1 HA globular head vaccine is determined by the placement of the globular head within flagellin. *Vaccine*, 27(42), 5875—5884. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.060>.
- Delaney, K. N., Phipps, J. P., Johnson, J. B., & Mizel, S. B. (2010). A recombinant flagellin-pox-virus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice. *Viral immunology*, 23(2), 201—210. <https://doi.org/10.1089/vim.2009.0107>.
- Lin, K. H., Chang, L. S., Tian, C. Y., Yeh, Y. C., ..., & Leng, C. H. (2016). Carboxyl-terminal fusion of E7 into Flagellin shifts TLR5 activation to NLRC4/NAIP5 activation and induces TLR5-independent anti-tumor immunity. *Scientific reports*, 6(1), 24199. <https://doi.org/10.1038/srep24199>.

Treanor, J. J., Taylor, D. N., Tussey, L., Hay, C., ..., & Shaw, A. (2010). Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125) in healthy young adults. *Vaccine*, 28(52), 8268—8274. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.009>.

Daleke-Schermerhorn, M. H., Felix, T., Soprova, Z., ten Hagen-Jongman, C. M., ..., & Luirink, J. (2014). Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach. *Applied and environmental microbiology*, 80(18), 5854—5865. <https://doi.org/10.1128/AEM.01941-14>.

Zingl, F. G., Leitner, D. R., & Schild, S. (2020). Biogenesis of Gram-Negative OMVs. *Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions and applications*, 23—46.

Krishnan, N., Kubiawicz, L. J., Holay, M., Zhou, J., ..., & Zhang, L. (2022). Bacterial membrane vesicles for vaccine applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 185, 114294. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114294>.

Vader, P., Mol, E. A., Pasterkamp, G., ..., & Schifflers, R. M. (2016). Extracellular vesicles for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 106, 148—156. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.02.006>.

Elsharkasy, O. M., Nordin, J. Z., Hagey, D. W., de Jong, O. G., ..., & Vader, P. (2020). Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how?. *Advanced drug delivery reviews*, 159, 332—343. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.04.004>.

Buschmann, D., Mussack, V., ..., & Byrd, J. B. (2021). Separation, characterization, and standardization of extracellular vesicles for drug delivery applications. *Advanced drug delivery reviews*, 174, 348-368. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.027>.

Mehanny, M., Lehr, C. M., & Fuhrmann, G. (2021). Extracellular vesicles as antigen carriers for novel vaccination avenues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 173, 164—180. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.03.016>.

Masforrol, Y., Gil, J., García, D., Noda, J., ..., & González, L. J. (2017). A deeper mining on the protein composition of VA-MENGOC-BC®: An OMV-based vaccine against N. meningitidis serogroup B and C. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(11), 2548—2560. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1356961>.

Martíñón, S., Cisneros, A., Villicaña, S., Hernández-Miramontes, R., ..., & Calderón-Vargas, P. (2019). Chemical and immunological characteristics of aluminum-based, oil-water emulsion, and bacterial-origin adjuvants. *Journal of immunology research*, 1—9. <https://doi.org/10.1155/2019/3974127>.

Daleke-Schermerhorn, M. H., Felix, T., Soprova, Z., ten Hagen-Jongman, ..., & Luirink, J. (2014). Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach. *Applied and environmental microbiology*, 80(18), 5854-5865. <https://doi.org/10.1128/AEM.01941-14>.

Afrough, P., Karam, M. R. A., Vaziri, F., Behrouzi, A., & Siadat, S. D. (2020). Construction and assessment of the immunogenicity and bactericidal activity of fusion protein porin A from Neisseria meningitidis serogroups A and B admixed with OMV adjuvant as a novel vaccine candidate. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(6), 737. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.40470.9>.

Gan, Y., Li, C., Peng, X., Wu, S., ..., & Ding, X. (2021). Fight bacteria with bacteria: Bacterial membrane vesicles as vaccines and delivery nanocarriers against bacterial infections. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 35, 102398. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102398>.

Acevedo, R., Fernández, S., Zayas, C., Acosta, A., ..., & Perez, J. L. (2014). Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Frontiers in immunology*, 5, 121. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00121>.

Semchenko, E. A., Tan, A., Borrow, R., & Seib, K. L. (2019). The serogroup B meningococcal vaccine Bexsero elicits antibodies to Neisseria gonorrhoeae. *Clinical Infectious Diseases*, 69(7), 1101—1111. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1061>.

Petousis-Harris, H., & Radcliff, F. J. (2019). Exploitation of Neisseria meningitidis group B OMV vaccines against N. gonorrhoeae to inform the development and deployment of effective gonorrhea vaccines. *Frontiers in immunology*, 10, 683. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00683>.

Gnopo, Y. M., Watkins, H. C., Stevenson, T. C., DeLisa, M. P., ..., & Putnam, D. (2017). Designer outer membrane vesicles as immunomodulatory systems-Reprogramming bacteria for vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114, 132—142. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.003>.

Facchini, F. A., Minotti, A., Luraghi, A., Romerio, A., ..., & Peri, F. (2021). Synthetic glycolipids as molecular vaccine adjuvants: mechanism of action in human cells and in vivo activity. *Journal of medicinal chemistry*, 64(16), 12261—12272. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00896>.

Kim, E. H., Woodruff, M. C., Grigoryan, L., Maier, B., ..., & Pulendran, B. (2020). Squalene emulsion-based vaccine adjuvants stimulate CD8 T cell, but not antibody responses, through a RIPK3-dependent pathway. *Elife*, 9, e52687. <https://doi.org/10.7554/eLife.52687>.

Mohan, T., Verma, P., & Rao, D. N. (2013). Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *The Indian journal of medical research*, 138(5), 779.