

Received: 2013.07.30
Accepted: 2013.09.13
Published: 2013.11.27

Szczepionki podjednostkowe – antygeny, nośniki, metody koniugacji i rola adiuwantów

Subunit vaccines – antigens, carriers, conjugation methods and the role of adjuvants

Anna Jarzab^{1*}, Michał Skowicki^{1,2**}, Danuta Witkowska¹

¹Institut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

²Wrocławskie Centrum Badań EIT+

Streszczenie

Szczepionki chroniące przed rozwojem chorób zakaźnych są skutecznym narzędziem w walce z mikroorganizmami chorobotwórczymi. Obecnie dysponujemy preparatami chroniącymi przed zakażeniami, których standardowe leczenie jest nie tylko trudne, lecz często niemożliwe ze względu na ciągle postępujący wzrost oporności drobnoustrojów na wiele dostępnych antybiotyków. Wśród preparatów, które znalazły zastosowanie w profilaktyce zakażeń są szczepionki tradycyjne zawierające żywe, zabite lub osłabione szczepy drobnoustrojów. Niemniej jednak należy zauważyć, że takie szczepionki nie zawsze są skuteczne, szczególnie wtedy, gdy oczekujemy wzbudzenia specyficznej odpowiedzi odpornościowej skierowanej przeciwko określonym antygenom. W ostatnim czasie coraz większe zainteresowanie zyskują szczepionki podjednostkowe, należące do szczepionek nowej generacji. Szczepionki te zawierają wysoce oczyszczone, immunogenne antygeny stanowiące fragmenty patogennych mikroorganizmów. Zastosowanie tego typu antygenów wyklucza przede wszystkim ryzyko rozwoju zakażenia poszczepiennego, a także gwarantuje posługiwanie się preparatem o dobrze zbadanym i zdefiniowanym składzie. Zastosowanie antygeny o znanym składzie chemicznym w szczepionce podjednostkowej będzie przebiegało w sposób ściśle kontrolowany i będzie minimalizowało występowanie działań niepożądanych, związanych z zastosowaniem całych komórek. W pracy omówiono najbardziej obiecujące i najczęściej testowane antygeny i nośniki szczepionek, które są brane pod uwagę przy konstrukcji szczepionek podjednostkowych. Przedstawiono także metody ich koniugacji i dostarczania do komórek układu immunologicznego. Ponadto opisano wady i zalety adiuwantów, stanowiących substancje wspomagające odpowiedź odpornościową, które znalazły zastosowanie w preparatach przeznaczonych dla ludzi. Podkreślono także zależność między skutecznością a mechanizmem ich działania, co ma kluczowe znaczenie we wzbudzeniu odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko konkretnym patogenom.

Słowa kluczowe: odporność • szczepionka • koniugat • szczepionki podjednostkowe • adiuwanty

* Publikacja współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



** Publikacja współfinansowana ze środków Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ w ramach realizacji projektu NanoMat - „Wykorzystanie nanotechnologii w nowoczesnych materiałach” (POIG.01.01.02-02-002/08) współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2).

Summary

Vaccines are effective tools protecting against the development of infectious diseases caused by pathogenic microorganisms. Currently, we have vaccines protecting against many infections, where standard therapy is not only difficult but often impossible due to the ever-progressive increase in bacterial resistance to many available antibiotics. Among vaccines which have been used in the prevention of infection are the traditional vaccines containing live, killed or attenuated strains of microorganisms. However, it should be noted that such vaccines are not always effective, especially when the expected immune response is directed against specific antigens. Subunit vaccines belong to new generation vaccines and have gained more and more interest in recent years. These vaccines contain fragments of pathogenic microorganisms, which are highly purified and immunogenic antigens. Using these purified antigens excludes the risk of post-vaccination infection. In addition, subunit vaccines minimize side-effects associated with the use of whole bacterial cells. The paper discusses the most promising and the most tested antigens, vaccine carriers, conjugation methods and vaccine delivery systems which are being used in the design of subunit vaccines. This paper also highlights the advantages and disadvantages of adjuvants, which are substances to support the immune response in humans, and the relationship between adjuvants' efficacy and their mechanism of action.

Key words: immunity • vaccine • conjugate • subunit vaccines • adjuvants

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1077807>

Word count: 6447

Tables: 4

Figures: 5

References: 61

Adres autorki: dr hab. Danuta Witkowska, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; email: witkows@iitd.pan.wroc.pl

Wykaz skrótów: **APC** - komórki prezentujące antygeny (antigen presenting cells); **AS** - system nazewnictwa adiuwantów (adjuvant system); **BCG** - Bacillus Calmette-Guérin; **BSA** - albumina surowicy bydłowej (bovine serum albumin); **BSCOES** - bis [2-(sukcynimidooksykarbonylooksy)etylo]sulfon (bis[2-(succinimidooxycarbonyloxy)ethyl]-sulfone); **CCL** - ligand dla chemokiny zawierający motyw C-C (chemokine (C-C motif) ligand); **CD** - antygen różnicowania komórkowego (cluster of differentiation); **CDAP** - tetrafluoroboran 1-cyjano-4-dimetyloaminopirydyny (1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate); **CMC** - N-cykloheksylo-N'-(2-morfolinoetylo) karbodiimid (1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide); **CNBR** - bromocyjan (cyanogen bromide); **CpG** - niemetylowane CpG (non-methylated CpG); **CPPs** - peptydy penetrujące błony (cell-penetrating peptides); **CSF** - czynnik stymulujący tworzenie kolonii (colony-stimulating factor); **CXCL** - ligand chemokiny zawierający motyw C-X-C (chemokine (C-X-C motif) ligand); **DCC** - N,N'-dicykloheksylokarbodiimid (N,N'-dicyclohexyl carbodiimide); **DDA** - dimetyl bromku dioctadecyloamonowego (dimethyl dioctadecylammonium bromide); **DIC** - N,N'-diizopropylkarbodiimid (N,N'-diisopropyl carbodiimide); **DSG** - glutaran di(N-sukcynimidylu) (di(N-succinimidyl) glutarate); **DSP** - ditiobis(propionian sukcydimidylu) (dithiobis[succinimidyl propionate]); **DSS** - suberynian disukcynimidylu (disuccinimidyl suberate); **DST** - winian disukcynimidylu (disuccinimidyl tartarate); **DTSSP** - 3,3'-ditiobis(propionian sulfosukcynimidylu) (3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate)); **DTT** - ditiotreitol (dithiothreitol); **EDC** - N-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimid (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide); **EGS** - bis(sukcynimidylbursztynian) glikolu etylenowego (ethylene glycol bis[succinimidylsuccinate]); **HBV** - wirus zapalenia wątroby typu B (hepatitis B virus); **HIV** - ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus); **HPV** - ludzki wirus brodawczaka (human papilloma virus); **IFN** - interferon (interferon); **IgG** - przeciwciało klasy IgG (immunoglobulin G); **IL** - interleukina (interleukin); **KLH** - hemocyjanina (keyhole limpet hemocyanin); **LPS** - lipopolisacharyd (lipopolysaccharide); **MBS** - ester m-maleimidobenzozolo-N-hydroksysukcynimidu (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester); **MCP** - białko chemotaktyczne monocytów (monocyte chemotactic protein); **MHC** - główny układ zgodności tkankowej (major histocompatibility complex); **MIP-1β** - białko zapalne makrofagów 1β (macro-

phage inflammatory protein 1β); **MPL** - monofosforylowany lipid A (monophosphoryl lipid A); **NF-κB** - czynnik jądrowy NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); **NHS** - N-hydroksysukcynimid (N-hydroxysuccinimide); **OMPs** - białka błony zewnętrznej (outer membrane proteins); **OVA** - owoalbumina (ovalbumin); **PAMP** - molekularne wzorce patogenów (patogen associated molecular patterns); **PEG** - glikol polietylenowy (polyethylene glycol); **PEI** - polietylenoimina (polyethyleneimine); **PLGA** - poli(laktydo-koglikolid) (poly(lactide-coglycolide)); **SMPB** - N-sukcynimidyl-4-(p-maleimidofenylo)-maślan (N-succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrate); **SPDP** - ester N-hydroksysukcynimidowy kwasu 3-(2-pirydylditio)propionowego (3-(2-pyridyldithio)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester); **SucPG** - bursztynianowany poli(glicydol) (succinylated poly(glycidol)); **Sulfo-DSS** - suberynian disulfosukcynimidylu (disulfosuccinimidyl suberate); **Sulfo-EGS** - bis(sulfosukcynimidylbursztynian) glikolu etylenowego (ethylene glycol bis[sulfosuccinimidylsuccinate]); **Sulfo-EGS** - bis(sulfosukcynimidylbursztynian) glikolu etylenowego (ethylene glycol bis[sulfosuccinimidylsuccinate]); **Sulfo-NHS** - N-hydroksysulfosukcynimid N-hydroksysulfosuccinimide; **sulfo-SMCC** - sulfo-sukcynimidyl-4-(N-meileimidometylo)cykloheksylokarboksylan (sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate); **Th** - limfocyt pomocniczy (T helper cell); **TNF** - czynnik martwicy guza (tumor necrosis factor); **TT** - toksoid tężcowy (tetanus toxoid); **WNV** - wirus Nilu Zachodniego (West Nil Virus); **WZWB** - wirusowe zapalenie wątroby typu B (hepatitis B).

WSTĘP

Zastosowanie szczepionek i wprowadzenie obowiązkowych szczepień ochronnych w ciągu ostatnich 200 lat pozwoliło na opanowanie, a w większości regionów na świecie na zupełną eliminację dziewięciu groźnych chorób zakaźnych. Poczynając od pierwszej szczepionki przeciwko ospie prawdziwej, opracowanej w 1798 r. przez Edwarda Jennera, która przyczyniła się do eradykacji ospy prawdziwej, za równie skuteczne można uznać te chroniące przed błonicą, krztuścem, tężcem, żółtą febrą, polio, odrą, świnką i różyczką [20]. Częstotliwość występowania chorób zakaźnych, a także odsetek śmiertelności spowodowany rozwojem większości tych chorób w Stanach Zjednoczonych i Europie Zachodniej, zmniejszyły się o 95-99% w porównaniu z okresem przed wprowadzeniem obowiązkowych szczepień ochronnych [52].

Szczepienia, oprócz higieny są najskuteczniejszym sposobem działania w profilaktyce zakażeń. Działanie aktualnie stosowanych szczepionek oparte jest na bazie dwóch głównych mechanizmów, odpowiedzialnych za wzbudzenie biernej lub czynnej odpowiedzi odpornościowej. Szczepionki wzbudzające ochronę bierną zawierają gotowe przeciwciała skierowane przeciwko konkretnym patogenom lub czynnikom chorobotwórczym i są podawane przed lub po okresie potencjalnego narażenia na zakażenie. Szczepionki chroniące przed rozwojem zakażenia w sposób czynny, zawierają antygeny stymulujące układ immunologiczny do wytwarzania swoistych przeciwciał ochronnych (odpowiedź humoralna), pobudzają odpowiedź komórkową (zależną od limfocytów T cytotoksycznych) lub wzbudzają oba te typy odpowiedzi jednocześnie. Do najczęściej używanych i najskuteczniejszych oraz warunkujących długotrwałą ochro-

Tabela 1. Zestawienie zalet i wad szczepionek różnego typu [1,19,25]

Typ szczepionki	Zalety	Wady
Zawierające żywe mikroorganizmy o zmniejszonej chorobotwórczości (atenuowane)	<ul style="list-style-type: none"> wzbudzają długotrwałą ochronę wzbudzają oba typy odpowiedzi immunologicznej humoralną i komórkową wymagają małej liczby dawek przypominających nie wymagają adiuwantu 	<ul style="list-style-type: none"> wymagają uprzedniego osłabienia szczepu (atenuacja) szczepionki słabo zdefiniowane niosą ryzyko rewersji szczepu do patogenności niosą ryzyko transmisji szczepu po rewersji na osoby trzecie
Zawierające martwe mikroorganizmy	<ul style="list-style-type: none"> brak ryzyka rewersji do patogenności i transmisji 	<ul style="list-style-type: none"> antygeny uzyskiwane w wyniku hodowli patogennych bakterii szczepionki słabo zdefiniowane wymagają wielu dawek przypominających wzbudzają głównie odpowiedź humoralną wymagają zastosowania adiuwantów
Podjednostkowe	<ul style="list-style-type: none"> zdefiniowany skład brak ryzyka rewersji szczepu do patogenności i zakażenia możliwość zastosowania wielu systemów nośnikowych uproszczona produkcja na skalę przemysłową możliwość kontrolowanej modyfikacji szczepionki 	<ul style="list-style-type: none"> wymagają wielu dawek przypominających wymagają zastosowania adiuwantów

nę przed zakażeniem, należą szczepionki wzbudzające aktywną odpowiedź na antygen. W dziedzinie wakcynologii jednym z najstarszych, tradycyjnych rozwiązań jest stosowanie szczepionek zawierających żywe, często atenuowane szczepy bakteryjne lub składających się z martwych komórek patogenu. Charakteryzuje je duża skuteczność związana z tym, że składają się z wielu różnych komponentów stanowiących elementy komórek bakteryjnych, które wzbudzają odpowiedź układu odpornościowego na wiele antygenów. Mimo skuteczności szczepionki te wzbudzają wiele kontrowersji przede wszystkim dlatego, że potencjalnie niosą ryzyko zakażenia [tabela 1]. Działanie tak może wskutek rewersji atenuowanego szczepu i powrotu do jego patogennej postaci, a także wskutek przypadkowego zakażenia osób trzecich w wyniku niekontrolowanego przeniesienia wirulentnego szczepu. Szczepionki takie nie są także w żadnym stopniu standaryzowane, a w ich skład wchodzi szeroki panel antygenów pochodzących z żywych, osłabionych lub zabitych drobnoustrojów.

Obecnie coraz większą uwagę, a także zaangażowanie badaczy skupia się na szczepionkach podjednostkowych [tabela 1]. Szczepionki te zawierają oczyszczone, immunogenne antygeny wchodzące w skład komórek patogennych mikroorganizmów. Zastosowanie tego typu antygenów nie tylko wyklucza ryzyko zakażenia poszczepionego, ale pozwala także na posługiwanie się dobrze zbadanym i zdefiniowanym preparatem. Zastosowanie go w szczepionce będzie przebiegało w sposób ściśle kontrolowany, minimalizując występowanie działań niepożądanych, które mogą być dużo bardziej niebezpieczne w przypadku użycia całych komórek. Odpowiedź odpornościowa, skierowana przeciwko wyselekcjonowanym antygenom, wchodzącym w skład szczepionki podjednostkowej jest bardzo swoista. Należy jednak zauważyć, że wskutek wykorzystania jedynie jednego z wielu antygenów spada efektywność jego działania [1,19, 25].

Wzbudzenie długotrwałej ochrony wymaga zatem zastosowania kilku dawek przypominających, a także użycia adiuwantów i nośników wspomagających ich transport, ekspozycję i trwałość w warunkach *in vivo* [tabela 1]. Szczepionki podjednostkowe są najczęściej oparte na białkach, peptydach lub polisacharydach, zawierających immunogenne epitopy wzbudzające odpowiedź układu odpornościowego. Znalezienie efektywnego antygeny do szczepionki koniugatowej nie jest proste. Jednym z największych problemów w tej kwestii jest identyfikacja antygeny, który będzie rozpoznawany przez przeciwciała neutralizujące i receptory obecne na powierzchni limfocytów B, a jednocześnie stanowiącego epitop, który w kompleksie z cząsteczkami MHC (Major Histocompatibility Complex) będzie prezentowany limfocytom T. Ponadto duże znaczenie ma także dobranie odpowiedniego nośnika, nie tylko umożliwiającego optymalną prezentację antygeny, lecz także przedłużającego czas jego ekspozycji [20]. Zastosowanie metod biologii molekularnej, technologii rekombinacji DNA, biochemii białek, a także mikrobiologii i immunologii daje coraz lepsze rezultaty w konstrukcji swoistych szczepionek podjednostkowych. Rozwój nowoczesnych technologii sprawił, że poszukiwania antygenów i badania związane z rozwojem wielu chorób zakaźnych zaczęto rozpatrywać na poziomie genomowym i proteomicznym. Tak wyselekcjonowane skład-

niki szczepionek umożliwiają identyfikację czynników zaangażowanych w indukcję odpowiedzi odpornościowej w sposób bezpośredni. Chemiczna synteza antygenów stanowiących sekwencje epitopów peptydowych lub polisacharydowych, izolacja konkretnych frakcji komórkowych drobnoustrojów, a także ekspresja białek wirulentnych szczepów w innych systemach (np. bakteryjnych, wirusowych, zwierzęcych, roślinnych) stanowią podstawę w rozwoju szczepionek podjednostkowych.

ANTYGENY STOSOWANE W SZCZEPIONKACH PODJEDNOSTKOWYCH

W celu uniknięcia immunizacji organizmu całymi drobnoustrojami stosuje się szczepionki podjednostkowe, które zawierają jedynie wybrane antygeny, specyficznie stymulujące układ immunologiczny. Zastosowanie szczepionek podjednostkowych, zawierających jedynie krótki fragment białka, pozwala otrzymać przeciwciała, zdolne do oddziaływania z natywnym białkiem stanowiącym element strukturalny patogennego mikroorganizmu. Niekiedy stosuje się krótkie peptydy, zawierające jedynie miejsce wiązania przeciwciała (epitop) lub receptora, które również mogą wzbudzać odpowiedź immunologiczną na konkretny patogen.

Dzięki temu, że szczepionki podjednostkowe zawierają jedynie wybrane antygeny, skutki niepożądane podawania takiej szczepionki są ograniczone. Szczepionki podjednostkowe mogą zawierać jeden lub więcej antygenów i mogą być pozyskiwane na różne sposoby. Czasem wymaga to hodowli konkretnego szczepu mikroorganizmu oraz izolacji i oczyszczenia wybranego antygeny. Inną metodą jest ekspresja wybranych antygenów w innych niepatogennych i łatwych w hodowli mikroorganizmach. Szczepionki skonstruowane na bazie antygenów pozyskanych tą metodą noszą nazwę rekombinowanych szczepionek podjednostkowych. Jeśli antygenami będą krótkie peptydy, to można otrzymywać je w wyniku syntezy chemicznej [15,27].

Przykładem rekombinowanej szczepionki podjednostkowej jest opracowana w 2009 r. szczepionka przeciwko gorączce Zachodniego Nilu. Choroba ta należy do grupy gorączek krwotocznych, a wywołuje ją jednociowy wirus Zachodniego Nilu (WNV – West Nil Virus) zaliczany do rodzaju *Flavivirus*. Szczepionka została opracowana dzięki ekspresji białka E otoczki wirusa WNV w systemie ekspresyjnym muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*). Rekombinowane białko oczyszczono za pomocą chromatografii powinowactwa z użyciem swoistych przeciwciał monoklonalnych. Oczyszczone białko wraz z adiuwantem GPI-0100 podano małpom *Macaca mulatta*. Efektem szczepienia był zauważalny w surowicy zwierząt wzrost miana swoistych dla białka E przeciwciał. Należy także podkreślić, że u małp, którym po podaniu szczepionki podano żywego wirusa WNV nie zaobserwowano wiremii. Natomiast u małp nieszczepionych po podaniu wirusa występowała wiremia. Tak przygotowana szczepionka gwarantowała 100% skuteczności i chroniła zwierzęta przed rozwojem zakażenia wirusem Zachodniego Nilu [32].

Innym przykładem rekombinowanej szczepionki podjednostkowej jest szczepionka przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B (WZWB). Przed jej opracowaniem stosowana była szcze-

cionka zawierająca cząsteczki wirusa pochodzące z surowicy ludzi zakażonych. Wirus był inaktywowany za pomocą wysokiej temperatury oraz formaldehydu. Pierwszą komercyjnie dostępną szczepionką tego typu była szczepionka „Heptavax” produkowana od 1981 r. przez firmę MERCK & CO. INC, która po 9 latach została wycofana ze sprzedaży i zastąpiona szczepionką rekombinowaną zawierającą jedynie wybrany antygen wirusa WZWB – HbsAg. Była to pierwsza szczepionka wykorzystująca technikę rekombinacji DNA. Geny kodujące antygen HbsAg były ekspresjonowane w drożdżach, dzięki czemu nie było ryzyka zakażenia wirusem WZWB. Szczepionka ta została opracowana w 1982 r., a dwa lata później zbadano jej działanie na szympancach. W 1986 r. została wydana licencja na jej sprzedaż i stosowanie u ludzi [60].

Należy pamiętać, że większość krótkich sekwencji peptydowych oraz niewielkie antygeny nie są w stanie wywołać odpowiedzi immunologicznej. Cząsteczki takie, zwane haptenami, to przeważnie cząsteczki o masie cząsteczkowej mniejszej niż 500 Da [35].

Do wywołania odpowiedzi immunologicznej za pomocą krótkich sekwencji aminokwasowych lub grup cukrowych konieczne jest zatem połączenie ich z większymi cząsteczkami, pełniącymi funkcję nośników. Dopiero tak przygotowane cząsteczki są w stanie wywołać odpowiedź immunologiczną i wytwarzać przeciwciała swoiste dla zastosowanych do immunizacji antygenów. Niektóre antygeny chociaż same mogą wywołać odpowiedź immunologiczną, to po połączeniu z białkiem nośnikowym dają odpowiedź immunologiczną z wyższym mianem przeciwciał oraz gwarantują doskonalszą pamięć immunologiczną [11]. Do zaprojektowania skutecznej szczepionki podjednostkowej należy wybrać odpowiedni antygen lub jego fragment tak, aby wytworzone przez organizm swoiste przeciwciała mogły oddziaływać z natywnymi strukturami mikroorganizmów. W przypadku zastosowania krótkich peptydów bardzo ważny jest nie tylko dobór metody koniugacji, lecz także dobór rodzaju nośnika tak, aby antygen znajdował się w odpowiednim ułożeniu przestrzennym i był dostępny dla oddziaływań z receptorami komórkowymi.

STRATEGIE DOSTARCZANIA ANTYGENÓW DO KOMÓREK PREZENTUJĄCYCH I DOBÓR NOŚNIKÓW DO KONSTRUKCJI SZCZEPIONEK PODJEDNOSTKOWYCH

Systemy dostarczania i transportowania specyficznych antygenów do komórek prezentujących antygeny oparte są na wielu strategiach. Do najważniejszych funkcji systemu dostarczającego antygen należą: a) ułatwienie transportu immunogennej cząsteczki, b) jej ekspozycja komórkom prezentującym antygeny (APC – antigen presenting cells) oraz c) przedłużenie czasu jej półtrwania w organizmie żywym. W szczepionkach podjednostkowych systemy te oparte są najczęściej na zastosowaniu różnego rodzaju cząsteczek organicznych lub nieorganicznych pełniących funkcję nośników lub na systemach ekspresji genów mikroorganizmów chorobotwórczych w drobnoustrojach niepatogennych (wektorowych), które mogą namnażać się w organizmie ludzkim bez ryzyka zakażenia i wystąpienia objawów chorobowych (tzw. rekombinowane szczepionki podjednostkowe).

W dostarczaniu antygenów podjednostkowych do wnętrza komórek zastosowanie znalazły różnego rodzaju systemy bakteryjne i wirusowe. Stan wiedzy w dziedzinie biologii molekularnej i inżynierii genetycznej pozwolił na rozwój nowych atenuowanych szczepów, które są wykorzystywane jako nośniki antygenów pochodzących z drobnoustrojów chorobotwórczych. Odpowiednia manipulacja materiałem genetycznym mikroorganizmów niepatogennych lub atenuowanych pozwala na stworzenie organizmów modyfikowanych (np. bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne, wirusy, drożdże), które będą zdolne do ekspresji odpowiednich białek pełniących funkcję antygenów na powierzchni swoich komórek. Rekombinacyjna technologia DNA umożliwia także ekspresję materiału genetycznego antygenów pochodzących z drobnoustrojów chorobotwórczych z wykorzystaniem komórek organizmów wektorowych. W ten sposób wytwarzane są antygeny wydzielane na zewnątrz ich komórek, w postaci czystych białek, a także białek fuzyjnych, które oprócz fragmentów antygenowych mają np. sekwencje ułatwiające ich oczyszczanie. Jedną z obiecujących szczepionek tego typu jest szczepionka zawierająca antygeny Gag ludzkiego wirusa niedoborów immunologicznych HIV-1 ekspresjonowanego w atenuowanym szczepie *Salmonella enterica* Typhimurium. W badaniach modelowych na myszach wykazano, że doustna immunizacja zwierząt wywołuje odpowiedź limfocytów CD4⁺, wzbudzając oba typy odpowiedzi komórkowej typu Th1 (wytwarzanie IFN- γ i TNF- α) i Th2 (wytwarzanie IL-4 i IL-5), a także odpowiedź humoralną poprzez indukcję wytwarzania przeciwciał klasy IgG1 i IgG2a skierowanych na antygen Gag, wchodzący w skład wirusa HIV-1 [9]. Weinrich i wsp. opracowali szczepionkę fuzyjną przeciwko gruźlicy, która składała się z dwóch antygenów: ESAT-6 i 85B oraz adiuwantu MPL – DDA (monophosphoryl lipid A – dimethyl dioctadecylammonium bromide) i wykazywała bardzo dobre właściwości ochronne na modelu mysim. Szczepionka ta mogłaby być nową, zdefiniowaną i tańszą w produkcji w porównaniu z używaną szczepionką BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) [58].

Szczególnym przypadkiem rekombinowanych szczepionek podjednostkowych są szczepionki DNA, którymi są wektory złożone z DNA plazmidowego pochodzącego z systemu bakteryjnego (np. *E. coli*), kodujące interesujące nas antygeny pod kontrolą silnego promotora wirusowego rozpoznawanego przez organizm gospodarza. Po wstrzyknięciu takiego DNA do organizmu wyższego, dochodzi do natychmiastowej ekspresji antygeny *in situ* oraz wzbudzenia specyficznej odpowiedzi immunologicznej. Shariati Mehr i wsp. skonstruowali szczepionkę DNA, będącą szczepionką fuzyjną trzech antygenów ekspresjonowanych w *E. coli* O157:H7. Stworzyli oni syntetyczny gen *eit*, który był genem fuzyjnym kodującym trzy ważne białka pochodzące z tego mikroorganizmu: *espA* (kodujący białko EspA 120 pozbawione 36 aminokwasów z końca N), *eae* (kodujący konstrukt białka intminy zawierający 282 aminokwasów z końca C oraz *tir* (kodujący fragment białka Tir 103, między resztami 258-361, oddziałujący z intyminą). Transfekcja komórek *E. coli* BL21DE3 wektorem pCI-neo zawierającym gen *eit* pozwoliła na uzyskanie rekombinowanego białka fuzyjnego (rEIT). Wykazano, że domięśniowa immunizacja myszy BALB/c czystym białkiem rEIT, wektorem PCI-neo-EIT, kombinacją wektora i białka bez użycia adiuwantów wzbudza

dza humoralną odpowiedź immunologiczną, przejawiającą się wytwarzaniem przeciwciał anti-rEIT. Wykazano także, że myszy immunizowane tak przygotowanymi szczepionkami wykazywały zdolność do zwalczania patogennych komórek *E. coli* O157:H7. Porównanie obu typów szczepionek pozwoliło stwierdzić, że czyste białko rEIT jest lepszym immunogenem niż szczepionka zawierająca gen *eit* (PCI-neo-EIT). Zauważono, że myszy immunizowane białkiem mają większe stężenie przeciwciał klasy IgG skierowanych przeciwko rEIT oraz szybciej zwalczają patogenne bakterie [51].

Najbardziej obiecującymi cząsteczkami nośnikowymi, w szczególności dla cząsteczek, takich jak polisacharydy i krótkie fragmenty peptydowe, wydają się białka bakteryjne (głównie OMPs – Outer Membrane Proteins) i egzotoksyny (np. TT – Tetanus Toxoid), a także białka eukariotyczne, takie jak albumina bydłęca (BSA - Bovine Serum Albumin), owalbumina (OVA - Ovalbumin), czy hemocyjanina (KLH - Keyhole Limpet Hemocyanin). Stwierdzono, że koniugaty, w skład których wchodzi te białka wzbudzają odpowiedź przeciwko prezentowanym na ich powierzchni antygenom. Jedną z wad tego typu szczepionek koniugatowych jest możliwość wytwarzania przez organizm gospodarza przeciwciał skierowanych przeciwko białkom nośnikowym, zwłaszcza przeciwko sekwencjom homologicznym do sekwencji białek obecnych w organizmie człowieka [30]. W ostatniej dekadzie opracowano prototyp szczepionki przeciwko chłoniakowi limfocytów B. Stwierdzono, że CD20 ma zewnątrzcytoplazmatyczne epitopy, które mogą stanowić cel, zarówno w immunoterapii, jak i produkcji szczepionek przeciwko chłoniakowi typu B [46]. Szczepionkę stanowił koniugat białka KLH i peptydów antygeny CD20. Wykazano, że surowice myszy BALB/c immunizowane tym koniugatem z adiuwantem QS21 wykazują wysoki poziom przeciwciał skierowanych przeciwko swoistym epitopom peptydowym oraz słabsze wiązanie się tych przeciwciał do całego białka CD20. Wykazano także zdolność dopełniacza do zabijania limfocytów B CD20⁺ zależną od przeciwciał oraz sekrecję IL-4 i IFN- γ przez mysie splenocyty.

W ostatnich latach ukazało się także wiele prac na temat zastosowania rozgałęzionych nośników tworzących struktury dendrymerów, do których z łatwością można przyłączyć po kilka cząsteczek antygeny. Stwarza to szansę na dostarczenie do miejsca działania maksymalnej liczby immunogennych cząsteczek. Przykładem takich cząsteczek są dendrymery polilizynowe, do których antygeny wiązane są przez grupy α - i ϵ -aminowe lizyn. Nośniki te znalazły największe zastosowanie w przypadku konstrukcji szczepionek peptydowych. Wykazano, że peptydy zsyntetyzowane na tych nośnikach są bardziej odporne na proteolizę niż peptydy podane w ich wolnej postaci. Ponadto zwiększa się stopień ich rozpoznania przez komórki immunologiczne biorące udział w odpowiedzi odpornościowej. Należy także podkreślić, że cząsteczki rozgałęzionych polilizyn nie wykazują znaczących właściwości immunogennych, wskutek czego nie są wytwarzane wysokie miana niepożądanych przeciwciał skierowanych na nośnik szczepionki [47].

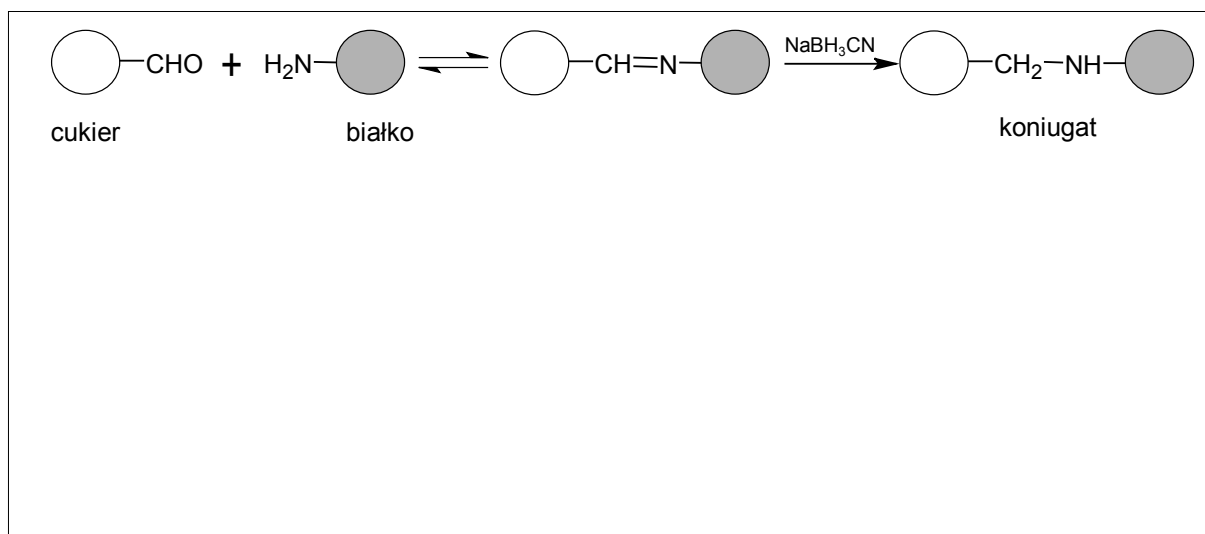
Systemem ułatwiającym dostarczenie immunogenów do komórek prezentujących antygen jest ich koniugacja z przeciwciałami,

wykazującymi powinowactwo do specyficznych markerów obecnych na powierzchni APC (Antigen Presenting Cell), takich jak np. Clec9A. Cząsteczka ta odpowiedzialna jest za aktywację i silną proliferację limfocytów B oraz wytwarzanie przeciwciał. Zastosowanie techniki koniugacji przeciwciał anti-Clec9A z odpowiednimi antygenami, potencjalnie stwarza wielkie możliwości w produkcji szczepionek. Wykazano bowiem, że aktywacja Clec9A wzbudza jednocześnie oba typy odpowiedzi immunologicznej: humoralną (wytwarzanie przeciwciał) i komórkową (aktywacja limfocytów T cytotoksycznych) [6].

Innym systemem ułatwiającym przenoszenie antygenów do wnętrza APC jest ich koniugacja z peptydami wykazującymi zdolność do penetracji błon komórkowych (CPPs – cell-penetrating peptides). Przeprowadzono wiele badań nad peptydami zdolnymi do transportowania przez błony komórkowe innych peptydów, białek, oligonukleotydów, DNA, RNA, a także dużo większych cząsteczek, takich jak liposomy. Zaletą tego typu systemów jest to, że peptydy penetrujące błony cytoplazmatyczne są na tyle małe, że nie powodują indukcji przeciwciał skierowanych przeciwko swoim sekwencjom [4].

Jako odpowiednie nośniki dla małych cząsteczek, wchodzących w skład szczepionek podjednostkowych, rozważane są także cząsteczki samoorganizujące się, najczęściej zbudowane z epitopów peptydowych. Peptydy wykazujące drugorzędową strukturę opartą na α -helisach lub β -karkach wykorzystują oddziaływania niekowalencyjne do tworzenia struktur samoorganizujących się w kształt rurek, włókien i sfer, mogących stanowić podstawę szczepionki. Peptydy samoorganizujące się, poza tym że pełnią funkcję nośników epitopów peptydowych, pełnią także funkcję adiuwantów. Dlatego też użycie ich w szczepionkach nie wymaga stosowania dodatkowych substancji wspomagających odpowiedź immunologiczną [48].

Liposomy, dwuwarstwowe pęcherzyki, złożone z amfipatycznych fosfolipidów są często używane jako cząsteczki transportujące dla wielu różnorodnych substancji aktywnych biologicznie. Wykazują one zdolność transportu antygenów w kierunku specyficznych tkanek, pełniąc przy tym funkcję dobrych adiuwantów wspomagając odpowiedź immunologiczną na różne antygeny bakteryjne i wirusowe. W szczególności są one ciekawymi cząsteczkami transportującymi antygeny w szczepionkach podawanych doustnie lub donosowo, dla których drogą wchłaniania są błony śluzowe. Główną zaletą liposomów jest to, że wydłużają one czas uwalniania antygeny z ich wnętrza, a jednocześnie chronią go przed nadmierną proteolizą i ułatwiają jego wchłanianie przez komórki dendrytyczne. Pęcherzyki liposomowe znalazły szerokie zastosowanie w dostarczaniu białek i peptydów do cytoplazmy komórek dendrytycznych w procesie endocytocyty. Antygeny opłaszczone w endosomach i/lub lizosomach są z nich uwalniane do cytoplazmy komórek dendrytycznych poprzez destabilizację błony dzięki oddziaływaniom hydrofobowym i elektrostatycznym. Watarai i wsp. opracowali specjalny rodzaj lizosomów, które pod wpływem zmian pH na lekko kwaśne wykazują większe zdolności do fuzji z błonami komórkowymi, a tym samym zapewniają lepszy transport antygenów. Za właściwość tę odpowiedzialny jest specjalny



Ryc. 1. Wytworzenie stabilnego wiązania amidowego między grupą karboksylową i pierwszorzędową grupą aminową za pomocą karbodiimidu na przykładzie EDC

polimer wbudowany w ścianę liposomu – bursztynianowany poli(glicydol) (SucPG – succinylated poly(glycidol)). Badacze ci wykazali dużą efektywność liposomów modyfikowanych SucPG zawierających owoalbuminę (OVA) jako antygen. Tak przygotowana szczepionka wykazywała silne właściwości immunogenne, wzbudzając oba typy odpowiedzi immunologicznej humoralną (Th2, wytwarzanie IgG1 oraz IL-4) oraz komórkową (Th1, wytwarzanie IgG2a, IgG3 oraz IFN- γ) [57].

Alternatywą dla organicznych nośników szczepionek mogą być nieorganiczne nanocząsteczki metali szlachetnych, takich jak np. złoto, srebro, kobalt, platyna, a także struktury oparte na tlenku krzemu IV (SiO₂) [37]. Częsteczki te przedostają się do wnętrza komórek w procesie endocytozy, transportując specyficzne antygeny, które dodatkowo są chronione przed proteolizą enzymatyczną i endosomalną. Jedną z największych zalet tego typu nośników jest to, że nie wykazują one właściwości immunogennych, a tym samym nie powodują ryzyka indukcji przeciwciał antynośnikowych. Niestety, wyniki uzyskane przez niektóre grupy badawcze dowodzą toksyczności tego typu nośników. Jedną z metod redukcji ich właściwości cytotoksycznych jest manipulacja ich rozmiarem, a także stopniem wysycenia ich powierzchni [10]. Najbardziej obiecującymi z wyżej wymienionych wydają się te, zbudowane z cząsteczek koloidalnego złota. Nanocząsteczki złota są obojętne dla ustroju, nietoksyczne oraz łatwo mogą być wchłaniane przez komórki dendrytyczne i inne fagocytarne monocyty.

W badaniach *in vitro* limfocytów T wykazano, że pojedyncza komórka może wchłoniąć nawet 10⁴ cząsteczek koloidalnego złota, co znacznie ułatwia dostarczanie oraz manipulowanie ilością antygeny związanego z takim nośnikiem. Nanocząsteczki te mogą być wykorzystywane jako kompleksy z peptydami, połączonymi w wyniku pośredniej koniugacji przez tiole, które mogą być łączone z wykorzystaniem łańcuchów bocznych cystein lub poprzez elektrostatyczne wiązanie peptydów do powierzchni złota. Pozwala to na pokrycie powierzchni koloidalnego złota pojedynczą warstwą peptydów. Metodą zwiększenia pojemności pojedynczej cząsteczki

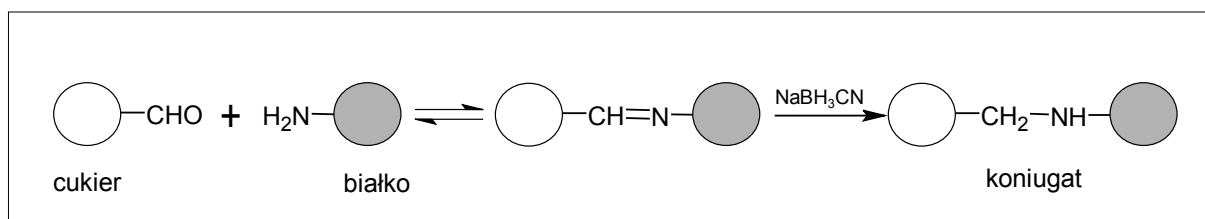
złota jest zastosowanie dodatkowych łączników, takich jak np. 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu (EDC) i sulfo-N-hydroksysukcynimidu (sulfo-NHS). Jest to strategia oparta na tzw. koniugacji „bottom-up” i polega na modyfikacji powierzchni złota z użyciem łącznika, takiego jak glikol polietylenowy (PEG). Stwierdzono także, że zastosowanie PEG daje dużo lepsze rezultaty w stymulacji limfocytów T niż zastosowanie łącznika zbudowanego z DNA [33].

METODY KONIUGACJI

a) bezpośrednie łączenie antygeny z cząsteczkami nośnika

Znanych jest wiele metod koniugacji antygenów z cząsteczkami nośnikowymi, które różnią się od siebie w zależności od antygeny oraz od grup funkcyjnych dostępnych na powierzchni cząsteczki nośnika. Istotną rolę przy wyborze metody koniugacji pełni także orientacja przestrzenna antygeny, będąca rezultatem procesu koniugacji, co ma wpływ na swoistość wytwarzanych przez organizm przeciwciał. Należy pamiętać, że cząsteczka łącząca antygen z nośnikiem może powodować powstawanie przeciwciał skierowanych przeciwko łącznikowi, co może zmniejszyć wydajność szczepienia. Im krótsza jest cząsteczka łącząca, tym mniejsze jest prawdopodobieństwo powstania specyficznych dla niej przeciwciał. Stwierdzono także, że cząsteczki antygeny połączone bezpośrednio z cząsteczkami nośnikowymi wykazują większą immunogenność, niż antygeny połączone z nośnikiem za pomocą linkera [23].

Zastosowanie koniugacji za pomocą imidu pozwala na bezpośrednie połączenie haptenu z cząsteczką nośnika. Mechanizm tego procesu opiera się na reakcji karbodiimidu z grupami karboksylowymi cząsteczek nośnika lub haptenu tworzącymi związki pośredni w postaci O-acyloizomocznika. Tak aktywowana grupa karboksylowa łatwo reaguje z grupami amin pierwszorzędowych tworząc wiązanie amidowe z uwolnieniem rozpuszczalnego związku w postaci pochodnej izomocznika (ryc.1) [17].



Ryc. 2. Reduktywna aminacja - technika koniugacji cukrowych antygenów z białkowym nośnikiem

Ta metoda koniugacji haptenu z nośnikiem jest szybka i stosunkowo prosta. W przypadku peptydów miejsce wiązania jest specyficzne. Wchodzące w reakcję grupy karboksylowe haptenu to najczęściej C-końcowe grupy karboksylowe, a grupy aminowe to najczęściej ε-aminowe grupy lizyny białka nośnikowego. Unika się stosowania peptydów bogatych w aminokwasy kwasowe, takie jak Asp lub Glu, ponieważ miejsce wiązania w tym przypadku jest niespecyficzne, a uzyskane koniugaty mogą zawierać różne warianty konformacyjne tego samego peptydu [7,54]. Podobne reakcje uboczne mogą występować w przypadku innych antygenów bogatych w grupy karboksylowe lub aminowe.

W przypadku antygenów z dużą ilością reszt Lys, Glu lub Asp może dojść do krzyżowego wiązania się haptenu ze sobą. Zjawisko to może okazać się korzystne, ponieważ pewne hapteny po polimeryzacji stają się bardziej immunogenne [1,42], a niektóre z nich, mając taką postać nie wymagają już białka nośnikowego [34]. Zastosowanie karbodiimidu może również powodować precypitację powstałych kompleksów i aby tego uniknąć należy obniżyć stężenie karbodiimidu lub skrócić czas reakcji. Zastosowanie nierozpuszczalnych koniugatów może się jednak okazać korzystniejsze, ponieważ są one bardziej immunogenne niż ich rozpuszczalne odpowiedniki [12,53].

Jednym z najpowszechniej stosowanych karbodiimidów jest EDC (chlorowodorek N-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimidu). Jego głównymi zaletami są dobra rozpuszczalność w wodzie oraz łatwe usuwanie produktu ubocznego reakcji. Często stosowanym karbodiimidem jest CMC (N-cykloheksylo-N'-(2-morfolinoetylo) karbodiimid). Wielu autorów opisuje przykłady koniugacji antygenów białkowych i cukrowych do cząsteczek nośnika z zastosowaniem EDC [5,19,25,29,61]. Jest on wykorzystywany także do otrzymywania immunogennych koniugatów nośników ze steroidami [61]. Ze względu na stosunkowo dużą zawartość grup karboksylowych, metodę koniugacji za pomocą karbodiimidu wykorzystuje się często do koniugacji poli- i oligosacharydów. Niektóre polisacharydy można również łączyć z cząsteczkami białka poprzez grupy aminowe cukrów. Stosuje się tę metodę po uprzedniej hydrolizie polisacharydów, w wyniku której powstają wolne grupy aminowe, mogące oddziaływać z aktywowanymi za pomocą EDC grupami karboksylowymi białka nośnikowego [5]. Do zwiększenia wydajności procesu koniugacji stosuje się N-hydroksylsulfo-sukcynimid. Jest to reakcja dwustopniowa, w której sulfo-NHS dodawany jest po EDC. W wyniku aktywacji grup karboksylowych za pomocą EDC powstaje związek pośredni, O-acylomocznik, który w środowisku wodnym ulega szybkiej hydrolizie, pozostawiając wolną grupę karboksylową,

niereagującą z grupami aminowymi. Natomiast dodanie sulfo-NHS powoduje wytworzenie stabilnego estru sulfo-NHS, który następnie może oddziaływać z grupami aminowymi. Produkt końcowy reakcji jest więc taki sam jak w przypadku zastosowania samego EDC, jednak wydłużony zostaje okres trwania aktywnego związku przejściowego [24].

Ciekawym przykładem zastosowania EDC jest wykorzystanie go do aktywacji grup karboksylowych polimeru PLGA (PLGA - poly(lactide-coglycolide) acid). Tak aktywowane grupy karboksylowe wchodzą w reakcje z grupami aminowymi innego, dodatnio naładowanego polimeru - polietylenoiminy (PEI - polyethyleneimine), tworząc w ten sposób micelle o naładowanej dodatnio powierzchni. Uzyskane cząsteczki stają się bardzo dobrym nośnikiem antygenów, takich jak kwasy nukleinowe czy cytokiny [26,38]. Są również karbodiimidy rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, które można zastosować wtedy, kiedy synteza w środowisku wodnym jest niemożliwa. Należą do nich DIC (N,N'-diizopropylkarbodiimid) oraz DCC (N,N'-dicykloheksylokarbodiimid), który wykorzystywany jest również do syntezy szczepionek [38]. EDC oraz DCC mają szczególne zastosowanie w tworzeniu syntetycznych peptydów [40].

Reduktywna aminacja to powszechnie stosowana technika pozwalająca na koniugację antygenów zawierających w swojej strukturze wolne grupy karbonylowe (ryc. 2). Nadaje się dobrze do koniugacji oligo- i polisacharydów z białkami nośnikowymi, a skutkiem jej jest powstanie stabilnego, kowalencyjnego wiązania między antygenem i nośnikiem. Ponadto, stosując tę technikę można zachować nienaruszoną strukturę rdzenia antygeny cukrowego. Mechanizm reakcji polega na oddziaływaniu grupy karbonylowej cukru oraz grup aminowych białka nośnikowego w środowisku zasadowym, w wyniku czego powstaje zasada Schiffa. Może ona zostać zredukowana w obecności borowodoru sodu lub cyjanoborowodoru sodu (NaBH₃CN) z wytworzeniem nasyconego wiązania pomiędzy atomem węgla cząsteczki cukru i atomem azotu cząsteczki białka (ryc. 2). Celem uzyskania wolnych grup karbonylowych, cząsteczki cukru należy wcześniej poddać oksydacji. Jednym z powszechnie stosowanych czynników utleniających jest nadjodan sodu. Zaletą tej metody jest to, że reakcja zachodzi w roztworze wodnym w łagodnych warunkach, dzięki czemu struktura rdzenia polisacharydu oraz białka pozostaje nienaruszona. Utlenianie za pomocą nadjodanu sodu otwiera pierścienie cukrowe oligo- i polisacharydów z wytworzeniem wolnych grup karbonylowych, co może spowodować zwiększenie ruchliwości cukrów oraz zmiany w ekspozycji epitopów. Co więcej, otwarte pierścienie cukrowe mogą się zamknąć po procesie reduktywnej aminacji, a skutkiem może być zmiana konformacji cukru

i powstanie nowych epitopów [45]. Technika ta, mimo wad, znajduje obecnie zastosowanie w otrzymywaniu szczepionek podjednostkowych zawierających polisacharydy [18,59].

Wykorzystując metodę reduktywnej aminacji uzyskano obecnie stosowaną u ludzi szczepionkę przeciwko pneumokokom, zawierającą polisacharydy powierzchniowe obecne na komórkach pneumokoków połączone z białkiem nośnikowym CRM₁₉₇ (CRM₁₉₇ to nietoksyczny wariant toksyny błoniczej wyizolowanej z *Corynebacterium diphtheriae* strain C7 (β197)) [11].

Techniką alternatywną dla reduktywnej aminacji jest cyjanowanie. Technika ta została szczegółowo opisana w 1996 r. przez Leesa i wsp. [31]. Umożliwia ona otrzymanie immunogennych koniugatów polisacharydów z białkami. Mechanizm reakcji polega na aktywacji grup hydroksylowych cząsteczki cukru za pomocą czynnika cyjanującego np. bromocyjanu (CNBr) lub CDAP (CDAP - 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate), w wyniku czego cząsteczka cukru uzyskuje grupy nitrylowe związane atomem tlenu. Grupy te reagują z grupami aminowymi i sulfhydrylowymi białek z wytworzeniem stabilnego wiązania kowalencyjnego [45]. Wykazano, że aktywowane za pomocą cyjanowania polisacharydy reagują preferencyjnie z lizyną, cysteiną i histydyną, natomiast nie reagują z metioniną, seryną i tyrozyną [50]. Aktywacja grup hydroksylowych za pomocą CNBr wymaga pH \geq 10,5, co może spowodować uszkodzenie polisacharydów wrażliwych na wysokie pH. Z tego powodu często do aktywacji grup hydroksylowych stosuje się CDAP, który wymaga pH 8,0. Badania porównujące immunogenność koniugatów białkowych otrzymanych w wyniku zastosowania tych dwóch czynników aktywujących wykazały większą skuteczność CDAP [25]. Technika ta jest obecnie wykorzystywana do tworzenia szczepionek podjednostkowych zawierających polisacharydy jako antygeny [25,29,50]. Główną zaletą tej metody jest to, że pozwala ona aktywować grupy hydroksylowe pierścieni cukrowych nie wpływając na ich strukturę, co gwarantuje zachowanie natywnych epitopów oligo- i polisacharydów [45].

b) Łączenie antygeny z nośnikiem za pomocą linkera

Znanych jest wiele metod łączenia antygeny z nośnikiem za pomocą linkera. Wiele związków, które zawierają dwie lub więcej aktywnych grup funkcyjnych, przez które mogą wiązać się z wybranymi grupami funkcyjnymi cząsteczek nośnika i antygeny, nazywanych jest linkerami. Takie cząsteczki mogą wiązać antygen z nośnikiem za pomocą wiązań kowalencyjnych. Istniejąca duża różnorodność linkerów spowodowana jest potrzebą łączenia ze sobą różnych grup funkcyjnych. Znany jest podział linkerów na homo- i heterobifunkcyjne. Przykłady linkerów homobifunkcyjnych przedstawia tabela 2 [8,22].

Linkery homobifunkcyjne mają na swoich końcach identyczne grupy, które wiążą cząsteczkę antygeny z nośnikiem poprzez wiązanie do tych samych grup funkcyjnych. Celem zminimalizowania wystąpienia wiązań krzyżowych między cząsteczkami antygeny lub nośnika, linkery homobifunkcyjne muszą być stosowane w jednoetapowej reakcji antygeny z nośnikiem.

Linkery heterobifunkcyjne łączą dwie cząsteczki poprzez wiązanie dwóch różnych grup funkcyjnych. Wybór linkera zależy

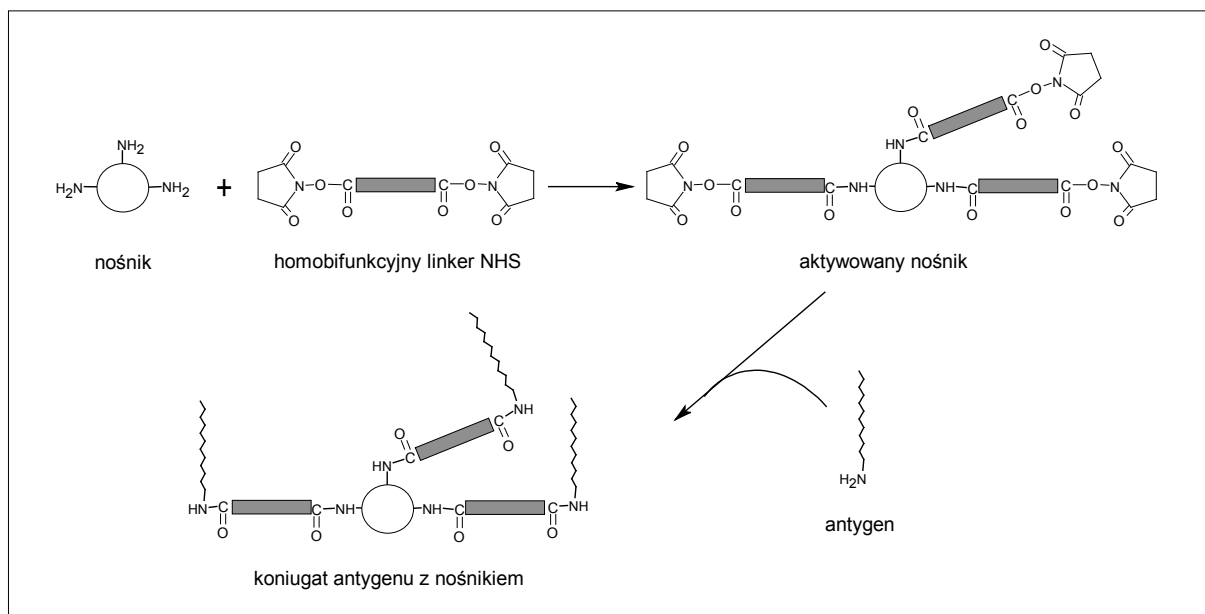
od rodzaju i liczby grup funkcyjnych dostępnych na cząsteczce antygeny oraz nośnika. Należy również pamiętać, że zastosowana technika koniugacji może mieć wpływ na orientację przestrzenną antygeny oraz ekspozycję miejsca wiążącego.

Koniugacja z wykorzystaniem estrów N-hydroksy-sukcynimidu (NHS) jest reakcją, w której uczestniczą grupy aminowe nośnika oraz antygeny. W przypadku linkerów homobifunkcyjnych opiera się na zastosowaniu związku zawierającego grupy NHS przyłączone wiązaniem estrowym na obydwu końcach. Linkery mające na swoich końcach grupy sulfo-NHS są lepiej rozpuszczalne w wodzie od tych mających grupy NHS. Grupy estrowe wysoce reaktywnie wiążą się z aminami obecnymi w białku lub w innych cząsteczkach, wytwarzając stabilne wiązanie. Cząsteczka zawierająca grupy NHS pełni rolę łącznika pomiędzy grupami aminowymi nośnika i grupami aminowymi antygeny (ryc. 3). Długość cząsteczki będącej łącznikiem może być zmienna.

W przypadku występowania w antygenie większej liczby grup aminowych nie można przewidzieć w jakiej orientacji w stosunku do nośnika znajdzie się antygen, co może skutkować zakryciem miejsca wiążącego. Przykładami obecnie stosowanych homobifunkcyjnych estrów NHS są DSG (disuccinimidyl glutarate) [8] oraz DSS (disuccinimidyl suberate) [22]. Cząsteczka łącząca może zamiast grup NHS na końcach zawierać grupy sulfo-NHS, co nadaje jej większą rozpuszczalność w wodzie. Przykładem takiego linkera jest: sulfo-DSS (bis(sulfosuccinimidyl) suberate) [28] i sulfo-EGS (ethylene glycolbis (sulfosuccinimidylsuccinate)) [39]. Niektóre homobifunkcyjne linkery zawierają w swojej strukturze miejsca, które mogą zostać przecięte uwalniając uprzednio połączone cząsteczki oraz odsłaniając nowe grupy funkcyjne. Przykładami takich linkerów, stosowanych w tworzeniu szczepionek są: BSOEES, DSP, DTSSP, DST, EGS i Sulfo-EGS.

Innym użytym sposobem koniugacji jest metoda z wykorzystaniem glutałdehydu, zawierającego na obydwu końcach grupy aldehydowe, które w środowisku alkalicznym wykazują dużą reaktywność z grupami amin pierwszorzędowych (ϵ - i α -aminy) tworząc z nimi związek o strukturze zasady Schiffa (wiązanie podwójne między węglem grupy aldehydowej i azotem grupy aminowej). Wiązanie to jest nietrwałe, dlatego przeprowadza się jego redukcję za pomocą borowodorku sodu (NaBH₄) lub cyjanoborowodorku sodu (NaBH₃CN) w wyniku czego powstaje stabilne wiązanie amidowe.

Glutałdehyd może również reagować z grupami aminowymi nie wytwarzając zasady Schiffa, lecz produkty addycji Michałela. W miarę upływu czasu glutałdehyd w roztworze przechodzi w postać α,β -nienasyconego polimeru i w takiej postaci reaguje z grupami nukleofilowymi, zwłaszcza z grupami amin pierwszorzędowych, tworząc stabilne wiązanie bez konieczności stosowania czynnika redukującego. Ma on również zdolność do reagowania z grupami hydrazydowymi, dzięki czemu może połączyć dwie cząsteczki mające takie grupy poprzez stabilne wiązania hydrazonowe, które nie wymagają redukcji. Można również otrzymać koniugaty połączone grupą hydrazonową i aminową. Koniugacja cząsteczek za pomocą glutałdehydu jest bardzo wydajna. Jednak dokładna struktura powstałych



Ryc. 3. Metoda koniugacji antygeny z nośnikiem poprzez grupy aminowe obu części za pomocą homobifunkcyjnego linkera

Tabela 2. Rodzaje oddziaływań i przykłady linkerów homobifunkcyjnych

Grupa funkcyjna, przez którą chcemy związać antygen i nośnik	Wiążąca grupa funkcyjna będąca częścią linkera	Przykłady homobifunkcyjnych linkerów
Grupa aminowa	estry NHS	BSOCOES, DSG, DSP, DSS, Sulfo-DSS, DST, DTSSP, EGS, Sulfo-EGS, DSC
	imidoestry	DMA, DMP, DMS
	fluorki arylowe	DFDNB, DFDNPS
	grupy aldehydowe	glutaraldehyd, formaldehyd
	fotoreaktywne azydki arylowe	BASED
Grupa sulfydrylowa	maleimid	BMB, B MDB, BMH, BMOE, DTME, TMEA
	siarczek pirydylu	DPDPB
Grupa karboksylowa	hydrazydy	ADH, karbohydrazyd
Grupa karbonylowa		

ADH - adipic acid dihydrazide; **BASED** - bis-[p-(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfide; **BMB** - 1,4-bismaleimidobutane; **B MDB** - 1,4-bismaleimidyl-2,3-dihydroxybutane; **BMH** - bismaleimidoethane; **BMOE** - bismaleimidoethane; **BSOCOES** - bis[2-(succinimidooxycarbonyloxy)ethyl]sulfone; **DFDNB** - 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene; **DFDNPS** - 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrophenylsulfone; **DMA** - dimethyl adipimidate; **DMP** - dimethyl pimelimidate; **DMS** - dimethyl suberimidate; **DPDPB** - 1,4-di-[3'-(2'-pyridyldithio)propionamido]butane; **DSC** - N,N'-disuccinimidyl carbonate; **DSG** - di(N-succinimidyl) glutarate; **DSP** - dithiobis[succinimidyl propionate]; **DSS** - disuccinimidyl suberate; **DST** - disuccinimidyl tartarate; **DTME** - dithiobismaleimidoethane; **DTSSP** - 3,3'-dithiobis (sulfosuccinimidylpropionate); **EGS** - ethylene glycol bis[succinimidylsuccinate]; **Sulfo-DSS** - disulfosuccinimidyl suberate; **Sulfo-EGS** - ethylene glycol bis[sulfosuccinimidylsuccinate]; **TMEA** - tris-(2-maleimidoethyl)amine.

koniugatów jest trudna do określenia. Również proces koniugacji jest trudny do odtworzenia ze względu na różne możliwości łączenia się ze sobą części oraz zróżnicowanie stopnia polimeryzacji glutaraldehydu.

Linkery heterobifunkcyjne zawierają na swoich końcach różne grupy funkcyjne. Związki te umożliwiają przeprowadzanie jedno- lub dwustopniowej koniugacji dwóch części. Dzięki możliwości przeprowadzenia dwustopniowych reakcji można uniknąć zjawiska polimeryzacji oraz wiązania się ze sobą czę-

ści antygeny lub nośnika. Przykłady linkerów heterobifunkcyjnych przedstawiają tabele 3A i B.

Interesującym sposobem koniugacji jest metoda z wykorzystaniem heterobifunkcyjnego linkera z grupą NHS i maleimidem. Bardzo cenne w tworzeniu szczepionek podjednostkowych są związki pozwalające połączyć grupy sulfhydrylowe haptenu z grupami aminowymi części nośnika. Grupy sulfhydrylowe w peptydach znajdują się najczęściej w cysteinie, która występuje w białkach w niewielkich ilościach, dlatego więk-

Tabela. 3A. Rodzaje oddziaływań i przykłady heterobifunkcyjnych linkerów

Grupy funkcyjne łączone poprzez linkery	Wiążące grupy funkcyjne linkera	Przykłady heterobifunkcyjnych linkerów
Grupa sulfhydrylowa i aminowa	grupa tiopirydylowa i ester NHS	SPDP, Sulfo-SPDP
	maleimid i ester NHS	SMCC, Sulfo-SMCC, MBS, Sulfo-MBS, SMPB, Sulfo-SMPB, SMPH, GMBS, Sulfo-GMBS, BMPS, EMCS
	grupa jodoacetylowa i ester NHS	SIA, SIAB, Sulfo-SIAB
	grupa jodoacetylowa i grupa nitrofenolowa	NPiA
	grupa bromoacetylowa i ester NHS	SBA, SBAP
Grupa sulfhydrylowa i grupa karbonylowa	maleimid i grupa hydrazydowa	BMPH, EMCH, MPBH, KMH
	grupa tiopirydylowa i grupa hydrazydowa	PDPH
Grupa sulfhydrylowa i grupa hydroksylowa	maleimid i grupa izocyjanianowa	PMPI

BMPH - N-β-maleimidopropionic acid hydrazide - TFA; **BMPS** - 3-(maleimido)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester; **EMCH** - N-(ε-maleimidocaproic acid) hydrazide; **EMCS** - 6-maleimidohexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester; **GMBS** - γ-maleimidobutyric acid N-succinimidyl ester; **KMH** - N-(κ-maleimidoundecanoic acid)hydrazide; **MBS** - m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester; **MPBH** - 4-(4-N-maleimidophenyl)butyric acid hydrazide • HCl; **NPiA** - p-nitrophenyl iodoacetate; **PDPH** - 3-(2-pyridyldithio)propionyl hydrazide; **PMPI** - N-(p-maleimidophenyl)isocyanate; **SBA** - succinimidyl-bromoacetate; **SBAP** - succinimidyl 3-(bromoacetamido)propionate; **SIA** - N-succinimidyl-iodoacetate; **SIAB** - N-succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate; **SMCC** - succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate; **SMPB** - N-succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrate; **SMPH** - succinimidyl-6-(β-maleimidopropionamido)hexanoate; **SPDP** - 3-(2-pyridyldithio)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester; **Sulfo-GMBS** - sulfo-γ-maleimidobutyric acid N-succinimidyl ester; **Sulfo-MBS** - m-maleimidobenzoyl-3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester; **Sulfo-SIAB** - sulfosuccinimidyl(4-iodoacetyl) aminobenzoate; **Sulfo-SMCC** - sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate; **Sulfo-SMPB** - sulfo-N-succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrate; **Sulfo-SPDP** - 3-(2-pyridyldithio)propionic acid sulfo-N-hydroxysuccinimide ester.

Tabela 3B. Rodzaje oddziaływania i przykłady heterobifunkcyjnych linkerów

Grupy funkcyjne łączone poprzez linkery	Wiążące grupy funkcyjne linkera	Przykłady heterobifunkcyjnych linkerów
Grupa aminowa i grupy nukleofilowe	ester NHS i fotoreaktywny azydek arylowy	NHS-ASA, HSAB, SANPAH, ANB-NOS, SADP, SAED
	grupa p-nitrofenylowa i fotoreaktywna grupa diazowa	PNP-DTP, pNPDP
Grupa sulfhydrylowa i reaktywny atom wodoru	grupa jodoacetylowa i fotoreaktywna grupa ketonowa	4-jodoacetamid benzofenonu
	grupa maleimidowa i fotoreaktywna grupa ketonowa	4-maleimid benzofenonu
Grupy sulfhydrylowe i grupy nukleofilowe	grupa jodoacetylowa i fotoreaktywny azydek arylowy	ASIB
	grupa tiopirydylowa i fotoreaktywny azydek arylowy	APDP
Grupa karbonylowa i grupy nukleofilowe	grupa hydrazydowa i fotoreaktywny azydek arylowy	ABH
Aktywowana przez EDC grupa karboksylowa i grupy nukleofilowe	grupa aminowa i fotoreaktywny azydek arylowy	ASBA
Grupa guanidynowa argininy i grupy nukleofilowe	grupa diketonowa i fotoreaktywny azydek arylowy	APG
Grupa aminowa i DNA	ester NHS i PSORALEN	SPB

ABH - p-azidobenzoyl hydrazide; **ANB-NOS** - N-5-azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimide; **APDP** - N-[4-(p-azidosalicylamido) butyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide; **APG** - p-azidophenyl glyoxal; **ASBA** - 4-(p-azidosalicylamido)butylamine; **ASIB** - 1-(p-azidosalicylamido)-4-(iodoacetamido)butane; **HSAB** - N-hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoate; **NHS-ASA** - N-hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylic acid; **pNPDP** - p-nitrophenyl diazopyruvate; **PNP-DTP** - p-nitrophenyl-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionate; **SADP** - N-succinimidyl(4-azidophenyl)dithio)propionate; **SAED** - sulfosuccinimidyl 2-(7-azido-4-methylcoumarin-3-acetamide)ethyl-,3'-dithiopropionate; **SANPAH** - N-succinimidyl-6-[4'-azido-2'-nitrophenylamino]hexanoate; **SPB** - succinimidyl-[4-(psoralen-8-yloxy)]-butyrate.

szczość krótkich peptydów ma najwyżej jedną cysteinę. Dzięki temu mogą być one łączone z nośnikiem za pomocą linkera w jednakowej orientacji przestrzennej.

W przypadku stosowania jako antygenów krótkich peptydów niezawierających grup sulfhydrylowych, można podczas ich syntezy dodać na jednym z końców cysteinę, dzięki której peptyd będzie mógł związać się z linkerem. Zaletą takiej metody jest to, że peptyd będzie eksponowany na powierzchni nośnika w całości, zawsze w ten sam sposób. Związkami, które umożliwiają połączenie grup sulfhydrylowych z grupami aminowymi są linkery będące estrami NHS i mające w swojej strukturze grupę maleimidową lub tiopirydylową. Reakcja składa się z 2 etapów, co podwyższa wydajność koniugacji oraz pozwala na dobrą kontrolę specyfiki wiązania.

Jednym z najczęściej używanych związków stosowanych do koniugacji grup aminowych i sulfhydrylowych jest sulfo-SMCC (4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt). W pierwszym etapie grupa sulfo-NHS na końcu sulfo-SMCC reaguje z grupami amin pierwszorzędowych na białku nośnikowym. Wynikiem tego jest powstanie wiązania amidowego pomiędzy nośnikiem i cząsteczką łączącą. Produkt reakcji powinien zostać oczyszczony np. przez filtrację żelową w celu usunięcia nieprzereagowanego sulfo-SMCC. Tak powstały związek ma w swojej strukturze grupę maleimidową, które wykazują dużą reaktywność z grupami sulfhydryłowymi. W wyniku reakcji z grupami sulfhydryłowymi antygenów powstaje stabilne wiązanie tioeterowe łączące antygen z linkerem. Innymi stosowanymi linkerami są MBS (3-maleimido-benzoic acid N-hydroxysuccinimide ester) i SMPB (4-(4-maleimidophenyl)butyric acid N-hydroxysuccinimide ester).

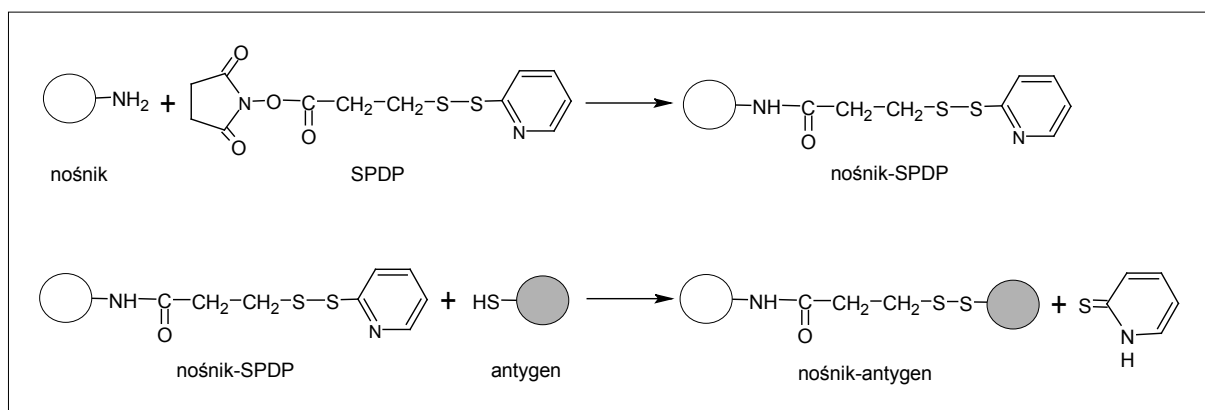
Niemniej jednak zastosowanie sulfo-SMCC jest najkorzystniejsze ze względu na jego dobrą rozpuszczalność oraz stabilność grupy maleimidowej. W przypadku innych MBS i SMPB grupa maleimidowa, w procesie poprzedzającym reakcję z antygenem może ulec hydrolizie do kwasu maleaminowego, który nie reaguje już z grupami sulfhydryłowymi, przez co zmniejsza się wydajność koniugacji. Problemem związanym z wykorzystaniem sulfo-SMCC jest jego duża immunogenność, co skutkuje otrzymaniem przeciwciał specyficznych dla

linkera. Można to rozwiązać stosując jako linker PEG, który zawiera na swoich końcach grupy NHS lub sulfo-NHS oraz grupy maleimidowe [21]. Zaletą zastosowania grup sulfo-NHS (N-hydroxy-sulfosuccinimide) jest zwiększona stabilność aktywnych produktów pośrednich [2].

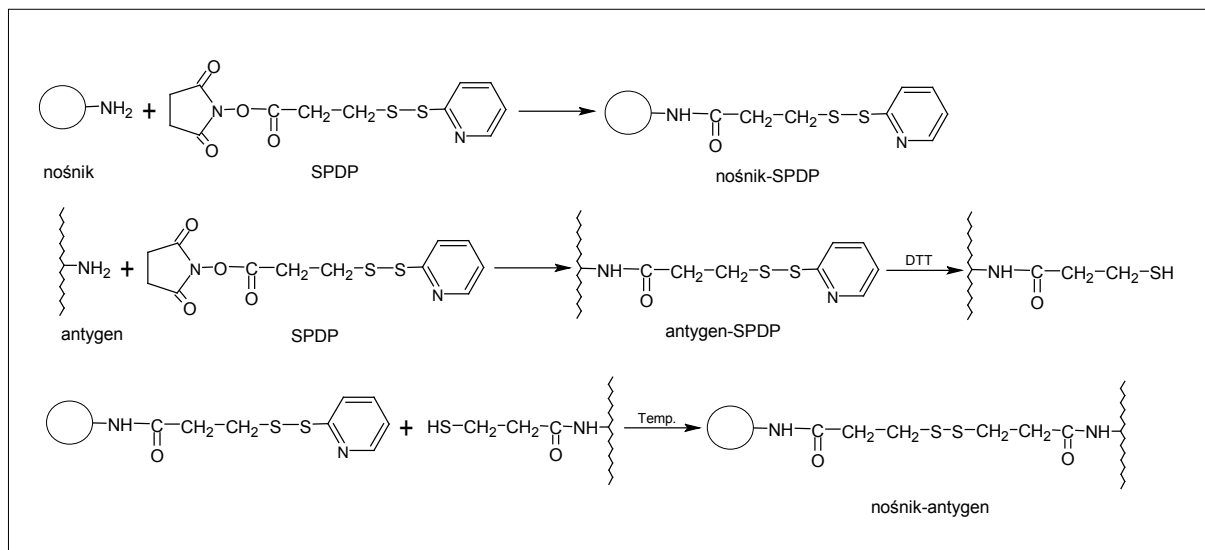
Jako linkery grup aminowych i sulfhydrylowych wykorzystuje się również estry-NHS zawierające na drugim końcu grupę tiopirydylową. Ciekawym przykładem takiego linkera jest ester 3-(2-pirydyloditio)propionowy kwasu N-hydroksybursztynowego (SPDP – 3-(2-pirydyldithio)propionic acid N-hydroxysuccinimide ester). W standardowej procedurze koniugacji za pomocą SPDP inkubowany jest najpierw z cząsteczką nośnika, z którą łączy się poprzez oddziaływanie grupy aminowej z końcem NHS. Następnie w drugim etapie koniugat linkera z nośnikiem inkubowany jest z cząsteczkami antygeny zawierającymi grupy sulfhydrylowe. Do koniugacji dochodzi poprzez oddziaływanie grupy tiopirydylowej linkera z grupą sulfhydrylową antygeny (ryc.4).

Wykorzystując ten sam linker w inny sposób można otrzymać koniugaty połączone ze sobą grupami poprzez grupy aminowe. SPDP jest inkubowany oddzielnie z nośnikiem oraz z antygenem, z którymi łączy się przez ich grupy aminowe. Związek powstały z reakcji antygeny i SPDP poddaje się działaniu ditiotreitolu (DTT) w celu pozbycia się grupy tiopirydylowej z zerwaniem wiązania pomiędzy dwiema siarkami. Następnie do mieszaniny dodaje się nośnik połączony z SPDP, który łatwo wiąże się z wolną siarką linkera połączony z antygenem uwalniając grupę tiopirydylową [19]. Zaletą tej metody jest ograniczenie występowania połączeń nośnika z nośnikiem oraz haptenu z haptentem. Technika ta jest stosowana w produkcji szczepionek podjednostkowych (ryc. 5) [39].

Jako linkery bifunkcyjne używane są związki polietylenoglikolu. Glikol polietylenowy (PEG) jest polieterem, którego monomerem są cząsteczki tlenku etylenu. Komercyjnie dostępne są glikole polietylenowe o różnym stopniu polimeryzacji, co warunkuje ich masę cząsteczkową. Szczególnym zainteresowaniem badaczy pracujących nad tworzeniem szczepionek podjednostkowych cieszą się obecnie bifunkcyjne glikole polietylenowe. W procesie koniugacji antygenów z nośni-



Ryc. 4. Metoda koniugacji grupy sulfhydrylowej i aminowej za pomocą heterobifunkcyjnego linkera – SPDP



Ryc. 5. Wykorzystanie heterobifunkcyjnego linkera – SPDP – do koniugacji 2 grup aminowych

kami dochodzi często do sterycznego osłaniania epitopów przez cząsteczkę nośnika. Obniża to skuteczność szczepionki.

Zastosowanie bifunkcyjnych glikoli polietylenowych jako linkerów pozwala na eliminację tego problemu. Antygen połączony jest z nośnikiem za pomocą długiego linkera – glikolu polietylenowego, przez co nie dochodzi do sterycznego osłaniania antygeny przez nośnik. Zjawisko to zostało opisane w przypadku szczepionki składającej się z polisacharydu pochodzącego z otoczki *Neisseria meningitidis*. Zastosowanie bifunkcyjnego PEGu jako linkera trzykrotnie zwiększyło miano otrzymanych przeciwciał specyficznych dla wchodzącego w skład szczepionki polisacharydu. Dowiedziono również, że PEG zastosowany jako linker obniża immunogenność cząsteczki nośnika, co z kolei ma wpływ na niskie miano wytwarzanych przez organizm przeciwciał antynośnikowych [21]. Dostępnych jest wiele komercyjnych bifunkcyjnych glikoli polietylenowych. Przykładami mogą być oferowane przez firmę Pierce homobifunkcyjne glikole polietylenowe: BM(PEG)₂ i BM(PEG)₃, różniące się długością łańcucha z grupami maleimidowymi na obu końcach. Natomiast SM(PEG)_n również produkowany przez tę firmę, to heterobifunkcyjny PEG o zmiennej długości łańcucha z grupą NHS na jednym końcu oraz grupą maleimidową na drugim. Do heterobifunkcyjnych związków PEG należą także PEG₁₂-SPDP oraz PEG₄-SPDP, zawierające na jednym końcu grupę tiopirydylową, a na drugim imid kwasu N-hydroksybensztynowego (NHS). Te grupy funkcyjne umożliwiają połączenie między grupą sulfhydrylową i grupą aminową lub między dwiema grupami aminowymi.

ADIUWANTY

Szczepionki podjednostkowe zawierają w swoim składzie jedynie wyselekcjonowany zestaw antygenów, co sprawia, że są one wysoce specyficzne, ale także słabiej rozpoznawane przez układ immunologiczny, czyli mniej immunogenne. Mimo że dysponujemy wieloma obiecującymi „kandydata-

mi” na antygeny do szczepionki, takimi jak choćby antygeny zarodźca malarii, to zastosowanie ich w szczepionkach wciąż nie przynosi zadowalających efektów. Jest to głównie związane z tym, że wzbudzana przez nie odpowiedź odpornościowa jest krótkotrwała i skierowana przeciwko wąskiemu spektrum antygenów, co nie może się równać z efektywnością szczepionek składających się z żywych czy atenuowanych drobnoustrojów [3]. W przypadku podawania szczepionek niezwykle ważną rolę odgrywają adiuwanty, czynniki immunostymulujące wspomagające ich transport, ekspozycję i czas półtrwania w warunkach *in vivo*. Dlatego też, wraz z rozwojem nowych technologii związanych z konstruowaniem szczepionek podjednostkowych, obserwuje się ciągły wzrost liczby dostępnych na rynku adiuwantów.

Adiuwanty działają na zasadzie wielu różnych mechanizmów, które w większości przypadków nie zostały w pełni poznane. Pierwszy z nich polega na wspomaganie transportu aktywnej cząsteczki, będącej składnikiem szczepionki do komórek prezentujących antygeny, takich jak makrofagi i komórki dendrytyczne. Do systemów ułatwiających prezentację antygenów zaliczamy żele, emulsje, mikrocząsteczki, pęcherzyki i liposomy. Innym mechanizmem działania adiuwantów jest wzbudzenie niespecyficznej odpowiedzi immunologicznej, która pośrednio wspomaga uruchomienie mechanizmów odpowiedzi nabytej. Adiuwanty te zawierają najczęściej cząsteczki będące fragmentami różnego rodzaju mikroorganizmów, zwanymi molekularnymi wzorcami rozpoznania patogenów (PAMP – patogen associated molecular patterns). Zaliczamy do nich substancje, takie jak np. LPS (lipopolisacharyd), MPL (monofosforylowy lipid A), czy niemetylowane CpG, wchodzące w skład bakteryjnego DNA [1,14,19,41].

Poznanie mechanizmów działania adiuwantów jest bardzo ważnym problemem w rozwoju współczesnej wakcynologii, a badania nad nowoczesnymi i skutecznymi adiuwantami prowadzone są wielokierunkowo. Ze względu na to, że większość z adiuwantów charakteryzuje wysoki stopień

toksyczności, niewiele z nich znalazło zastosowanie i zostało dopuszczonych do stosowania u ludzi. Pierwszym, a zarazem najczęściej stosowanym adiuwantem jest Alum, który w swoim składzie zawiera wodorotlenek lub fosforan glinu. Po raz pierwszy zastosował go w 1926 r. Alexander Glenny w szczepionce opartej o toksoid błonicy. Od tego czasu Alum był długo jedynym adiuwantem stosowanym w szczepionkach przeznaczonych dla ludzi w Stanach Zjednoczonych [16]. Pomimo to, że przez wiele lat mechanizm działania tego adiuwantu nie był znany, był on szeroko stosowany w szczepionkach ze względu na wysoki stopień bezpieczeństwa oraz zdolność do wzbudzania odporności humoralnej.

Niedawno wykazano, że Alum oddziałuje pośrednio z lipidami na powierzchni komórek dendrytycznych, uruchamiając kaskadę sygnałową, która aktywuje limfocyty T CD4⁺ oraz wzbudza humoralną odpowiedź immunologiczną zależną od limfocytów B [16]. Poznanie mechanizmu jego działania nie tylko ułatwi dalsze zastosowanie w nowych szczepionkach, ale także umożliwi jego bardziej racjonalne użycie. Flach i wsp. wykazali, że Alum nie jest uniwersalnym adiuwantem i nie nadaje się do stosowania w szczepionkach, w których niezbędna jest aktywacja limfocytów T pomocniczych i cytotoksycznych. Tym samym powstaje konieczność poszukiwania innych, nowych adiuwantów, które będą spełniać swoją funkcję w szczepionkach przeciwnowotworowych i chroniących przed rozwojem przewlekłych infekcji [16].

W krajach europejskich od 1997 r. zastosowanie znalazł także wodno-oleisty adiuwant MF59, zawierający skwalen. Mechanizm działania MF59 związany jest z jego zdolnością do stymulacji APC oraz zwiększeniem stopnia ekspozycji antygeny w tych komórkach. Stwierdzono, że adiuwant ten stymuluje wytwarzanie chemokin, takich jak CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIB-1 β) i CXCL8 (IL-8), które wspomagają napływ komórek z krwi do tkanek obwodowych [49]. Adiuwant ten wchodził w skład podjednostkowej szczepionki przeciwko grypie (Fluad -produkowanej przez firmę Chiron) i która zawiera 10 mg skwalenu w pojedynczej dawce [44]. Szczepionka ta, podana w wielu milionach dawek wykazała, że zastosowany w niej adiuwant po wprowadzeniu do organizmu człowieka jest bezpieczny i bardzo skuteczny we wzbudzeniu mechanizmów pomocniczych. Co więcej, nie powoduje on nieswoistej indukcji przeciwciał skierowanych przeciwko skwalenowi. Ma to ogromne znaczenie ze względu na to, że skwalen występuje naturalnie w organizmie człowieka. Bezpieczeństwo tego adiuwantu potwierdziły także badania kliniczne z wykorzystaniem innych antygenów pochodzących np. z wirusów wywołujących wirusowe zapalenie wątroby typu B i C, cytomegalii, HIV [13].

Adiuwantem, który również znalazł zastosowanie u ludzi był AS03, który podobnie jak MF59 zawierał w swoim składzie skwalen. Po raz pierwszy użyto go w szczepionce przeciwko wirusowi grypy H5N1, produkowanej przez firmę Glaxo Smith Kline (GSK). W skład adiuwantu MF59 wchodzi skwalen (10,68 mg), DL- α -tokoferol (11,86 mg) oraz polisorbiniin 80 (4,85 mg) [55]. Mechanizm działania tego adiuwantu był badany *in vivo* z zastosowaniem modelu mysiego oraz *ex vivo* na ludzkich liniach komórkowych. Morel i wsp. wykazali, że

wspomaga on aktywność antygeny dzięki indukcji wytwarzania cytokin w miejscu jego wstrzyknięcia oraz w drenujących węzłach chłonnych. Wytwarzanie swoistych cytokin było z kolei związane z napływem do węzłów chłonnych granulocytów oraz monocytów pobudzonych działaniem antygenów. Pobudzanie wytwarzania przeciwciał i cytokin, takich jak CCL2, CCL3, IL-6, CSF3 i CXCL1 było dodatkowo wspomagane dzięki zastosowaniu w jego składzie α -tokoferolu [41].

W publikacjach z 2009 r. pojawiają się informacje o zastosowaniu adiuwantu AS04, będącego kombinacją wodorotlenku glinu i MPL. Został on użyty w szczepionkach przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (HBV – human hepatitis B virus) oraz ludzkiemu wirusowi brodawczaka (HPV – human papilloma virus) [43,56]. Badania przeprowadzone na myszach i ludzkich liniach komórkowych wykazały, że dodanie MPL do soli glinu powoduje natychmiastową aktywację komórek prezentujących antygeny oraz indukcję wytwarzania cytokin w odpowiedzi na podany antygen. Adiuwant ten pobudza czynnik jądrowy NF- κ B oraz wytwarzanie cytokin, a w następnej kolejności nagromadzenie się komórek dendrytycznych, monocytów i innych APC w węzłach chłonnych oraz ich transport do miejsca wstrzyknięcia i swoistą odpowiedź limfocytów T. Nie wykazano stymulacji limfocytów T CD4⁺ ani limfocytów B po podaniu AS04. Wykazano zatem, że AS04 stymuluje mechanizmy odpowiedzi wrodzonej, dzięki zawartości MPL, którego działanie jest wspomagane i przedłużane dzięki zastosowaniu soli glinu [14].

W przypadku szczepionek podjednostkowych użycie adiuwantów ma szczególne znaczenie. Substancje te wspomagają odpowiedź immunologiczną, umożliwiają zmniejszenie dawki antygeny, a także ich skuteczną aplikację przez błony śluzowe oraz poprawienie ich aktywności u dzieci, osób starszych i osób obarczonych defektami lub niedoborami immunologicznymi. Droga od substancji znajdujących się w fazie badań laboratoryjnych do aktywnych i bezpiecznych adiuwantów, które mogą stanowić patentowane produkty farmakologiczne, jest niezwykle długa, trudna i kosztowna. Niemniej jednak w piśmiennictwie naukowym ostatnich lat można znaleźć wiele informacji dotyczących substancji, które mogą pełnić rolę potencjalnych adiuwantów. Najwięcej uwagi poświęca się na zbadanie molekularnych mechanizmów działania adiuwantów, umożliwiających ich właściwe zastosowanie i uzyskanie pożądanej odpowiedzi immunologicznej.

Adiuwanty o optymalnej skuteczności wzbudzają odpowiedź odpornościową dzięki aktywacji limfocytów B, zależną od limfocytów T, a także pobudzają mechanizmy odpowiedzi wrodzonej oraz komórki dendrytyczne i monocyty, które przekształcają się w immunostymulujące komórki prezentujące antygeny. Adiuwanty opisane wyżej nie wykazują zbyt dużej toksyczności i działań niepożądanych, a tym samym zostały dopuszczone do użytku w konstrukcji szczepionek dla ludzi. Ich liczba nie jest imponująca, jednocześnie nie są one adiuwantami uniwersalnymi, mogącymi tworzyć kompatybilne mieszaniny ze wszystkimi antygenami. Niemniej jednak prowadzone są prace nad wieloma różnymi adiuwantami, które znajdują się na etapie badań laboratoryjnych, a niektóre w fazie badań klinicznych.

PISMIENICTWO

- [1] Anderson P.W., Pichichero M.E., Stein E.C., Porcelli S., Betts R.F., Conruck D.M., Korones D., Insel R.A., Zahradnik J.M., Eby R.: Effect of oligosaccharide chain length, exposed terminal group, and hapten loading on the antibody response of human adults and infants to vaccines consisting of *Haemophilus influenzae* type b capsular antigen unitermally coupled to the diphtheria protein CRM197. *J. Immunol.*, 1989; 142: 2464-2468
- [2] Bartczak D., Kanaras A.G.: Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/sulfo-NHS coupling. *Langmuir*, 2011; 27: 10119-10123
- [3] Bell B.A., Wood J.F., Bansal R., Ragab H., Cargo J.3rd, Washington M.A., Wood C.L., Ware L.A., Ockenhouse C.F., Yadava A.: Process development for the production of an *E. coli* produced clinical grade recombinant malaria vaccine for *Plasmodium vivax*. *Vaccine*, 2009; 27: 1448-1453
- [4] Brooks N.A., Pouniotis D.S., Tang C.K., Apostolopoulos V., Pietersz G.A.: Cellpenetrating peptides: application in vaccine delivery. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1805: 25-34
- [5] Cabrera O., Cuello M., Soto, C.R., Martínez M.E., Del Campo J.M., Pérez O., Infante J.F., Sierra G.: New method for obtaining conjugated vaccines. *Vaccine*, 2006; 24, Suppl. 2: 76-78
- [6] Caminschi I., Shortman K.: Boosting antibody responses by targeting antigens to dendritic cells. *Trends Immunol.*, 2012; 33: 71-77
- [7] Carter J.M.: Conjugation of peptides to carrier protein via carbodiimide. W: *The Protein Protocols Handbook*, red.: J.M. Walker. Humana Press, Totowa, New Jersey 1996, 693-694
- [8] Chiang T.R., Fanget L., Gregory R., Tang Y., Ardiet D.L., Gao L., Meschter C., Kozikowski A.P., Buelow R., Vuist W.M.: Anti-Gal antibodies in humans and 1,3- α -galactosyl-transferase knockout mice. *Transplantation*, 2000; 69: 2593-2600
- [9] Chinombe N., Bourn W.R., Williamson A.L., Shephard E.G.: Oral vaccination with a recombinant *Salmonella* vaccine vector provokes systemic HIV-1 subtype C Gag-specific CD4+ Th1 and Th2 cell immune responses in mice. *Viol. J.*, 2009; 6: 87
- [10] Cho W.S., Dart K., Nowakowska D.J., Zheng X., Donaldson K., Howie S.E.: Adjuvanticity and toxicity of cobalt oxide nanoparticles as an alternative vaccine adjuvant. *Nanomedicine*, 2012; 7: 1495-1505
- [11] De Roux A., Schmoele-Thoma B., Siber G.R., Hackell J.G., Kuhnke A., Ahlers N., Baker S.A., Razmpour A., Emrini E.A., Fernsten P.D., Gruber W.C., Lockhart S., Burkhardt O., Welte T., Lode H.M.: Comparison of pneumococcal conjugate polysaccharide and free polysaccharide vaccines in elderly adults: conjugate vaccine elicits improved antibacterial immune responses and immunological memory. *Clin. Infect. Dis.*, 2008; 46: 1015-1023
- [12] De Veer M., Kemp J., Chatelier J., Elhay M.J., Meeusen E.N.: The kinetics of soluble and particulate antigen trafficking in the afferent lymph, and its modulation by aluminum-based adjuvant. *Vaccine*, 2010; 28: 6597-6602
- [13] Del Giudice G., Fragapane E., Bugarini R., Hora M., Henriksson T., Palla E., O'hagan D., Donnelly J., Rappuoli R., Podda A.: Vaccines with the MF59 adjuvant do not stimulate antibody responses against squalene. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2006; 13:1010-1013
- [14] Didierlaurent A.M., Morel S., Lockman L., Giannini S.L., Bisteau M., Carlsen H., Kielland A., Vosters O., Vanderheyde N., Schiavetti F., Larocque D., Van Mechelen M., Garçon N.: AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J. Immunol.*, 2009; 183: 6186-6197
- [15] El-Faham A., Subirós Funosas R., Prohens R., Albericio F.: COMU: a safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents. *Chemistry*, 2009; 15: 9404-9416
- [16] Flach T.L., Ng G., Hari A., Desrosiers M.D., Zhang P., Ward S.M., Seamone M.E., Vilaysane A., Mucsi A.D., Fong Y., Prenner E., Ling C.C., Tschopp J., Muruve D.A., Amrein M.W., Shi Y.: Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat. Med.*, 2011; 17: 479-487
- [17] Grabarek Z., Gergely J.: Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal. Biochem.*, 1990; 185: 131-135
- [18] Gudlavalleti S.K., Lee C.H., Norris S.E., Paul-Satyaseela M., Vann W.F., Frasch C.E.: Comparison of *Neisseria meningitidis* serogroup W135 polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines made by periodate activation of O-acetylated, non-O-acetylated and chemically de-O-acetylated polysaccharide. *Vaccine*, 2007; 25: 7972-7980
- [19] Gupta R.K., Egan W., Bryla D.A., Robbins J. B., Szu S.C.: Comparative immunogenicity of conjugates composed of *Escherichia coli* O111 O-specific polysaccharide, prepared by treatment with acetic acid or hydrazine, bound to tetanus toxoid by two synthetic schemes. *Infect. Immun.*, 1995; 63: 2805-2810
- [20] Hansson M., Nygren P.A., Ståhl S.: Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2000; 32: 95-107
- [21] Huang Q., Li D., Kang A., An W., Fan B., Ma X., Ma G., Su Z., Hu T.: PEG as a spacer arm markedly increases the immunogenicity of meningococcal group Y polysaccharide conjugate vaccine. *J. Controlled Release*, 2013; 172: 382-389
- [22] Ichihashi T., Yoshida R., Sugimoto C., Takada A., Kajino K.: Cross-protective peptide vaccine against influenza A viruses developed in HLA-A*2402 human immunity model. *PLoS One*, 2011; 6: e24626
- [23] Jacques I., Dubray G.: *Escherichia hermannii* (ATCC 33651) polysaccharide-protein conjugates: comparison of two conjugation methods for the induction of humoral responses in mice. *Vaccine*, 1991; 9: 559-563
- [24] Jennings G.T., Bachmann M.F.: The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biol. Chem.*, 2008; 389: 521-536
- [25] Jin Z., Chu C., Robbins J.B., Schneerson R.: Preparation and characterization of group a meningococcal capsular polysaccharide conjugates and evaluation of their immunogenicity in mice. *Infect. Immun.*, 2003; 71: 5115-5120
- [26] Kasturi S.P., Sachaphibulkij K., Roy K.: Covalent conjugation of polyethyleneimine on biodegradable microparticles for delivery of plasmid DNA vaccines. *Biomaterials*, 2005; 26: 6375-6385
- [27] Kiso Y., Yajima H.: Amide formation, deprotonation, and disulfide formation in peptide synthesis. W: *Peptides: Synthesis, Structure and Applications*, red.: Gutte B. Academic Press, San Diego, California 1995, 46-47
- [28] Koller D., Ittner L.M., Muff R., Husmann K., Fischer J.A., Born W.: Selective inactivation of adrenomedullin over calcitonin gene-related peptide receptor function by the deletion of amino acids 14-20 of the mouse calcitonin-like receptor. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 20387-20391
- [29] Kossaczka Z., Shiloach J., Johnson V., Taylor D.N., Finkelstein A.R., Robbins J.B., Szu S.C.: *Vibrio cholerae* O139 conjugate vaccines: synthesis and immunogenicity of *V. cholerae* O139 capsular polysaccharide conjugates with recombinant diphtheria toxin mutant in mice. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 5037-5043
- [30] Kubler-Kielb J., Majadly F., Biesova Z., Mocca C.P., Guo C., Nussenzweig R., Nussenzweig V., Mishra S., Wu Y., Miller L.H., Keith J.M., Liu T.Y., Robbins J.B., Schneerson R.: A bicomponent *Plasmodium falciparum* investigational vaccine composed of protein-peptide conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 1172-1177
- [31] Lees A., Nelson, Mond J.J.: Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. *Vaccine*, 1996; 14: 190-198

- [32] Lieberman M.M., Nerurkar V.R., Luo H., Cropp B., Carrion R., De la Garza M., Collier B.A., Clements D., Ogata S., Wong T., Martyak T., Weks-Levy C.: Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant subunit West Nile virus vaccine in rhesus monkeys. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2009; 16: 1332-1337
- [33] Lin A.Y., Lunsford J., Bear A.S., Young J.K., Eckels P., Luo L., Foster A.E., Drezek R.A.: High-density sub-100-nm peptide-gold nanoparticle complexes improve vaccine presentation by dendritic cells in vitro. *Nanoscale Res. Lett.*, 2013; 8: 72
- [34] Lise D., Dubeaux C., Tello D., Mazier D., Jolivet M., Schlesinger D.H., Audibert F., Chedid L.: Construction of immunogens for synthetic malaria vaccines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988; 153: 31-38
- [35] Liu Z.Q., Yang P.C.: Hapten may play an important role in food allergen-related intestinal immune inflammation. *N. Am. J. Med. Sci.*, 2011; 3: 103-106
- [36] Luciani F., Bull R.A., Lloyd A.R.: Next generation deep sequencing and vaccine design: today and tomorrow. *Trends Biotechnol.*, 2012; 30: 443-452
- [37] Mahapatro A., Singh D.K.: Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnology*, 2011; 9: 55
- [38] Mishra D., Kangb H.C., Baeb Y.H.: Reconstitutable charged polymeric (PLGA)2-b-PEI micelles for gene therapeutics delivery. *Biomaterials*, 2011; 32: 3845-3854
- [39] Miyata T., Harakuni T., Tsuboi T., Sattabongkot J., Ikehara A., Tachibana M., Torii M., Matsuzaki G., Arakawa T.: Tricomponent immunopotentiating system as a novel molecular design strategy for malaria vaccine development. *Infect. Immun.*, 2011; 79: 4260-4275
- [40] Montalbetti C.A., Falque V.: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron Lett.*, 2005; 61: 10827-10852
- [41] Morel S., Didierlaurent A., Bourguignon P., Delhaye S., Baras B., Jacob V., Planty C., Elouahabi A., Harvengt P., Carlsen H., Kielland A., Chomez P., Garçon N., Van Mechelen M.: Adjuvant system AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine*, 2011; 29: 2461-2473
- [42] Peeters C.C., Tenbergen-Meekes A.M., Evenberg D.E., Poolman J.T., Zegers B.J., Rijkers G.T.: A comparative study of the immunogenicity of pneumococcal type 4 polysaccharide and oligosaccharide tetanus toxoid conjugates in adult mice. *J. Immunol.*, 1991; 146: 4308-4314
- [43] Petäjä T., Keränen H., Karppa T., Kawa A., Lantela S., Siitari-Mattila M., Levänen H., Tocklin T., Godeaux O., Lehtinen M., Dubin G.: Immunogenicity and safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine in healthy boys aged 10-18 years. *J. Adolesc. Health.*, 2009; 44: 33-40
- [44] Podda A.: The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine*, 2001; 19: 2673-2680
- [45] Poolman J., Frasch C., Nurkka A., Kayhty H., Biemans R., Schuerman L.: Impact of the conjugation method on the immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19F polysaccharide in conjugate vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011; 18: 327-336
- [46] Roberts W.K., Livingston P.O., Agus D.B., Pinilla-Ibarz J., Zelenetz A., Scheinberg D.A.: Vaccination with CD20 peptides induces a biologically active, specific immune response in mice. *Blood*, 2002; 99: 3748-3755
- [47] Romestand B., Rolland J.L., Commeyras A., Coussot G., Desvignes I., Pascal R., Vandenabeele-Trambouze O.: Dendri graft poly-L-lysine: a non-immunogenic synthetic carrier for antibody production. *Biomacromolecules*, 2010; 11: 1169-1173
- [48] Rudra J.S., Tian Y.F., Jung J.P., Collier J.H.: A self-assembling peptide acting as an immune adjuvant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 622-627
- [49] Seubert A., Monaci E., Pizza M., O'Hagan D.T., Wack A.: The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *J. Immunol.*, 2008; 180: 5402-5412
- [50] Shafer D.E., Toll B., Schuman R.F., Nelson B.L., Mond J.J., Lees A.: Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides. *Vaccine*, 2000; 18: 1273-1281
- [51] Shariati Mehr K., Mousavi S.L., Rasooli I., Amani J., Rajabi M.: A DNA vaccine against *Escherichia coli* O157:H7. *Iran Biomed. J.*, 2012; 16: 133-139
- [52] Sow S.O., Tapia M.D., Diallo S., Keita M.M., Sylla M., Onwuchekwa U., Pasetti M.F., Kotloff K.L., Levine M.M.: Haemophilus influenzae type B conjugate vaccine introduction in Mali: impact on disease burden and serologic correlate of protection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2009; 80: 1033-1038
- [53] Storni T., Kündig T.M., Senti G., Johansen P.: Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2005; 57: 333-355
- [54] Timkovich R.: Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. *Anal. Biochem.*, 1977; 79: 135-143
- [55] Treanor J.J., Campbell J.D., Zangwill K.M., Rowe T., Wolff M.: Safety and immunogenicity of an inactivated swine influenza A (H5N1) vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2006; 354: 1343-1351
- [56] Vanacker A., Vandewiele I., Verbanck J., Schepkens H., De Schoenmakere G., De Laere E., Maes B.: Transiently positive hepatitis B surface antigen after vaccination with the new hepatitis B vaccine HBV-AS04. *Am. J. Kidney Dis.*, 2008; 52: 1028-1029
- [57] Watarai S., Iwase T., Tajima T., Yuba E., Kono K.: Efficiency of pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a vaccine carrier. *Scientific World Journal*, 2013; 2013: 903234
- [58] Weinrich Olsen A., van Pinxteren L.A., Meng Okkels L., Birk Rasmussen P., Andersen P.: Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and esat-6. *Infect. Immun.*, 2001; 69: 2773-2778
- [59] Wessels M.R., Paoletti L.C., Guttormsen H.K., Michon F., D'Ambra A.J., Kasper D.L.: Structural properties of group B *Streptococcal* type III polysaccharide conjugate vaccines that influence immunogenicity and efficacy. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 2186-2192
- [60] Zanetti A.R., Van Damme P., Shouval D.: Vaccination against hepatitis B: a historical overview. *Hot Topics Viral Hepatitis*, 2007; 5: 7-12
- [61] Zhang Y., He F., Wan Y., Meng M., Xu J., Yi J., Wang Y., Feng C., Wang S., Xi R.: Generation of anti-trenbolone monoclonal antibody and establishment of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of trenbolone in animal tissues, feed and urine. *Talanta*, 2011; 83: 732-737

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.