

Perspektive u razvoju profilaktičkih vakcina

Nevena Arsenović Ranin

Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za mikrobiologiju i imunologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

Autor za korespondenciju, e-mail: nevena.arsenovic-ranin@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Vakcine se smatraju jednim od najvećih javnozdravstvenih dostignuća prošlog veka. Zahvaljujući vakcinaciji u svetu su potpuno iskorenjene velike boginje, a incidencija drugih infektivnih bolesti, kao što su dečija paraliza, male boginje, tetanus i difterija, drastično je smanjena. Današnje licencirane vakcine, koje pretežno sadrže žive atenuisane ili mrtve patogene ili njihove delove, su uspešne zahvaljujući tome što stimulišu produkciju neutrališućih antitela. Sa druge strane, ove vakcine mnogo teže indukuju ćelijski-posredovanu imunost, koja je važna za eliminaciju intraćelijskih patogena (koji često dovode do hroničnih infekcija). Trenutno se u prekliničkim i kliničkim studijama ispituju brojne profilaktičke vakcine zasnovane na vektorima i nukleinskim kiselinama (DNK i iRNK), sposobne da indukuju snažan odgovor T-ćelija na vakcinalni antigen, sa obećavajućim rezultatima. U ovom radu su date osnovne informacije o vakcinama sa vektorima i nukleinskim kiselinama, opisani su mehanizmi kojima one pokreću imunski odgovor, njihove dobre i loše strane, kao i problemi vezani za njihovu bezbednu primenu.

Ključne reči: tipovi vakcina, vektorske vakcine, DNK vakcine, iRNK vakcine

Uvod

Vakcinacija predstavlja najefikasniji metod zaštite od infektivnih bolesti i smatra se jednim od najvećih dostignuća imunologije, u medicini. Zahvaljujući vakcinaciji u svetu su potpuno iskorenjene velike boginje, a incidencija drugih infektivnih bolesti, kao što su dečija paraliza, male boginje, tetanus, rubela, hepatitis i druge, drastično je smanjena, čime su spašeni životi miliona ljudi (1, 2). Zbog toga se vakcinacija smatra najekonomičnijom i najuspešnijom merom za poboljšanje i unapređenje javnog zdravlja (1, 2).

Iako su danas dostupne vakcine za prevenciju više od trideset infektivnih bolesti (1), perzistentne (hronične ili latentne) infekcije, infekcije izazvane patogenima sa kompleksnim životnim ciklusom, kao i one koje izazivaju antigenski varijabilni i/ili novi patogeni, i dalje predstavljaju izazov (3). Među njima, infekcije izazvane virusom HIV, bakterijom *Mycobacterium tuberculosis* i protozoama iz roda *Plasmodium* koje godišnje dovode do smrti četiri miliona ljudi u svetu (4), imaju najveći prioritet. Nedavno je Evropska agencija za lekove (engl. European Medicines Agency, EMA) dala pozitivno mišljenje o prvoj vakcini protiv malarije (RTS, S), mada je njena efikasnost svega oko 30% (5). Postojeća vakcina Bacillus Calmette-Guérin (BCG) protiv *Mycobacterium tuberculosis* obezbeđuje zaštitu od diseminovanih oblika tuberkuloze kod male dece, ali pruža nepotpunu i varijabilnu zaštitu od plućne tuberkuloze, pogotovo kod odraslih (6). Takođe, neke od vakcina (npr. vakcina protiv gripa ili malih boginja) nisu dovoljno efikasne u svim populacijama. Odojčad i starije osobe, kao i imunokompromitovani, generalno slabije odgovaraju na vakcinaciju (3). Da bi odgovorili ovim izazovima, istraživači rade na razvoju novih i poboljšanju postojećih vakcina. Ovo zahteva bolje poznavanje patogeneze i epidemiologije bolesti, kao i relativnog značaja pojedinih tipova imuniteta (urođeni, humoralni, ćelijski, mukozni, sistemski) u odbrani od patogena. Takođe, potrebni su novi pristupi u formulaciji vakcinalnih antigena, koji bi očuvali ili povećali njihovu imunogenost i stabilnost, i omogućili stvaranje protektivnog imunskog odgovora (7).

Značajna dostignuća u proteklom periodu u imunologiji, molekularnoj biologiji, genomici, proteomici, biohemiji i bioinformatiči, pokrenula su napredak u oblasti dizajna i proizvodnje vakcina. Novi pristupi u razvoju vakcina se zasnivaju na unošenju gena od interesa i njegovoj ekspresiji u ćelijama domaćina. Ovi pristupi pružaju mnogo bolje mogućnosti za kontrolu indukcije i održavanja specifičnog imunskog odgovora, koji je najpogodniji za uspešnu odbranu protiv pojedinih patogena. Geni koji kodiraju antigene mogu se uneti u organizam domaćina u obliku DNK (8), informacione (i)RNK (9), ili modifikovanih bakterijskih ili virusnih vektora (10). Očekivanja od ovih vakcina kada je u pitanju prevencija i kontrola infektivnih bolesti je velika, pa se stoga one nalaze u fokusu ovog rada.

Vakcinacija

Vakcine su biološki preparati koji sadrže atenuisane ili mrtve mikroorganizme ili antigene koji potiču od njih, a koji se primenjuju u cilju prevencije infektivnih bolesti. Vakcine stimulišu imunski sistem dovodeći do imunskog odgovora i stvaranja imunske memorije kroz indukciju dugoživećih plazma ćelija i memorijskih T- i B- ćelija na sličan način kao prirodna infekcija, ali ne izlažu primaoca oboljenju i njegovim mogućim komplikacijama. Kada vakcinisana osoba kasnije bude izložena patogenu koji je prisutan u okruženju, cirkulišuća antitela koja se proizvode od strane dugoživećih plazma ćelija obezbeđuju neposrednu zaštitu od patogena, dok memorijske ćelije uspostavljaju sekundarni imunski odgovor koji je brži, snažniji i efikasniji u eliminaciji patogena, što može da spreči uspostavljanje infekcije i razvoj bolesti (11).

Imunitet protiv patogena (ili vakcine) rezultat je integrisane aktivnosti urođenog i adaptivnog imunskog sistema (12). Urođena imunost se aktivira nakon prepoznavanja molekularnih obrazaca patogena (strukture zajedničke za mikroorganizme istog tipa, otuda naziv obrasci, koje ispoljavaju mikroorganizmi, a ne ispoljavaju ćelije domaćina; engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) od strane receptora za prepoznavanje obrazaca (engl. pattern recognition receptors, PRRs) na površini ili u različitim subodeljcima ćelija urođene imunosti (fagociti, dendritske ćelije) u kojima mikroorganizam može da se nađe (13). Aktivacija profesionalnih antigen-prezentujućih ćelija (APĆ), kao što su dendritske ćelije, koje u sklopu molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. major histocompatibility complex, MHC) prezentuju peptidne fragmente antigena T limfocitima, ključna je za pokretanje adaptivnog imunskog odgovora koji dovodi do generisanja efektorskih T ćelija i visoko afinitetnih antitela koji uspešno eliminišu patogen. Imunska memorija koja nastaje tokom ovog antigen-specifičnog imunskog odgovora perzistira i obezbeđuje bržu reakciju u odgovoru na ponovne infekcije istim patogenom (11, 14).

Prečišćeni proteinski antigeni, npr. oni koji se koriste u vakcinama, ne mogu da izazovu odgovor T-ćelija ako se ne daju zajedno sa adjuvansima, supstancama koje aktiviraju APĆ, posebno dendritske ćelije (11). Adjuvansi su uglavnom produkti mikroorganizma ili supstance koje ih imitiraju i one se vezuju za receptore za prepoznavanje obrazaca, npr. za receptore slične Tollu (engl. Toll-like receptors, TLR). Na taj način imunski sistem može da odgovori i na prečišćene proteinske antigene u vakcinama kao da su delovi infektivnih mikroorganizama (15).

Tipovi vakcina

U zavisnosti od tipa antigena, odnosno od tehnologije dobijanja antigena koje sadrže, vakcine se dele na žive (atenuisane), mrtve (inaktivisane), subjedinične-toksoidne, proteinske, polisaharidne, i konjugovane (1, 16).

Žive, atenuisane vakcine sadrže cele, žive mikroorganizme koji su specifičnim procesima kultivacije izgubili virulentnost tj. sposobnost izazivanja bolesti (17). Živi atenuisani mikroorganizmi mogu da se razmnožavaju u organizmu domaćina i pokreću imunski odgovor koji je praktično identičan onom do kojeg dovodi prirodna infekcija (18). Stoga su ove vakcine veoma efikasne, podstiču dugotrajan, često doživotan imunitet. Neke od ovih vakcina se mogu unesti u organizam tako da imitiraju prirodni put infekcije (npr. Sejbinova vakcina protiv poliomijelitisa se aplikuje oralno), što dovodi do stimulacije lokalnog imunskog odgovora. Ipak, primena živih vakcina nije pogodna za imunosuprimirane pacijente i trudnice kod kojih i nizak nivo virulencije može predstavljati problem. Osim toga, iako je to retko, postoji opasnost da atenuisani soj povрати virulenciju (19).

Inaktivisane vakcine sadrže hemijskim (npr. formaldehid, beta-propiolakton, fenol) ili fizičkim agensima (zagrevanje, UV zraci) inaktivisane cele mikroorganizme (15). Inaktivisani (mrtvi) mikroorganizmi nemaju sposobnost replikacije, pa je imunski odgovor znatno slabiji i traje kraće u odnosu na žive vakcine. Zbog toga je neophodno davanje više doza i dodavanje adjuvanasa (20, 21). Ove vakcine ne stimulišu lokalni imunski odgovor jer se primenjuju isključivo putem injekcija. Inaktivisane vakcine su bezbednije u odnosu na žive vakcine jer povratak virulencije nije moguć. Manje su osetljive na uslove skladištenja i čuvanja od živih vakcina (15, 16).

Subjedinične vakcine sadrže produkte ili delove mikroorganizama koji imaju antigenska svojstva (16). One se dalje mogu podeliti na vakcine koje sadrže proteinsku komponentu (modifikovane toksine-toksoide bakterija ili strukturni protein mikroorganizama) ili polisaharid. Dobijaju se na dva načina, klasičnim putem, prečišćavanjem mikroorganizama ili kada su u pitanju proteinske subjedinične vakcine, i savremenim metodama, korišćenjem genetičkog inženjeringa, tj. rekombinantne (r)DNK tehnologije (21). Rekombinantne vakcine su vakcina protiv hepatitisa B (22) i vakcina protiv humanih papiloma virusa (23). Kod rDNK tehnologije se gen koji kodira željeni protein (vakcinalni antigen) ugrađuje u vektor za kloniranje (plazmid), i tako nastala rekombinantna DNK se unosi u odgovarajuće ćelije (često su to bakterije *E. coli*, ili kvasnice), koje se kultivisu na hranjivim podlogama, čime se obezbeđuje sinteza velikih količina proteina od interesa (proteina za vakcinu). Protein od interesa se zatim izoluje i prečišćava, kombinuje sa adjuvansom i drugim ekscipijensima, i inkorporira u vakcinu. Polisaharidne subjedinične vakcine sadrže samo polisaharide (obično iz kapsule bakterija, npr. vakcine koje sprečavaju bolesti izazvane inkapsuliranim patogenima: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis*). Polisaharidi su slabo imunogeni, pa su stoga napravljene **konjugovane vakcine**, kod kojih je polisaharid jednog patogena vezan za proteinski nosač koji je imunogen, najčešće difterijski ili tetanusni toksoid ili neki površinski protein bakterija (21, 24). Pošto ne sadrže sve delove mikroorganizma, subjedinične vakcine imaju manje

neželjenih efekata od celočelijskih. Međutim, mora im se dodati adjuvans i daju se u više doza da bi kod primaoca indukovale dobar zaštitni imunitet (15, 21). Subjedinčne vakcine su veoma efikasne, ali su i skuplje od celočelijskih, pogotovo ako je vakcina dobijena rDNK tehnologijom.

Skoro sve danas licencirane vakcine pripadaju prethodno opisanim tipovima vakcina. Ove vakcine su se pokazale veoma uspešnim u prevenciji mnogih infektivnih bolesti. Svoj uspeh duguju činjenici da su usmerene na patogene koji imaju nisku antigensku varijabilnost i za koje zaštita zavisi od imunosti posredstvom antitela. To se, između ostalih, odnosi na izazivače poliomijelitisa, tetanusa, difterije, morbila, rubele, hepatitisa B (25, 26). Posledično, vakcine koje stimulišu produkciju neutrališućih ili opsonizujućih antitela protiv ovih patogena ili njihovih produkata, pokazale su se kao izuzetno uspešne. Međutim, ako patogen pokazuje visok stepen genetskih (antigenskih) varijacija, kao što je npr. virus influence i HIV, cirkulišuća antitela generisana u odgovoru na vakcinu (kao i na infekciju) neće prepoznavati patogen pri narednim infekcijama.

S druge strane, aktuelne vakcine slabo stimulišu citotoksični odgovor CD8+T limfocita, koji je važan za eliminaciju intracelularnih mikroorganizama, koji u većini slučajeva dovode do perzistentnih, hroničnih (npr. HIV) i latentnih infekcija (npr. *Mycobacterium tuberculosis*, herpes virusi, citomegalovirus) (25, 26). Žive atenuisane vakcine, koje imaju sposobnost da stimulišu ovaj tip odgovora, nose potencijalni rizik od ispoljavanja virulencije patogena kod osetljivih primaoca, kao i mogućnost reverzije atenuacije. Iako mali, rizik od ovih događaja se ne može zanemariti.

Prema tome, jedan od glavnih izazova u razvoju novih strategija imunizacije je dizajniranje vakcina koje će stimulisati odgovarajući tip imunskog odgovora koji može da obezbedi imunitet uglavnom na intraćelijske patogene, naročito na one koji dovode do razvoja hroničnih, često doživotnih infekcija. Poznavanje biologije visoko konzerviranih antigena koji su uključeni u patogenezu bolesti, kao i imunskih mehanizama koje treba stimulisati da bi se indukovala zaštita, je neophodno za racionalno osmišljavanje vakcinalnih strategija kojima bi se mogao obezbediti bolji protektivni imunitet u odnosu na onaj koji se prirodno indukuje (27).

Poslednjih godina ulažu se veliki naponi da bi se identifikovali protektivni antigeni. Novije tehnologije, kao što je **reverzna vakcinologija** koja se bazira na bioinformatičkoj analizi genomske sekvence, može biti ključna za selekciju potencijalnih vakcinalnih antigena (28). Reverzna vakcinologija uključuje sekvenciranje celog genoma patogena i kompjutersko skeniranje gena koji mogu biti iskorišćeni u proizvodnji vakcine, kao što su oni koji kodiraju površinske proteine patogena, mada je pokazano da antigenski konzervirani proteini, kao i citoplazmatski proteini, mogu biti imunogeni. Zatim se kompjuterski odabrani proteini kloniraju i eksprimiraju u *E.coli*, prečišćavaju, i ako se pokažu imunogeni u eksperimentalnim modelima, dalje testiraju u

kliničkim studijama. Reverzna vakcinologija je omogućila identifikaciju kompletnog antigenskog repertoara patogena, pa i onih koje je teško ili za sada nemoguće kultivirati. Pored toga, ovaj pristup može pomoći u otkrivanju antigena koji se ne ispoljavaju velikoj količini, ne mogu da se eksprimiraju *in vitro*, ili su manje imunogeni u toku infekcije, pa se ne otkrivaju konvencionalnim pristupom (29). Vakcina protiv meningokoka serogrupe B je prva vakcina napravljena pomoću reverzne vakcinologije (30). I na kraju, mada ne i manje značajno, ovaj pristup značajno skraćuje vreme pronalazjenja vakcinalnog antigena, a samim tim i vreme pojave novih vakcina. Za razvoj konvencionalnih vakcina, do ulaska u kliničku fazu ispitivanja potrebno je približno 20 godina, dok se primenom reverzne vakcinologije ovaj period skraćuje na približno 5 godina (29).

Nove generacije vakcina

Razvoj molekularne biologije i genetičkog inženjeringa omogućio je dobijanje novih, savremenih vakcina, vektorskih i DNK/iRNK vakcina (16). One su dizajnirane tako da se protektivni imunski odgovor indukuje unošenjem iRNK ili gena mikroorganizma koji kodira sintezu antigena značajnih za stimulaciju imunskog odgovora (16).

Vektorske vakcine

Vektorske vakcine sadrže atenuisani virus ili bakteriju koja služi kao vektor (nosač, isporučilac) za DNK sekvencu (gen) patogena. Gen patogena koji kodira protein odgovoran za pokretanje imunskog odgovora, ugrađuje se u genom atenuisanog virusa ili bakterije tehnikom rDNK, pa se ove vakcine nazivaju i **rekombinantne vektorske vakcine ili hibridne vakcine** (31). Kada vektor uđe u ćelije domaćina, insertovani (vakcinalni) gen se u ćelijama domaćina prepisuje i prevodi u antigen kao intrinzična vektorska komponenta.

Mehanizam delovanja vektorskih vakcina

U toku poslednje tri decenije različite bakterije (*Mycobacterium bovis* BCG, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. i *Shigella* spp.) i virusi (adenovirusi, parvovirusi, paramiksovirusi, poksvirusi) su ispitivani kao vakcinalni vektori. U eksperimentalnim modelima, invazivne intracelularne bakterije, kao što su *Salmonella typhimurium* i *Listeria monocytogenes*, su se pokazale kao najbolji nosači vakcinalnih DNK (32). U kliničkim studijama prevashodno se koriste virusni vektori, pa su oni u fokusu ovog rada. Virusni vektori mogu da se koriste za zaštitu od različitih infektivnih bolesti, npr. protiv onih koji su izazvani protozoama (malaria) (33), mikobakterijama (tuberkuloza) (34, 35) ili virusima (HIV, Denga virus) (36, 37). Od virusnih vektora najčešće se primenjuju adenovirusni vektori, za koje je pokazano da indukuju izuzetno snažan CD8⁺ T ćelijski odgovor kao i produkciju antitela (38). Efikasnost ovih vektora

u zaštiti od različitih patogena (npr. HCV, HIV, *Plasmodium* spp, Ebola virusa) pokazana je u brojnim pretkliničkim i kliničkim studijama (39).

Virusni vektori mogu da budu živi, a ne moraju da imaju sposobnost replikacije. Živi vektori su biološki aktivni i produkuju virusno potomstvo u vakcinisanom domaćinu, ali im je virulencija atenuisana zbog mutacija u vektoru, himerne prirode same vakcine, korišćenja vektora u heterologom domaćinu, ili usled kombinacije ovih faktora (40). Vektori, međutim, mogu da budu tako snažno atenuisani da ne podležu kompletnom ciklusu replikacije u inficiranim ćelijama (40). Kada se himerna virusna vektorska vakcina unese u organizam, nije ni neophodno da se genom vektorskog virusa umnožava, već samo da se promoviše ekspresija insertovanog gena, čiji produkt (antigen) će pokrenuti imunski odgovor. Vektori koji su izgubili sposobnost deobe su mnogo više testirani u kliničkim studijama, delom i zbog njihove veće bezbednosti (41).

Karakteristike virusnih vektora, kao što je njihov ćelijski tropizam, sposobnost prenošenja heterolognog gena, količina ekspresije heterolognih gena, sposobnost izazivanja različitih tipova imunskih odgovora i perzistencija kod domaćina, neki su od faktora koji utiču na izbor određenog virusnog vektora za njegovu specifičnu primenu. Virusni su razvili visoko efikasne mehanizme za ulazak u ćeliju i korišćenje njene biosintetske mašinerije za ekspresiju virusnih proteina (42). Ovo svojstvo učinilo ih je veoma privlačnim za transportere gena od interesa u ćeliju. Virusni vektori izazivaju u ciljnim ćelijama stimuluse koji oponašaju prirodnu infekciju, i stimulišu produkciju antitela, ali što je još važnije aktiviraju odgovor CD8⁺ T-ćelija koji je važan za eliminaciju intracelularnih patogena (42, 43).

Putevi primene vektorskih vakcina

Putevi primene virusnih vektora mogu da budu različiti. U brojnim kliničkim studijama, ispitivana je intramuskularna, intradermalna (44, 45), intranazalna (46) i oralna vakcinacija (47) različitim virusnim vektorima. Izbor načina imunizacije, pored sposobnosti datog virusa da inficira određena tkiva, zavisi i od toga koji tip imunskog odgovora želimo da postignemo. Ako je za protektivni odgovor potreban mukozni odgovor, oralna ili nazalna primena vakcinalnih vektora ima prednost u odnosu na parenteralnu primenu.

Dobre i loše strane vektorskih vakcina

S obzirom na veliki broj dostupnih različitih virusnih vektora i veliko stečeno znanje o mogućnostima manipulacije ovim vektorima, virusni vektori predstavljaju dragocenu i vrlo svestranu platformu za razvoj novih vakcina. U virusne genome može se ugraditi bilo koji gen koji kodira ekspresiju željenog antigena, što omogućava razvoj velikog broja vakcina. Upotrebom vektora, imunski odgovor se može usmeriti na određeni protein ili čak epitop, koji je antigenski konzerviran između različitih sojeva patogena, što ih čini korisnim za stvaranje univerzalnih heterosubtipskih vakcina (npr.

za grip) (48). U jedan virusni genom mogu se ugraditi i geni različitih patogena, što bi obezbedilo nastanak polivalentnih vakcina (49). Virusni vektori indukuju snažan imunski odgovor, pa nema potrebe za korišćenjem adjuvanasa (50).

Međutim, virusni vektori mogu imati nekoliko slabosti. Pre svega, atenuisani virusi mogu steći virulenciju *in vivo*, što čini vektorske vakcine manje bezbednim. Takođe, virusni vektori mogu da se rekombinuju sa endogenim virusima i steknu njihovu virulenciju (51). Već postojeći imunitet protiv virusa koji najčešće inficiraju ljude može biti glavni problem, jer prethodno nastala anti-vektorska antitela mogu da se vežu za vektor i onemoguće mu ulazak u ćeliju. Sličan problem postoji i ako se pokaže potreba za dodatnim (buster) imunizacijama (51). Neka od mogućih rešenja su korišćenje različitih serotipova virusnih vektora i bolji dizajn „prime-boost” pristupa (51).

U pogledu proizvodnje vakcina, svaki virusni sistem zahteva različite ćelijske sisteme za propagaciju, što zahteva različite proizvodne pogone za svaku platformu virusnog vektora. Kako tokom proizvodnje može doći do rekombinacije, mora se voditi računa da ne dođe do kontaminacije ćelijskih kultura nekim virusom koji bi mogao da dovede do pojave rekombinovanog i neokarakterisanog patogena (40). Budući da je proizvodnja virusnih vektorskih vakcina složen proces koji često zahteva mnoštvo komponenti humanog ili životinjskog porekla, poput ćelijskih linija, svinjskog tripsina ili goveđeg seruma, potreba za isključivanjem kontaminanata zahteva opsežno testiranje tokom različitih koraka proizvodnog procesa. Kontaminacija rotavirusne vakcine svinjskim cirkovirusima, ukazuje na realnost ovog rizika (52). Zbog svega navedenog, proizvodnja vakcina zasnovanih na korišćenju virusnih vektora je kompleksna i relativno skupa.

Do 2019. godine su samo dve virusne vektorske vakcine odobrene za primenu kod ljudi, Imojev[®], protiv japanskog encefalitisa i Dengvaxia[®] protiv denga groznice (40). U obe vakcine se kao vektor koristi virus žute groznice, generički poznat kao ChimeriVax, u kojem su geni za strukturne proteine M i E viriona žute groznice zamenjeni homolognim genima za virus japanskog encefalitisa (Imojev[®]), odnosno Denga virusa (Dengvaxia[®]). Brojne druge vakcine, u kojima se koristi širok spektar vektora, i koje su usmerene na različite patogene, nalaze se u različitim fazama istraživanja i razvoja. Iako je trenutno broj virusnih vektorskih vakcina koji je odobren za primenu kod ljudi veoma mali, raznovrsne vektorske vakcine su licencirane za primenu u veterinarskoj praksi (53), što obećava i pruža nadu za širu primenu ovih vakcina u budućnosti kod ljudi.

DNK vakcine

DNK vakcine su plazmidi bakterijskog porekla koji su tehnikama genetičkog inženjeringa tako modifikovani da kodiraju ekspresiju antigena u cilju indukcije adaptivnog imuniteta (54, 55). Proizvode se tako što se gen koji kodira antigen od

interesa (antigen patogena) insertuje u plazmid, i nastali rekombinantni plazmid se unosi u bakteriju, obično *E. coli*. Transformisane bakterije se kultiviraju, radi dobivanja klonova tj. brojnih kopija rekombinantnog plazmida, koji se ekstrahuje, prečišćava i inkorporira u vakcinu. Budući da su se javila pitanja vezana za bezbednost nefunkcionalnih sekvenci u plazmidu, posebno markera rezistencije na antibiotike (plazmid se selektuje na osnovu rezistencije na antibiotike), za primenu kod ljudi, u novim generacijama DNK vakcina, marker je zamenjen ili uklonjen (56). Pored toga, razvijeni su minimalni DNK konstrukti, poput polusintetskih (57) ili potpuno sintetskih DNK konstrukta (58) koji isključivo kodiraju ciljani antigen. Kada plazmid preuzme ćelija domaćina, započinje sinteza antigena patogena. Ideja koja stoji u osnovi DNK vakcinalnog sistema je da se antigen eksprimira u ćeliji domaćina na sličan način kao u toku virusne infekcije. Kao rezultat, antigeni mogu da se prerađuju kao proteini sintetisani u citoplazmi, i nastali peptidi prezentuju imunskom sistemu u sklopu molekula I klase MHC. Pored toga, ako se protein oslobodi ili sekretuje, može se preraditi i ispoljiti u sklopu II klase MHC molekula, što dovodi do produkcije specifičnih antitela (55).

Putevi primene i formulacija DNK vakcina

Razvoj DNK vakcina započeo je devedesetih godina prošlog veka, kada je uobičajeni put primene bio intramuskularna ili intradermalna imunizacija korišćenjem konvencionalnih igala. Iako su se ovako aplikovane DNK vakcine pokazale imunogenim kod miševa, kod velikih životinjskih modela i ljudi nisu indukovale protektivni imunitet. Slaba imunogenost može se objasniti činjenicom da se nakon aplikacije konvencionalnim iglama, DNK deponuje u međućelijskom prostoru, a ne ulazi u ćelije domaćina. Takođe, da bi se protein ekspimirao, DNK vakcina mora da prođe dve ćelijske membrane, citoplazmatsku membranu, kao i jedarnu membranu (51, 59). Zbog toga su razvijene metode koje mogu poboljšati preuzimanje, ekspresiju i imunogenost DNK vakcina. One uključuju različite uređaje koji mehanički povećavaju unos DNK u ćelije, kao što su genski pištolj, mlazni injektori i *in vivo* elektroporacija, čija je primena dovela do povećanja imunogenosti ovih vakcina i u pretkliničkim i u kliničkim studijama (60-64). Treba pomenuti da je u nekim eksperimentalnim modelima, aplikacija DNK vakcina (npr. DNK vakcine protiv gripa) putem transdermalnih flastera takođe pokazala odlične rezultate (65, 66). Pored toga, razvijene su različite formulacije DNK vakcina, npr. inkapsulacija u liposome, sferične vezikule koje se sastoje od fosfolipida i holesterola, adsorpcija na polimere kao što je polietilenimin i adsorpcija ili inkapsulacija u biorazgradive nanočestice (67). Ove metode su prevashodno usmerene na poboljšanje preuzimanja DNK od strane ćelija i posledično povećanje ekspresije antigena. Takođe, u cilju modifikacije i poboljšanja DNK-posredovanog imunskog odgovora koristi se nekoliko različitih pristupa. Oni uključuju uvođenje tzv. molekularnih adjuvanasa, kao što su ligandi za receptore

molekulskih obrazaca (CpG nukleotidi) i različiti citokini, uglavnom IL-12, koji mogu biti inkorporirani u plazmid u koji je inkorporirana vakcinalna DNK ili drugi plazmid koji se daje istovremeno sa vakcinalnim. Strategije kojima se antigen usmerava u određene ćelije (npr. APC) ili u određene ćelijske subodeljke (npr. endoplazmatski retikulum ili lizosome) značajno mogu povećati preradu i prezentaciju antigena i stimulisati željeni imunski odgovor (68).

Mehanizam delovanja DNK vakcina

Iako je veliki broj studija pokazao da DNK vakcine stimulišu i humoralni i ćelijski imunski odgovor, posredstvom aktivacije CD4⁺ pomoćničkih i CD8⁺ citotoksičnih T ćelija, tačan mehanizam delovanja još uvek nije razjašnjen. Nakon ulaska u ćeliju, DNK vakcina se prepoznaje od strane receptora urođene imunosti, jer su plazmidi elementi DNK bakterijskog porekla koji deluju kao PAMPs. Pretpostavlja se da TLR-9 nije kritičan za efikasnost DNK vakcina, dok je signalni put koji uključuje stimulator interferonskih gena (engl. stimulator of IFN genes, STING) i TANK-vezujuću kinazu 1 (engl. TANK binding kinase 1, TBK1), kao i AIM2 (engl. absent in melanoma 2) receptor koji aktivira inflamazom, važan za mehanizam njihovog delovanja (69). Brojne studije ukazuju da imunski odgovor na DNK vakcinu značajno zavisi od toga koji će tip ćelija (somatske, npr. miociti, keratinociti, fibroblasti ili APC, npr. dendritske ćelije) preuzeti DNK, što zavisi od brojnih faktora, kao što su put primene, uređaj koji je korišćen za isporuku vakcine, formulacija vakcine i upotreba adjuvansa. Intramuskularna primena konvencionalnim iglama uglavnom rezultira u transfekciji miocita, dok intradermalna aplikacija pomoću komprimovanog gasa čestica obloženih molekulima DNK (genski pištolj) dovodi do transfekcije i keratinocita i profesionalnih APC, kao što su Langerhansove ćelije (70, 71). Langerhansove ćelije su glavne APC u koži, koje internalizuju antigen i migriraju u limfne čvorove gde prezentuju antigen T ćelijama. Pošto su profesionalne APC ključne za aktivaciju CD8⁺ T ćelija, najverovatniji mehanizam pokretanja imunskog odgovora je unakrsna prezentacija odnosno fagocitoza transfektovanih somatskih ćelija od strane profesionalnih APC ćelija i sledstvena prezentacija peptida u sklopu I i II klase MHC molekula na profesionalnim APC (72, 73).

Dobre i loše strane DNK vakcina

DNK vakcine indukuju mukozni i sistemski imunski odgovor, humoralni i ćelijski, jeftine su, lako se konstruišu, stabilne su na sobnoj temperaturi, što pojednostavljuje transport i distribuciju tako da mogu biti dostupnije zemljama u razvoju (74). Mogu se davati u više doza, za razliku od rekombinantnih vektorskih vakcina kod kojih je primena u više doza otežana zbog stvaranja anti-vektorskog imuniteta (75).

Međutim, primena DNK vakcina potencijalno nosi neke rizike, uglavnom vezane za dugotrajnu perzistenciju transfektovane DNK u jedru domaćina, i potencijalnu

integraciju u genom domaćina, što može dovesti do mutageneze i onkogeneze. U tom kontekstu treba pomenuti da je integracija DNK u genom domaćina detektovana nakon intramuskularne elektroporacije DNK vakcine kod miša (76, 77). Svetska zdravstvena organizacija (SZO) preporučuje studije integracije kao deo pretkliničkog programa prilikom procene bezbednosti DNK vakcina (78). Ubrizgavanje bakterijske DNK potencijalno može dovesti do stvaranja antitela protiv DNK i razvoja autoimunosti, mada ova antitela nisu nađena kod miševa, pacova, zečeva ili majmuna nakon imunizacije DNK vakcinama (76). Potencijalni razvoj rezistencije na antibiotike kod vakcinisanih takođe predstavlja jedno od mogućih bezbednosnih problema, ali do sada takvi događaji nisu dokumentovani. Konačno, ekspresija citokina ili kostimulatornih molekula koji se koriste za pojačavanje imunogenosti DNK može dovesti do neželjenih štetnih efekata uslovljenih ekspresijom i oslobađanjem citokina, kao što su generalizovana imunska supresija, hronična inflamacija ili autoimunost. U cilju bezbednosti DNK vakcina, SZO preporučuje praćenje postojanosti plazmida koji ekspimiraju citokine, kao i odgovarajuće pretkliničke modele, kao što su životinjski modeli koji reaguju na odgovarajuće humane citokine (79).

Trenutno su u toku brojne kliničke studije u kojima se ispituju DNK vakcine protiv različitih humanih patogena (hepatitis B i C virusa, HIV-a, virusa influence, Ebola virusa, respiratornog sincicijalnog virusa, herpes simpleks virusa, uzročnika malarije itd.) (55). Nijedna DNK vakcina još nije odobrena za humanu upotrebu, ali je četiri licencirano za veterinarsku primenu (npr. konjska vakcina protiv virusa Zapadnog Nila) (69), što pruža nadu da će ovaj tip vakcina uskoro postati efikasno sredstvo za prevenciju bolesti i kod ljudi.

iRNK vakcine

Ove vakcine sadrže informacionu (i)RNK koja služi kao matrica za sintezu endogenog proteina kod vakcinisanih osoba. Za profilaktičke vakcine protiv patogena, razvijene su dve vrste iRNK: nereplikujuće (konvencionalne) iRNK, i samoamplifikujuće (engl. self-amplifying) iRNK virusnog porekla (51, 80). Vakcine sa konvencionalnom iRNK kodiraju samo antigen od interesa. Vakcine sa samoamplifikujućom iRNK baziraju se u većini slučajeva na genomu alfa virusa u kojem su metodom genetskog inženjeringa geni koji kodiraju strukturne proteine zamenjeni genom od interesa, dok su geni koji kodiraju RNK replikacionu mašineriju i dalje prisutni (tako dobijen genom se naziva replikon). Ove vakcine diriguju svoju sopstvenu replikaciju (samoamplifikujuće), kroz sintezu od RNK-zavisnog RNK polimeraza kompleksa, što dovodi do stvaranja brojnih kopija iRNK koja kodira antigen od interesa. Na ovaj način je omogućena veća ekspresija proteina od interesa, uz primenu relativno male doze vakcine (51, 80). Sa druge strane, prednost korišćenja konvencionalnih iRNK vakcina u odnosu na samoamplifikujuće je jednostavnost

konstrukcije, mala veličina RNK, i odsustvo bilo kog dodatnog kodiranog proteina koji bi mogao dovesti do neželjenog imunskog odgovora (81).

Putevi primene i formulacija iRNK vakcina

Da bi delovala kao vakcina, egzogena iRNK mora ući u citoplazmu gde se odvija ekspresija proteina, što znači da mora proći kroz citoplazmatsku ili endozomalnu lipidnu membranu. Takođe, iako iRNK ima imunostimulatorne osobine (aktivira urođeni imunski sistem), one se mogu pojačati različitim formulacijama iRNK. Stoga su razvijeni različiti pristupi koji imaju za cilj da poboljšaju unos, odnosno preuzimanje iRNK od strane ćelija domaćina kao i adjuvantne osobine iRNK vakcina.

U eksperimentalnim modelima je pokazano da fizičke metode isporučivanja, kao što su genski pištolj i elektroporacija, povećavaju oslobađanje iRNK vakcina u citoplazmu (82, 83). Pored toga, jedna od najčešće korišćenih strategija za povećanje ekspresije i imunogenosti iRNK vakcina je povezivanje iRNK sa dodatnim komponentama. U tom kontekstu, jedan od prvih pristupa bio je povezivanje iRNK sa katjonskim peptidom, protaminom, koji štiti iRNK od degradacije (84, 85). Noviji pristupi uključuju stvaranje kompleksa sa lipidnim i polimernim nanočesticama. Danas se lipidne nanočestice najviše koriste za *in vivo* isporučivanje iRNK vakcina, i vrsta su agensa koji najviše obećava (86). Treba napomenuti da je jedan od načina isporuke nereplikujućih iRNK vakcina i putem dendritskih ćelija, ali se ovako primenjene iRNK koriste primarno za lečenje tumora (87).

Pored formulacije, put primene ima uticaja na kvalitet i jačinu imunskog odgovora. iRNK vakcine se mogu primenjivati sistemski ili lokalno, u zavisnosti od toga gde je potrebno indukovati ekspresiju antigena. U pretkliničkim studijama, iRNK vakcine protiv infektivnih bolesti su aplikovane intramuskularno, intradermalno i subkutano. Nakon intradermalne aplikacije, iRNK vakcine formulisane sa protaminom ili lipidnim nanočesticama uspešno indukuju imunski odgovor, uključujući produkciju antitela, kao i odgovor CD4⁺ i CD8⁺ T ćelija (88, 89).

Mehanizam delovanja iRNK vakcina

Egzogena iRNA je imunostimulatorna, zato što se prepoznaje od strane različitih membranskih, endozomalnih (TLR3, TLR7 i TLR8) i citoplazmatskih (RIG-I, MDA-5 i PKR) receptora urođene imunosti (90). Aktivacija ovih receptora rezultira u robusnom urođenom imunskom odgovoru koji na mestu inokulacije dovodi do oslobađanja hemokina i citokina kao što su IL-12 i TNF, koji su ključni za sazrevanje dendritskih ćelija, i otuda za indukciju efikasnog adaptivnog imunskog odgovora protiv kodiranog antigena. Međutim, postoje podaci da prepoznavanje iRNK od strane receptora urođene imunosti, putem IFN α i β signalnog puta, može da dovede i do inhibicije ekspresije antigena što negativno utiče na imunski odgovor (91).

Iako mehanizmi koji leže u osnovi indukcije imunskog odgovora koji pokreću iRNK vakcine nisu do kraja razjašnjeni, smatra se da ekspresija i prezentacija kodiranih antigena sledi slična pravila kao kod DNK vakcina. Ukratko, najvažniji tip ćelija za iRNK vakcine su profesionalne APC, najverovatnije dendritske ćelije, koje nakon transfekcije sintetišu antigen kodiran iRNK u nativnoj formi. Sintetisani protein se potom obrađuje do antigenskih peptida i prezentuje u sklopu I i II klase MHC molekula zajedno sa kostimulatornim signalima CD8+ i CD4+ T ćelijama. Antigen koji se eksprimira u nativnoj formi prepoznaje se od strane B ćelija koje potom proizvode antitela protiv antigena (51).

Dobre i loše strane iRNK vakcina

„Ogoljena” iRNK je u fiziološkim uslovima jako nestabilna (zbog prisustva ekstraćelijskih ribonukleaza koje katalitički hidrolizuju RNK). Takođe, usled hidrofilnosti i jakog negativnog naelektrisanja, nakon aplikacije *in vivo*, RNK se ne preuzima efikasno od strane ćelija domaćina. Ipak, ovi nedostaci su prevaziđeni vezivanjem iRNK za visoko efikasne nosače, kao što su nove generacije lipidnih nanočestica, koje štite iRNK od degradacije ribonukleazama i omogućavaju prolongiranu ekspresiju antigena, što dovodi do indukcije snažnog humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora nakon *in vivo* primene.

iRNK vakcine, slično DNK vakcinama, indukuju i humoralni i ćelijski imunski odgovor i mogu se koristiti za ekspresiju bilo kog željenog antigena. U pogledu proizvodnje, obe platforme omogućavaju dobijanje različitih vakcina korišćenjem istih uspostavljenih proizvodnih procesa i postrojenja. Međutim, budući da se proizvodni proces iRNK zasniva na *in vitro* sistemima i ne zahteva amplifikaciju u bakterijama ili ćelijskim kulturama, proizvodnja iRNK vakcina, u poređenju sa DNK vakcinama, traje kraće i relativno se lakše kontroliše (51, 80). S obzirom na to da se translacija u protein odvija u citoplazmi, dodatna prednost u odnosu na DNK vakcine je izbegavanje potencijalnog rizika od integracije u genom domaćina. Ne indukuju stvaranje anti-vektorskih antitela, kao što je primećeno za izvesne virusne vektorske vakcine (92, 93), i zbog toga se mogu primenjivati više puta.

U prekliničkim studijama, i konvencionalne i samoamplifikujuće iRNK vakcine protiv različitih patogena (npr. HIV, virus influence, Zika i Ebola virus), pokazale su dobre rezultate (94-97). Neke od iRNK vakcina trenutno se testiraju u kliničkim studijama i generalno su pokazale ohrabrujuće rezultate u pogledu bezbednosti i imunogenosti (51), pružajući podršku za dalja klinička istraživanja.

Zaključak

Prevenција mnogih infektivnih bolesti i dalje predstavlja izazov u oblasti vakcinologije. U toku proteklih godina postalo je jasno da vakcine za ove bolesti nije

moguće dobiti sledeći klasične pristupe uspešnih konvencionalnih vakcina. Napredak u oblasti molekularne biologije i genetičkog inženjeringa omogućio je razvoj novih vakcina, kao što su vakcine sa vektorima i nukleinskim kiselinama (DNK i iRNK vakcine), koje ispunjavaju preduslove za rešenje ovih izazova. Svaki od ovih tipova vakcina ima svoje prednosti i nedostatke vezane za mogućnost indukcije različitih tipova imunskog odgovora, proizvodne kapacitete i bezbednost primene kod ljudi. Virusne vektorske vakcine efikasno stimulišu imunski sistem, slično kao i kod prirodne infekcije, i indukuju snažan imunski odgovor protiv kodiranog ciljnog antigena. Međutim, proizvodnja ovih vakcina je relativno kompleksna, i otuda skupa. Anti-vektorska antitela, već postojeća ili stvorena nakon prve imunizacije mogu ometati imunski odgovor, odnosno onemogućiti revakcinaciju istom vektorskom vakcinom. Pored toga, vezano za primenu ovih vakcina, postoji zabrinutost zbog rizika od neželjenih efekata i rezidualne replikacije virusa *in vivo*. U pogledu proizvodnje, DNK (naročito sintetski DNK konstrukti) i iRNK vakcine imaju prednost jer omogućavaju relativno jednostavan, sintetski proizvodni proces. Iako se u ranim kliničkim studijama DNK vakcine nisu pokazale dovoljno imunogenim, novija klinička ispitivanja ukazuju da ove vakcine mogu indukovati protektivni imunitet. Međutim, mogućnost dugotrajne perzistencije i integracije u genom domaćina, zavisnost od uređaja za ubrizgavanje ili elektroporacije, neki su od važnih nedostataka DNK vakcina. iRNK vakcine su najnovija tehnologija i stoga još uvek nisu mnogo ispitivane kod ljudi. Poslednjih godina pojavile su se publikacije pretkliničkih i ranih kliničkih ispitivanja u kojima su objavljeni obećavajući rezultati. Nemogućnost genomske integracije i nedostatak perzistencije u ćelijama vakcinisanih čini primenu iRNK vakcina bezbednijom u odnosu na primenu DNK vakcina.

Vektorske vakcine i DNK vakcine protiv infektivnih bolesti već su licencirane za primenu u veterini. Iako malobrojne, vektorske vakcine su odobrene i za primenu kod ljudi. Obećavajući rezultati dobijeni u kliničkim studijama sa DNK vakcinama, a nedavno i u ranim kliničkim studijama sa iRNK vakcinama, ukazuju da bi one mogle postati moćna sredstva u prevenciji infektivnih bolesti.

Zahvalnica

Ovaj rad je finansijski podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (projekat broj 175050).

Literatura

1. Delany I, Rappuoli R, De Gregorio E. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol Med*. 2014;6(6):708–20.
2. Greenwood B. The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1645):20130433.

3. Stanberry LR, Strugnell R. Vaccines of the future. In: Garçon N, Stern PL, Cunningham AL, editors. *Understanding modern vaccines: perspectives in vaccinology*. Vol. 1. Amsterdam: Elsevier; 2011. p. 151–99.
4. Murray C, Ortblad K, Guinovart C, Lim S, Wolock T, Roberts DA, *et al.* Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990–2013: A systematic analysis for the global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014;13;384(9947):1005–70.
5. Kaslow DC, Biernaux S. RTS, S: Toward a first landmark on the Malaria Vaccine Technology Roadmap. *Vaccine* 2015;3(52):7425–32.
6. Hazel M, Dockrell HM, Smith SG. What Have We Learnt about BCG Vaccination in the Last 20 Years? *Front Immunol.* 2017;8:1134.
7. Cunningham AL, Garçon N, Leo O, Friedland LR, Strugnell R, Laupèze B, *et al.* Vaccine development: From concept to early clinical testing. *Vaccine* 2016;34(52):6655–64.
8. Flingai S, Czerwonko M, Goodman J, Kudchodkar SB, Muthumani K, Weiner DB. Synthetic DNA vaccines: Improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants. *Front Immunol.* 2013;4:354.
9. Kallen KJ, Heidenreich R, Schnee M, Petsch B, Schlake T, Thess A, *et al.* A novel, disruptive vaccination technology: Self-adjuvanted RnActive(®) vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(10):2263–76.
10. Skenderi F, Jonjic S. Viral vaccines and vectors-some lessons from cytomegalo viruses. *Period. biol.* 2012;114(2):201–10.
11. Pasquale AD, Preiss S, Silva FT, Garçon N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines (Basel).* 2015;3(2):320–43.
12. Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine* 2010;28(Suppl 3): C2–C13.
13. Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 2008;3(6):352–63.
14. Siegrist C-A. Vaccine immunology. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*. 6th ed. Philadelphia, United States: Elsevier/Saunders; 2013. p. 14–32.
15. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Ann Med.* 2018;50(2):110–20.
16. Kallerup RS, Foged C. Classification of vaccines. In *Subunit vaccine delivery*, Foged C, Rades T, Perrie Y, Hooks S, editors. Springer. 2015. p. 15–29.
17. Hajj Hussein I, Chams N, Chams S, El Sayegh S, Badran R, Raad M, *et al.* Vaccines through centuries: major cornerstones of global health. *Front Public Health.* 2015;3:269.
18. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol.* 2011;12(6):509–17.
19. Esteves K. Safety of oral poliomyelitis vaccine: results of a WHO enquiry. *Bull World Health Org.* 1988;66(6):739–46.

20. Strugnell R, Zepp F, Cunningham A, *et al.* Vaccine antigens. In: Garcon N, Stern PL, Cunningham AL, editors. *Understanding modern vaccines: perspectives in vaccinology*. Vol. 1. Amsterdam: Elsevier; 2011. p. 61–88.
21. Vučković Opavski N. Bakterijske vakcine. U: *Medicinska mikrobiologija, udžbenik za student medicine*, urednici Savić B, Jovanović T, Mitrović S. Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet, Beograd, 2019;p. 121-31.
22. Michel ML, Tiollais P. Hepatitis B vaccines: protective efficacy and therapeutic potential. *Pathol Biol (Paris)*. 2010;58(4):288–95.
23. Roldão A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2010;9(10):1149–76.
24. Pichichero ME. Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials. *Hum Vaccin Immunother*. 2013;9(12):2505–23.
25. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(7):1055–65.
26. Robinson HL, Amara RR. T cell vaccines for microbial infections. *Nat Med*. 2005;11(4 Suppl):S25–S32.
27. Lemaire D, Barbosa T, Rihet P. Coping with genetic diversity: the contribution of pathogen and human genomics to modern vaccinology. *Braz J Med Biol Res*. 2012;45(5):376-85.
28. Sette A, Rappuoli R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity* 2010;33(4):530-41.
29. Becker PD, Guzmán CA. Community-acquired pneumonia: paving the way towards new vaccination concepts. In: *Community-Acquired Pneumonia*, ed. by N. Suttorp, T. Welte and R. Marre, 2007 BirkhäuserVerlag Basel/Switzerland, p.201-45.
30. Vernikos G, Medini D. Bexsero® chronicle. *Pathog Glob Health*. 2014;108(7):305–16.
31. Bull JJ, Smithson MW, Nuismer SL. Transmissible Viral Vaccines. *Trends Microbiol*. 2018;26(1):6-15.
32. Yurina V. Live Bacterial Vectors—A Promising DNA Vaccine Delivery System. *Med Sci. (Basel)* 2018;6(2):27.
33. Douglas AD, Williams AR, Illingworth JJ, Kamuyu G, Biswas S, Goodman AL, *et al.* The blood-stage malaria antigen PfRH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. *Nat Commun*. 2011;2:601.
34. Satti I, Meyer J, Harris SA, Thomas Z-RM, Griffiths K, Antrobus RD, *et al.* Safety and immunogenicity of a candidate tuberculosis vaccine MVA85A delivered by aerosol in BCG-vaccinated healthy adults: a phase1, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(10):939–46.
35. Jeyanathan M, Thantrige-Don N, Afkhami S, Lai R, Damjanovic D, Zganiacz A, *et al.* Novel chimpanzee adenovirus-vectored respiratory mucosal tuberculosis vaccine: overcoming local anti-human adenovirus immunity for potent TB protection. *Mucosal Immun*. 2015;8(6):1373–87.

36. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, *et al.* Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med.* 2009;361(23):2209–20.
37. Monath TP, McCarthy K, Bedford P, Johnson CT, Nichols R, Yoksan S, *et al.* Clinical proof of principle for ChimeriVax: Recombinant live, attenuated vaccines against flavivirus infections. *Vaccine* 2002;20(7-8):1004–18.
38. Tan WG, Jin HT, West EE, Penaloza-Macmaster P, Wieland A, Zilliox MJ, *et al.* Comparative analysis of simian immunodeficiency virus gag-specific effector and memory CD8⁺ T cells induced by different adenovirus vectors. *J Virol.* 2013;87(3):1359–72.
39. Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, *et al.* Adeno virus mediated gene delivery: potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis.* 2017;4(2):43–63.
40. Condit RC, Williamson AL, Sheets R, Seligman SJ, Monath TP, Excler JL, *et al.* Collaboration Viral Vector Vaccines Safety Working Group (V3SWG). Unique Safety Issues Associated with Virus Vectored Vaccines: Potential for and Theoretical Consequences of Recombination with Wild Type Virus Strains. *Vaccine* 2016;34(51):6610–6.
41. Nascimento IP, Leite LCC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45(12):102–11.
42. Rollier CS, Reyes-Sandoval A, Cottingham MG, Ewer K, Hill AV. Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(3):377–82.
43. Liu MA. Gene-based vaccines: Recent developments. *Curr Opin Mol Ther.* 2010;12(1):86–93.
44. Frey SE, Wald A, Edupuganti S, Jackson LA, Stapleton JT, El Sahly H, *et al.* Comparison of lyophilized versus liquid modified vaccinia Ankara (MVA) formulations and subcutaneous versus intradermal routes of administration in healthy vaccinia-naive subjects. *Vaccine* 2015;33(39):5225–34.
45. Meyer J, Harris SA, Satti I, Poulton ID, Poyntz HC, Tanner R, *et al.* Comparing the safety and immunogenicity of a candidate TB vaccine MVA85A administered by intramuscular and intradermal delivery. *Vaccine* (2013) 31:1026–33.
46. Green CA, Scarselli E, Voysey M, Capone S, Vitelli A, Nicosia A, *et al.* Safety and immunogenicity of novel respiratory syncytial virus (RSV) vaccines based on the RSV viral proteins F, N and M2-1 encoded by simian adenovirus (PanAd3-RSV) and MVA (MVA-RSV); protocol for an open-label, dose-escalation, single-centre, phase 1 clinical trial in healthy adults. *BMJ Open* 2015;5:e008748.
47. Liebowitz D, Lindbloom JD, Brandl JR, Garg SJ, Tucker SN. High titre neutralising antibodies to influenza after oral tablet immunisation: a phase 1, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(9):1041–8.
48. Vemula SV, Sayedahmed EE, Sambhara S, Mittal SK. Vaccine approaches conferring cross-protection against influenza viruses. *Expert Rev Vaccines* 2017;16(11):1141–54.
49. Lauer KB, Borrow R, Blanchard TJ. Multivalent and multipathogen viral vector vaccines. *Clin Vaccine Immunol.* 2017;24(1):e00298-16.

50. Venkatraman N, Anagnostou N, Bliss C, Bowyer G, Wright D, Lovgren-Bengtsson K, *et al.* Safety and immunogenicity of heterologous prime boost immunization with viral-vectored malaria vaccines adjuvanted with Matrix-M. *Vaccine* 2017;35(45):6208–17.
51. Rauch S, Jasny E, Schmidt KE, Petsch B. New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations. *Front Immunol.* 2018;9:1963.
52. Petricciani J, Sheets R, Griffiths E, Knezevic I. Adventitious agents in viral vaccines: lessons learned from 4 case studies. *Biologicals* 2014;42(5):223–36.
53. Meeusen EN, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G. Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):489–510.
54. Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin Infect Dis.* 2011;53(3):296–302.
55. Hobernik D, Bros M. DNA Vaccines-How Far From Clinical Use? *Int J Mol Sci.* 2018;19(11). pii: E3605.
56. Walters AA, Kinnear E, Shattock RJ, Mcdonald JU, Caproni LJ, Porter N, *et al.* Comparative analysis of enzymatically produced novel linear DNA constructs with plasmids for use as DNA vaccines. *Gene Ther.* 2014;21(7):645–52.
57. Williams JA. Vector design for improved DNA vaccine efficacy, safety and production. *Vaccines* 2013;1(3):225–49.
58. Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol Ther.* 2003;8(3):495–500.
59. John J. Suschak, James A. Williams, Connie S. Schmaljohn. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(12): 2837–48.
60. Grant-Klein RJ, Van Deusen NM, Badger CV, Hannaman D, Dupuy LC, Schmaljohn CS. A multiagent filovirus DNA vaccine delivered by intramuscular electroporation completely protects mice from ebola and Marburg virus challenge. *Hum Vaccin Immunother.* 2012;8(11):1703–6.
61. Vasan S, Hurley A, Schlesinger SJ, Hannaman D, Gardiner DF, Dugin DP, *et al.* In vivo electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers. *PLoS One* 2011; 6(5):e19252.
62. Roy MJ, Wu MS, Barr LJ, Fuller JT, Tussey LG, Speller S, *et al.* Induction of antigen-specific CD8+ T cells, T helper cells, and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccine. *Vaccine* 2000;19(7-8):764–78.
63. Ledgerwood JE, Hu Z, Gordon IJ, Yamshchikov G, Enama ME, Plummer S, *et al.* Influenza virus h5 DNA vaccination is immunogenic by intramuscular and intradermal routes in humans. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(11):1792–7.
64. Aguiar JC, Hedstrom RC, Rogers WO, Charoenvit Y, Sacci JB Jr, Lanar DE, *et al.* Enhancement of the immune response in rabbits to a malaria DNA vaccine by immunization with a needle-free jet device. *Vaccine* 2001;20(1-2):275–80.

65. Fernando GJ, Zhang J, Ng HI, Haigh OL, Yukiko SR, Kendall MA. Influenza nucleoprotein DNA vaccination by a skin targeted, dry coated, densely packed microprojection array (Nanopatch) induces potent antibody and CD8 (+) T cell responses. *J Control Release* 2016;237:35–41.
66. Song J-M, Kim Y-C, Eunju O, Compans RW, Prausnitz MR, Kang S-M. DNA vaccination in the skin using microneedles improves protection against influenza. *Mol Ther.* 2012;20(7):1472–80.
67. Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA. DNA vaccines: progress and challenges. *J Immunol.* 2005;175(29):633–9.
68. Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines* 2016;15(3):313–29.
69. Gómez LA, Oñate AA. Plasmid-Based DNA Vaccines. In: *Plasmid*, Edited by Munazza Gull, Published: June 19th 2019, eBook (PDF), Published by IntechOpen, 2019.
70. Manam S, Ledwith BJ, Barnum AB, Troilo PJ, Pauley CJ, Harper LB, *et al.* Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology* 2000;43(4-6):273–81.
71. Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med.* 1998;188(6):1075–82.
72. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet.* 2008;9(10):776–88.
73. Kanthesh M, Loide N, Raghu N, Gopenath TS, Chandrashekrappa GK, Murugesan K, *et al.* DNA Vaccines. *Vaccines Vaccin.* 2018;3(2):000122
74. Jorritsma SHT, Gowans EJ, Grubor-Bauk B, Wijesundara D. K. Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines. *Vaccine* 2016;34(46):5488–94.
75. Frahm N, DeCamp AC, Friedrich DP, Carter DK, Defawe OD, Kublin JG, *et al.* Human adenovirus-specific T cells modulate HIV-specific T cell responses to an Ad5-vectored HIV-1 vaccine. *J Clin Invest.* 2012;122(1):359–67.
76. Schalk JA, Mooi FR, Berbers GA, Van Aerts LA, Ovelgonne H, Kimman TG. Preclinical and clinical safety studies on DNA vaccines. *Hum Vaccin.* 2006;2(2):45–53.
77. Wang Z, Troilo PJ, Wang X, Griffiths TG, Pacchione SJ, Barnum AB, *et al.* Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther.* 2004;11(8):711–21.
78. http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/dna/Annex%201_DNA%20vaccines.pdf?ua=1
79. World Health Organization. WHO Expert Committee on Biological Standardization 54th report ed. Geneva: World Health Organization, 2005
80. Zhang C, Maruggi G, Shan H, Li J. Advances in mRNA Vaccines for Infectious Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:594.
81. Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, Kallen KJ. Developing mRNA-vaccine technologies. *RNA Biol.* 2012;9(11):1319–30.

82. Aberle JH, Aberle SW, Kofler RM, Mandl CW. Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus. *J Virol* (2005) 79(4):15107–13.
83. Johansson DX, Ljungberg K, Kakoulidou M, Liljestrom P. Intradermal electroporation of naked replicon RNA elicits strong immune responses. *PLoS ONE* 2012;7(1):e29732.
84. Scheel B, Teufel R, Probst J, Carralot JP, Geginat J, Radsak M, *et al.* Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur J Immunol.* (2005) 35(5):1557–66.
85. Schnee M, Vogel AB, Voss D, Petsch B, Baumhof P, Kramps T, *et al.* An mRNA vaccine encoding rabies virus glycoprotein induces protection against lethal infection in mice and correlates of protection in adult and newborn pigs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(6):e0004746.
86. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):261–79.
87. Benteyn D, Heirman C, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K. mRNA-based dendritic cell vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2015;14(2):161–76.
88. Kowalczyk A, Doener F, Zanzinger K, Noth J, Baumhof P, Fotin-Mleczek M, *et al.* Self-adjuvanted mRNA vaccines induce local innate immune responses that lead to a potent and boostable adaptive immunity. *Vaccine* 2016;34(33):3882–93.
89. Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, Muramatsu H, Andersen H, Demaso CR, *et al.* Zika virus protection by a single low-dose nucleoside modified mRNA vaccination. *Nature* 2017;543(7644):248–51.
90. Chen N, Xia P, Li S, Zhang T, Wang TT, Zhu J. RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens. *IUBMB Life* 2017; 69(5):297–304.
91. Kariko K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(21):e142
92. Pinschewer DD. Virally vectored vaccine delivery: medical needs, mechanisms, advantages and challenges. *Swiss Med Wkly.* 2017;147:w14465.
93. De Bruyn G. Cofactors that may influence vaccine responses. *Curr Opin HIV AIDS* 2010;5(5):404–8.
94. Richner JM, Himansu S, Dowd KA, Butler SL, Salazar V, Fox JM, *et al.* Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. *Cell* 2017;168(6):1114–25.
95. Pardi N, Secreto AJ, Shan X, Debonera F, Glover J, Yi Y, *et al.* Administration of nucleoside-modified mRNA encoding broadly neutralizing antibody protects humanized mice from HIV-1 challenge. *Nat Commun.* 2017;8:14630.
96. Brazzoli M, Magini D, Bonci A, Buccato S, Giovani C, Kratzer R, *et al.* Induction of broad-based immunity and protective efficacy by selfamplifying mRNA vaccines encoding influenza virus hemagglutinin. *J Virol.* 2016;90(1):332–44.
97. Meyer M, Huang E, Yuzhakov O, Ramanathan P, Ciaramella G, Bukreyev A. Modified mRNA-based vaccines elicit robust immune responses and protect guinea pigs from Ebola virus disease. *J Infect Dis.* 2018; 217(3):451–5.

New vaccines on the horizon

Nevena Arsenović Ranin

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Microbiology and Immunology, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade

Corresponding author, e-mail: nevena.arsenovic-ranin@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

Vaccines are considered to be one of the greatest public health achievements of the last century. As a result of widespread vaccine use, the smallpox virus has been completely eradicated and the incidence of other diseases such as polio, measles, tetanus and diphtheria has been drastically reduced. Current licensed vaccines, predominantly composed of either live attenuated or killed pathogens, pathogen subunits, owe their success to their ability to elicit neutralizing antibodies against pathogens. On the other side, cell-mediated immunity, which plays a central role in elimination of intracellular pathogens (which in most cases leads to chronic infections) is much more difficult to obtain using current vaccines. Currently, numerous vector and nucleic acid (DNA and mRNA)-based prophylactic vaccines, capable of inducing substantial vaccine-specific T cell responses, are investigated in preclinical and clinical studies, with promising results. This review focuses the background of vector and nucleic acid-based vaccines, their strengths and weaknesses and safety issues.

Key words: vaccine types, vector vaccines, DNA vaccines, mRNA vaccines
