

# Nowe podejścia w dziedzinie otrzymywania i stosowania szczepionek

*Józef Kapusta*

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polska Akademia Nauk

Poznań

## 1. Wstęp

Szczepienia ochronne są najbardziej efektywną interwencją medyczną zapobiegającą masowym niegdyś chorobom infekcyjnym. Najbardziej spektakularnym przykładem obrazującym skuteczność szczepień ochronnych jest całkowite, globalne wyeliminowanie ospy prawdziwej. Bardzo efektywna okazała się też szczepionka przeciwko polio. Zakrojone na szeroką skalę szczepienia przeciwko tej chorobie, przy użyciu szczepionki zawierającej atenuowane szczepy wirusa, są bliskie całkowitego sukcesu. Usunięcie tej choroby z populacji ludzkiej spodziewane jest na początku przyszłego wieku.

Osiągnięcia w dziedzinie immunologii i biologii molekularnej, a szczególnie w zakresie metod rekombinowania DNA i biochemii białek, zaowocowały opracowaniem nowych technologii szczepionkowych, tj. szczepionek podjednostkowych oraz szczepionek zawierających fragmenty materiału genetycznego patogena. Szczepionki podjednostkowe zawierają oczyszczone preparaty rozmaitych antygenów, względnie kombinacje różnych epitopów bądź antygenów, które są w stanie indukować bardziej precyzyjną odpowiedź immunologiczną. Otrzymuje się je obecnie głównie na bazie zrekombinowanych wirusów, bakterii lub drożdży. Od niedawna szczepionki podjednostkowe próbuje się otrzymywać również w roślinach. W przypadku tzw. szczepionek genetycznych, ich zasadniczym składnikiem jest fragment DNA kodujący antygen. Przykładem szczepionki podjednostkowej, jest otrzymana w drożdżach na drodze rekombinacji genetycznej szczepionka przeciwko HBV. Przeszło dziesięcioletnie stosowanie tej szczepionki przyczyniło się w znaczącym stopniu do ograniczenia zarówno zakażeń wewnątrzszpitalnych, jak również zakażeń w obrębie grup podwyższonego ryzyka.

Niestety wiele spośród nawet wysoce oczyszczonych antygenów, stosowanych w prototypowych szczepionkach podjednostkowych, wykazuje ograniczone właściwości immunogenne, w porównaniu do takiego samego antygeny



w „natywnym układzie infekcyjnym”. Okoliczność ta zmusza do szukania nowych, niekonwencjonalnych sposobów indukcji odpowiedzi immunologicznej, nowych adiuwantów i takiego zestawu antygenów, który naśladowałby efekt immunologiczny, wzbudzany przez infekcję (1).

Obecnie szczególne zainteresowanie budzi potrzeba wywołania efektywnej odpowiedzi limfocytów T i indukcji odpowiedzi typu komórkowego, nie zaś jedynie zwiększenie ilości wytwarzanych przeciwciał w odpowiedzi humoralnej. Odpowiedź typu komórkowego, jako reakcja układu odpornościowego na infekcje wirusowe, zapewnia eliminację patogena poprzez usunięcie zainfekowanych komórek.

W poszukiwaniach szczepionki przeciwko HIV stosuje się wiele rozmaitych strategii. Nie ulega obecnie wątpliwości, że nieodzowne jest wzbudzenie odpowiedzi T-cytotoksycznej, nie zaś jedynie wytwarzanie przeciwciał neutralizujących wirusa (22). O ile bowiem szczepionka przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B indukująca u zaszczepionych przede wszystkim odpowiedź typu humoralnego, jak się okazało była skutecznym remedium na to groźne schorzenie, o tyle produkcja przeciwciał przeciwko różnym składnikom HIV okazała się *in vivo* zawodna. Postuluje się zatem, że szczepionka przeciwko AIDS powinna zawierać niezbędne składniki indukujące odpowiedź typu komórkowego nakierowaną na rozpoznanie i eliminację komórek zainfekowanych wirusem. Uważa się, że szczepionka taka, oprócz ochrony przed infekcją wirusem HIV osób nie zainfekowanych, powinna stymulować eliminację patogena u nosicieli.

Godny odnotowania postęp nastąpił od początku lat dziewięćdziesiątych w takich dziedzinach związanych z wytwarzaniem szczepionek jak zastosowanie nowych, skuteczniejszych adiuwantów, badanie strukturalnych pochodnych antygenów oraz poszukiwanie nowych sposobów dostarczania antygenów do komórek docelowych. W przyszłości, jak się wydaje, szczepionki będą poliwalentne tzn. w pojedynczej dawce zawarty będzie szeroki wachlarz antygenów pochodzących od różnych organizmów chorobotwórczych. Można się spodziewać, że dzięki wykorzystaniu nowych adiuwantów będzie można indukować pożądaną profil odpowiedzi immunologicznej również wówczas, kiedy szczepionki podawane będą w sposób możliwie najmniej inwazyjny, a przede wszystkim bezbolesny, jak inhalacja lub aplikacja doustna.

## 2. Adiuwanty

Adiuwanty są ważnymi, dodatkowymi składnikami szczepionek, które stymulują odpowiedź immunologiczną. Liczba prób klinicznych z wykorzystaniem różnorodnych adiuwantów rośnie w ostatnim okresie w postępie geometrycznym, pomimo że działanie niektórych adiuwantów nie jest w pełni poznane. Z tego względu, jedynie dane eksperymentalne użycia adiuwantów w doświadczeniach z układem modelowym, stanowią podstawę oceny stopnia ich efektywności. Jakkolwiek chemiczne związanie adiuwanta z antygenem jest możliwe i niejednokrotnie praktykowane, zasadniczą funkcją adiuwanta



nie jest bycie nośnikiem dla antygeny, lecz niezależna od antygeny stymulacja różnego rodzaju aktywności immunologicznych, co prowadzi do silnej reakcji immunologicznej na podany antygen (2). Oczekuje się, że adiuwanty powinny stymulować zarówno odpowiedź humoralną tzn. produkcję specyficznych przeciwciał, jak i komórkową w tym również odpowiedź z udziałem limfocytów cytotoksycznych T (CTL) co stanowi istotę nowej wizji szczepionek, niezależnie od technologii ich wytwarzania, czy sposobu aplikowania.

Szczepionki podjednostkowe oraz podjednostkowe zrekombinowane, jak się wydaje, indukują wybitnie specyficzną odpowiedź immunologiczną. Ich efektywność (czyli stopień immunogenności) zależy w znacznej mierze od zastosowanego adiuwantu. Ogólnie efektywność szczepionek podjednostkowych podawanych z odpowiednimi adiuwantami drogą standardową tzn. domięśniowo lub podskórną, jest na ogół odpowiednia. Podawanie jednakże szczepionek podjednostkowych poprzez błony śluzowe, stanowi z uwagi na konieczność użycia zasadniczo innych adiuwantów, nowy jakościowo problem.

Duże zainteresowanie szczepionkami podawanymi poprzez błony śluzowe, doustnie lub wziewnie, stworzyło potrzebę znalezienia efektywnych adiuwantów, właściwych do tego sposobu immunizacji. Specyfiką odpowiedzi immunologicznej indukowanej w obrębie błon śluzowych jest zahamowanie zespołu reakcji warunkujących stan zapalny. Efektywnej stymulacji błon śluzowych przez czynnik patogenny towarzyszy reakcja immunologiczna zarówno humoralna jak i typu komórkowego. Przy czym obserwuje się reakcje nie tylko w obszarze stymulacji immunologicznej, lecz w obrębie wszystkich błon śluzowych organizmu, a także odpowiedź systemiczną, ogólnoustrojową. Do najsilniejszych mediatorów odpowiedzi immunologicznej stymulowanej przez błony śluzowe zalicza się podjednostka B toksyny cholery (CT-B) oraz termolabilna enterotoksyna z *Escherichia coli* (3).

Jako adiuwanty wykorzystuje się również naturalne cząsteczki występujące w układzie immunologicznym, takie jak interleukina 12 (IL-12). Jest to cytokina, która wykazuje właściwość modulowania komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej. W szczególności indukuje ona INT-gamma pochodzący z komórek NK i T oraz stymuluje rozwój komórek T-pomocniczych typu 1 (4). IL-12 moduluje typ odpowiedzi immunologicznej zależnie od sposobu podania szczepionki. Podanie szczepionki donosowo stymuluje odpowiedź zależną od komórek pomocniczych T typu I (Th1), zaś doustnie podanie szczepionki wraz z CT-B indukuje odpowiedź sterowaną przez komórki pomocnicze T typu 2 (Th2) (38).

Ciekawą grupę naturalnych adiuwantów, które, są w stanie modulować odpowiedź immunologiczną w wyniku podawania szczepionki drogą pokarmową, stanowią niektóre bakterie fermentacji mleka. Wykazano, że bakterie takie jak *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* oraz *Bifidobacterium bifidum* i *Bifidobacterium infantis*, nie tylko stanowią ważny element homeostazy flory bakteryjnej, co w sposób nie specyficzny podnosi odporność na infekcję patogenicznymi szczepami bakterii, ale także bakterie te spełniają rolę adiuwantu stymulującego odpowiedź w zakresie produkcji sekretorycznych przeciwciał IgA i odpowiedź komórkową (42-43).



Nową kategorię adiuwantów stanowią syntetyczne oligonukleotydy, zawierające sekwencje uznane za immunostymulujące (6). Są one chemicznie podłączane do antygenów i powodują aktywację limfocytów B i stymulację produkcji INF-gamma i IL-12. W badaniach nad immunogennością niektórych antygenów wykazano, że podczas gdy jedne antygeny zawierają epitop dla określonych receptorów na limfocytach B lub T, inne nie zawierają takich sygnałów przez co ich immunogenność jest ograniczona. Dzięki wykorzystaniu techniki rekombinacji można zwiększyć immunogenność antygenów i wywoływać pożądaną reakcję immunologiczną poprzez przyłączenie do antygenów określonych fragmentów białkowych, które dostarczają sygnał odbierany przez receptory limfocytów B i/lub T (44).

### 3. Szczepionki oparte na DNA

Szereg szczepionek opartych na DNA jest aktualnie w różnych fazach badań laboratoryjnych na zwierzętach bądź na etapie prób klinicznych. Szczepionki DNA, zwane także szczepionkami genetycznymi, dostarczają do komórek materiał genetyczny, kodujący cząsteczki białkowe antygenów pod kontrolą odpowiednio dobranych sekwencji regulatorowych zapewniających efektywną ekspresję w komórkach szczepionego organizmu. Ekspresja obcego DNA podanego do komórek skóry techniką mikrowstrzeliwania lub iniekcją domięśniową prowadzi do wytworzenia odpowiednich białek antygenowych, które stawiają system immunologiczny w stan gotowości przed inwazją patogena, podobnie, jak ma to miejsce w wyniku aplikowania białka antygenowego. Niewątpliwie, wartą podkreślenia, powszechną właściwością szczepionek opartych na DNA, jest ich wysoka trwałość, a zwłaszcza termostabilność (20). Termostabilność, a także przewidywany niski koszt produkcji tego typu szczepionek stanowi ważne *novum* w technologii przygotowywania szczepionek.

Szczepionka oparta na DNA kodującym glikoproteinę wirusa wścieklizny bardzo skutecznie zapobiegła zachorowaniu grupy małp, zarażonych wirusem wścieklizny. Poziom przeciwciał, jak się okazało, był nawet wyższy niż po podaniu tradycyjnej szczepionki opartej na białku wirusa. Niebagatelną zaletą omawianej szczepionki jest niewspółmiernie niski koszt produkcji. W warunkach amerykańskich zaszczepienie osoby tradycyjną szczepionką przeciwko wściekliznie kosztuje 400 USD, podczas gdy szczepionką DNA, jedynie 5-10 centów. Wielce zachęcające wyniki uzyskano także w badaniach klinicznych na ochotnikach szczepionki typu DNA przeciw malarii (23), a także w badaniach na zwierzętach laboratoryjnych przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (39) wirusowi opryszczki (HSV) (40) i szeregu chorobom zwierząt (41).

Opracowuje się również system doustnego podania szczepionki DNA, otoczonej kapsułą liposomową zapobiegającą szybkiej degradacji w przewodzie pokarmowym. Tego typu szczepionka, zawierająca DNA rotawirusa, była pomyslnie przetestowana przez badaczy z Massachusetts (21).



Badania nad eksperymentalnymi modelami dostarczyły bardzo interesujących wyników dotyczących charakteru odpowiedzi immunologicznej i stopnia immunogenności szczepionek opartych na DNA (5). W wielu przypadkach szczepionka wywoływała intensywną odpowiedź limfocytów T cytotoksycznych. Konstrukty oparte na glikoproteinie otoczkowej wirusa HIV indukowały powstanie specyficznych neutralizujących przeciwciał u myszy i małych człokształtnych, całkowicie chroniąc te zwierzęta przed infekcją HIV oraz SIV (wirus niedoboru immunologicznego małp) (5).

Jedną z domniemyanych przyczyn wysokiej efektywności szczepionek opartych na DNA, jak się wydaje, jest bakteryjne pochodzenie owego DNA, co prawdopodobnie powoduje efekt immunostymulacji.

Jednym ze skutków ubocznych szczepionek opartych na białkach jest powstawanie w przypadku niektórych antygenów przeciwciał klasy IgE, które stanowią podstawowy element w procesie rozwoju nadwrażliwości i powstawania odczynów alergicznych. Okazuje się, że poprzez zaszczepienie najpierw szczepionką typu DNA, który koduje określone białko, a następnie immunizacja szczepionką w której białko jest składnikiem szczepionki, wyeliminować można reakcję alergiczną jako rezultat podawania białka jako szczepionki (6). Przymuszalnie ekspresja w komórce białka, które jest syntetyzowane na matrycy obcego nawet DNA, stanowi swoisty sygnał „autoryzacji” tego produktu translacji jako własnego składnika.

#### 4. Skład szczepionek

Jednym z czynników, które ograniczają zakres stosowania natywnych białek jako szczepionek jest ograniczona stabilność niektórych z nich i wynikająca stąd niezdolność indukcji przeciwciał neutralizujących. Labilność struktury można czasami przezwyciężyć stosując, w krytycznym fragmencie łańcucha białkowego odwrócenie kierunku wiązań peptydowych. Zmodyfikowane w ten sposób białko immunodominującego epitopu VP1 białka otoczki wirusa choroby stóp i ust FMDV wykazywało silne właściwości immunogenne (7). Wyższa immunogenność zmodyfikowanego w taki sposób peptydu wynika prawdopodobnie stąd, że wiele epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała jest zlokalizowanych w pętlach i skrętach białek.

Białka, które naśladują strukturę niektórych silnie immunogennych polisacharydów patogenicznych bakterii, wykazują właściwości wywołania odpowiedzi immunologicznej przeciwko patogenom posiadającym te sacharydy. Stosując ciekawe rozwiązanie selekcji białek z biblioteki fagowej udało się znaleźć polipeptyd indukujący przeciwciała przeciwko polisacharydowemu O-antygenowi *Schigella flexneri* (8).

Innym przykładem modyfikacji natywnego białka antygenowego którego rezultatem jest pożądaný efekt immunologiczny, nie uzyskiwany w przypadku użycia białka nie modyfikowanego, jest dołączenie reszt lipidowych. Przekształcone w ten sposób antygeny są w stanie indukować bardziej efektywną reakcję immunologiczną, pobudzając komórki T-cytotoksyczne. Tego rodzaju efekt po-



kazano na przykładzie modyfikacji białka otoczki HIV-1 (9). Rezultat ten uzyskano przypuszczalnie dzięki wzmacniającemu efektowi antygenowemu struktur lipidowych oraz łatwiejszemu przenikaniu lipoproteiny przez błonę komórkową.

Innym podejściem jest zastosowanie syntetycznych białkowych nośników szczepionek. Nośniki te zawierają epitopy rozpoznawane przez limfocyty B i T, co ułatwia prezentację antygenów (10). Obiecującym systemem do doustnego czy dowaginalnego podania antygeny jest otoczka liposomowa. Jednakże efektywność wychwytywania tak opłaszczonego antygeny przez kępki Peyera oraz wytworzenie IgA pozostaje nadal problemem wymagającym dopracowania. Stwierdzono, że dołączenie do liposomów zrekombinowanej podjednostki toksyny cholery wiążącej gangliozyd komórek nabłonkowych jelita, znacznie zwiększa efektywność odpowiedzi (18).

Silne właściwości immunogenne wykazała u myszy szczepionka chimeryczna, oparta na zmodyfikowanej, nietoksycznej egzotoksynie *Pseudomonas*, do której został przyłączony niewielki odcinek glikoproteiny gp120 wirusa HIV-1. Egzotoksyna potęgowała odpowiedź immunologiczną w obrębie śluzówki na dołączony do niej antygen (25).

## 5. Strategie kierowania szczepionki

Wiadomo, że droga, poprzez którą antygen dostarczany jest do organizmu, ma istotny wpływ na ilościową i jakościową charakterystykę odpowiedzi immunologicznej. Istnieje szereg sposobów pozwalających przedłużyć działanie szczepionki powodując w rezultacie zwiększenie efektywności jej działania.

### 5.1. Mikrosfery PLGA

Za idealną szczepionkę uważa się taką, która wywołuje długotrwałą ochronę po pojedynczej aplikacji. Dlatego od kilku lat opracowuje się szczepionkę opartą na mikrosferach, tj. cząstkach średnicy ok. 100 nm zbudowanych z ulegającej biodegradacji mieszaniny polimerów kwasów mlekowego i glikolowego (PLGA). Po jednorazowej aplikacji mikrosfery przez pewien okres (od 1 do 6 miesięcy) uwalniane są do otoczenia zawarte w nich cząsteczki, np. antygeny szczepionkowe. Wykazano ponadto, że cząstki o tym rozmiarze pobierane są preferencyjnie przez kępki Peyera co stanowi istotny etap w odpowiedzi immunologicznej na dojelitowo podany antygen (19). Po jednorazowym podaniu szczepionki zamkniętej w mikrosferze, u immunizowanych w ten sposób myszy uzyskano odporność na malarię przez 1 rok. Niedogodnością tej metody jest potencjalna niestabilność zawartych antygenów lub przeciwciał w trakcie dość drastycznego procesu enkapsulacji (12).

### 5.2. Nośniki i bioadhezyjne polimery

Indukcja odpowiedzi immunologicznej w obrębie śluzówki odgrywa ważną rolę w profilaktyce chorób dróg oddechowych, przewodu pokarmowego oraz



układu moczowo-płciowego. Antygeny mogą być kierowane do połączonej ze śluzówką organów limfatycznych za pomocą metody opartej na wykorzystaniu szczególnego rodzaju nośników, a także bioadhezywnych polimerów, takich jak chitosan (kationowy polisacharyd pochodzący z małży, owadów, grzybów, etc). Przewód pokarmowy oraz górne odcinki układu oddechowego, jak się wydaje, są najbardziej dogodnymi obiektami do indukcji śluzówkowej odpowiedzi immunologicznej (24).

### 5.3. Wirusy i bakterie jako wektory szczepionek

Zrekombinowane cząsteczki wirusów: ospy wietrznej, opryszczki, krowianki oraz adenowirusa zawierające epitopy obcych antygenów, stanowią efektywny naturalny wektor. Cząsteczki te rozpoznawane są przez komórki T-cytotoksyczne i wykazują silny potencjał indukowania odpowiedzi humoralnej oraz typu komórkowego w rozlicznych systemach eksperymentalnych (11,45). Reakcja immunologiczna skierowana jest zarówno przeciwko prezentowanemu antygenowi jak i przeciwko wektorowi, czyli wirusowi.

W porównaniu do wakcynacji systemicznej, naturalna infekcja przez śluzówkę indukuje zazwyczaj silny i długotrwały efekt odpowiedzi immunologicznej. Dlatego należy zauważyć, że pierwsze szczepionki, które zazwyczaj zawierały zabite lub osłabione na skutek licznych pasażów zarazki, cechowały się bardzo wysoką skutecznością. Obecnie w dalszym ciągu pracuje się nad wyjaśnieniem mechanizmów działania systemu immunologicznego wobec osłabionych patogenów w celu ustalenia optymalnych warunków zaszczepienia, a także żeby zapobiec ewentualnym skutkom poronnym (26). Również bakterie, jak się okazało, były skutecznym nośnikiem szczepionek. Atenuowane bakterie (także za pomocą metod inżynierii genetycznej), takie jak *Salmonella*, BCG lub krztusiec, które infekują błony śluzowe układu pokarmowego lub drogi oddechowe, wykorzystano jako wektory, skutecznie dostarczające przez śluzówkę nosa wybrane antygeny, np. antygen *Schistosoma mansoni*. Po pojedynczej donosowej infekcji bakteriami zrekombinowanymi w podany sposób, uzyskano ochronę nie tylko przed *S. mansoni*, ale również przed bakterią-wektorem. (14). Takie podejście ma wiele zalet. Atenuowane bakterie są stabilne i odporne na warunki panujące w błonie śluzowej, efektywnie przekraczają barierę nabłonkową układów: trawiennego, oddechowego oraz płciowego. Wykazują aktywność doskonałych adiuwantów. Są wydajnie wychwytywane przez komórki prezentujące antygen i przeżywają w organach do których są kierowane przez kilka tygodni, co powoduje długotrwałą stymulację antygenem. Takiego rodzaju nośniki mogą jednocześnie ekspozycjonować kilka antygenów i samoorganizować się w cząstki podobne do wirusowych, co udokumentowano w przypadku wirusów brodawczaka (HPV — *Human Papilloma Virus*) i *Hepatitis B*. Ponadto koszt produkcji szczepionek takiego typu okazuje się względnie niski (15).



#### 5.4. Wewnątrzkomórkowa ekspresja przeciwciał

Ekspresja w wyniku transformacji genetycznej przeciwciał w komórkach, które nie są naturalnym miejscem ich biosyntezy, może stanowić jedną ze strategii mającą na celu zahamowanie wewnątrz tych komórek funkcji niektórych cząsteczek. Wewnątrzkomórkowo wytworzone przeciwciała zaopatrzone w odpowiednią determinantę skierowaną przeciwko określonym produktom metabolizmu pozwalają zmodyfikować funkcję tych komórek. Zastosowanie tego wyrafinowanego podejścia pozwoliło na zablokowanie szeregu antygenów, co stanowiło cel techniki terapii genowej. Czynnikiem ograniczającym zakres stosowania tej technologii jest nieprzewidywalny los przeciwciał, gdy są one wytwarzane wewnątrz komórki. Należy brać pod uwagę takie aspekty jak: typ „foldingu”, okres półtrwałości białka w komórce, zdolność tolerowania przez strukturę białka braku wiązań dwusiarczkowych, które bywają eliminowane przez redukujące środowisko cytozolu, powinowactwo, precyzyjność wewnątrzkomórkowego celowania białka oraz jego funkcje efektorowe. Ponadto należy brać pod uwagę możliwość tworzenia agregatów na drodze tzw. *off-pathway*, gdy ilość wytwarzanego białka przekracza pewien poziom równowagi. W przeprowadzonych niedawno badaniach w układzie ekspresyjnym *Escherichia coli* pokazano, że wprowadzenie do odcinka DNA kodującego przeciwciała precyzyjnie dobranych mutacji jest w stanie ograniczyć niepożądane zachowania wytwarzanych przeciwciał (16).

#### 5.5. Zależności między różnymi drogami podawania antygeny

Odpowiedzi immunologiczne: śluzówkowa oraz systemiczna, mogą funkcjonować praktycznie niezależnie jedna od drugiej, reagując osobno, w zależności od tego, na jakiej drodze — przez śluzówkę czy parenteralnie, podany jest antygen. W niektórych jednak przypadkach antygen, aplikowany w jeden sposób może modyfikować odpowiedź na immunizację za pomocą innej metody. Podane uprzednio myszom na drodze pokarmowej skrobiowe mikrocząstki zawierające ludzką albuminę osocza (HSA) opłaszczone 3-(trietoksylilo)-propylo-terminowanym polidimetylosiloksanem (TS-PDMS) stymulując śluzówkowy system immunologiczny znacząco zwiększają poziom specyficznych przeciwciał, wytworzonych po następującym po nim podskórnym podaniu antygeny (17).

### 6. Immunizacja drogą pokarmową

Doustna droga immunizacji jest najdogodniejsza, ze względu na nieinwazyjny i bezbolesny sposób podania szczepionki, a także z uwagi na wysoką efektywność odpowiedzi immunologicznej na antygeny pokarmowe zarówno w obrębie śluzówki jelita, jak i ogólnoustrojową.

Na przykładzie ureazy uzyskanej technikami rekombinacyjnymi z *Helicobacter pylori* pokazano, że enzym ten podany na drodze pokarmowej powo-



duje ochronę myszy przed infekcją spokrewnioną bakterią *Helicobacter felis* (27). Również doustne podanie zrekombinowanego wektora wirusowego kro- wianki zawierającego białko powierzchniowe wirusa HIV lub beta-galaktozy- dazę powodowało powstanie u myszy specyficznej odpowiedzi śluzówkowej i systemicznej zarówno na antygeny wektora, jak i insertu (28).

W celu zmniejszenia stopnia degradacji antygeny podczas jego penetracji drogą pokarmową zastosowano otoczkowanie antygeny za pomocą bioadhe- zywnych, degradujących mikrocząstek skrobiowych, które zawierały element wzmacniający penetrację — alfa-lizofosfatydylocholinę (31).

Niektóre leki oraz szczepionki, które od wielu lat są na rynku, próbuje się ulepszyć, zmieniając drogę ich podania na doustną, co wyeliminuje uciąż- liwe codzienne iniekcje oraz może przynieść dodatkowe korzyści w postaci zwiększenia efektywności odpowiedzi immunologicznej. Takie próby, zresztą bardzo skuteczne, podjęto w przypadku leku Copaxone (lub Cop1) do zwal- czania choroby autoimmunologicznej zwanej stwardnieniem rozsianym (32).

Od kilku lat prowadzone są na świecie prace nad wytworzeniem roślin- nych szczepionek jadalnych (33,34). Szczepionki oparte na roślinach trans- genicznych są szczególnie atrakcyjne z uwagi na spodziewane niskie koszty ich produkowania.

Podjęcie badań w zakresie problematyki roślinnych szczepionek jadalnych możliwe było dzięki opracowaniu efektywnych metod transformacji roślin użyt- kowych (głównie dwuliściennych), a także dzięki zidentyfikowaniu wysoce immunogennych epitopów białek wirusowych oraz antygenów mikroorgani- zmów chorobotwórczych ludzi i zwierząt. Rośliny wyższe są ze względów eko- nomicznych, dobrą alternatywą wobec technologii otrzymywania polipepty- dów i białek antygenowych w bioreaktorach. Białka powstające w komórce roślinnej na matrycy egzogennej DNA mają identyczny skład aminokwasów, ulegają podobnym modyfikacjom i wykazują analogiczne właściwości jak te pojawiające się w procesach patogenezy w organizmie gospodarza (35).

Pierwsze próby opracowania szczepionek pochodzenia roślinnego podjęto w pracowni C. Arntzena (33). Dostarczyły one zachęcających wyników. Wy- kazano, że w tytoniu, w którym zachodziła ekspresja antygeny powierzch- niowego (HBsAg) wirusa zapalenia wątroby typu B, dochodziło do wytwarza- nia sferycznych cząstek antygenowych, podobnych do cząstek obecnych we krwi osób będących nosicielami wirusa lub cząstek, które otrzymuje się ze zrekombinowanych drożdży, służących obecnie do produkcji szczepionki na skalę przemysłową (rHBsAg).

Na Uniwersytecie Thomasha Jeffersona w Filadelfii uzyskano transgeni- czne rośliny pomidora, w których obecne było białko powierzchniowe wirusa wścieklizny (35). W laboratorium tym opracowano oparty na zrekombinowa- nych wirusach roślinnych wydajny układ produkcji w roślinach krótkich polipeptydów o charakterze antygenowym (36). Wykazano, że produkowana za pomocą roślinnego wirusa glikoproteina wirusa wścieklizny, którą podano myszą na drodze pokarmowej, charakteryzuje się zdolnością ochrony zwie- rząt przed zachorowaniem po doświadczalnym zakażeniu zjadliwą formą tego patogena (46).



Pierwszą próbą badania efektywności szczepionek produkowanych w roślinach w odniesieniu do ludzi wykonano w roku 1998 w USA. Kilku ochotnikom podano do zjedzenia surowe transgeniczne bulwy ziemniaka produkujące enterotoksynę *Escherichia coli*. Stwierdzono, że u osób immunizowanych w ten sposób zdołano zaindukować powstawanie zarówno przeciwciał IgA, wydzielanych do światła jelita, jak i przeciwciał klasy IgG obecnych we krwi (29).

W Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN prowadzone są badania nad ekspresją w roślinach jadalnych antygenów wirusów chorobotwórczych (37). W wyniku tych prac otrzymano transgeniczne linie kalusa łubinu oraz transgeniczną sałatę, w których zachodziła ekspresja immunogennego białka powierzchniowego HBV. Przeprowadzone eksperymenty na zwierzętach doświadczalnych, a następnie na kilku ochotnikach, potwierdziły skuteczność zastosowania transgenicznych tkanek roślinnych do immunizacji na drodze pokarmowej (37). Zarówno w krwi zwierząt doświadczalnych, jak i ludzi, wykazano obecność specyficznych przeciwciał anti-HBs, co świadczy o wywołaniu swojej odpowiedzi immunologicznej. U części osób spożywających transgeniczną sałatę zawierającą antygen powierzchniowy HBs stwierdzono, że poziom przeciwciał anti-HBs osiągnął wartość powyżej 10 UI/ml, co według standardu WHO uznawane jest za zabezpieczające przed zachorowaniem na wirusowe zapalenie wątroby typu B.

Według niektórych prognoz rekombinowane szczepionki produkowane w roślinach mogą w nieodległej przyszłości stanowić główne narzędzie profilaktyki, przede wszystkim dla biednych krajów strefy tropikalnej o słabej infrastrukturze medycznej. Szczepionki te bowiem mogą być produkowane i dystrybuowane lokalnie stosownie do miejscowych potrzeb. Antygeny szczepionkowe różnych patogenów mogą zostać wprowadzone do właściwych dla danego regionu geograficznego roślin jadalnych. Zgodnie z ogólną tendencją do opracowywania szczepionek poliwalentnych, adresowanych przeciwko różnym chorobom, również szczepionki otrzymywane w roślinach mogą mieć taki charakter.

## Literatura

1. Plotkin S., (1996), *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 15, 391-394.
2. O'Hagan D. T., (1998), *J. Pharmacol.*, 50, 1-10.
3. Berquist C., Lagergard T., Holmgren J., (1998), *APMIS*, 106, 800-806.
4. Puddu P., Fantuzzi L., Borghi P., Varano B., Rainaldi G., Guillemard E., Malorni W., Nicaise P., Wolf S. F., Belardelli F., Gessani S., (1997), *J. Immunol.*, 159, 3490-3497.
5. Liu M. A., Fu T. M., Donnelly J. J., Caulfield M. J., Ulmer J. B., (1998), *Adv. Exp. Med. Biol.*, 452, 187-191.
6. Raz E., Tighe H., Sato Y., Corr M., Dudler J. A., Roman M., Swain S. L., Spiegelberg H. L., Carson D. A., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5141-5145.
7. Briand J. P., Benkirane N., Guichard G., Newman J. F., van Regenmortel M. H., Brown F., Muller S., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12545-12550.
8. Phalipon A., Folgori A., Arondel J., Sgaramella G., Fortugno P., Cortese R., Sansonetti P. J., Felici F., (1997), *Eur. J. Immunol.*, 27, 2620-2625.



9. Sauzet J.P., Deprez B., Martinon F., Guillet J.G., Gras-Masse H., Gomard E., (1995), *Vaccine*, 14, 1339-1345.
10. Svenson S. B., Lindberg A. A., (1979), *J. Immunol. Methods*, 25, 323-335.
11. Sedlik C., Saron M. F., Sarraseca J., Casal I., Leclerc C., (1997), *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7503-7508.
12. Cleland J. L., (1998), *Biotechnol. Prog.*, 14, 102-107.
13. Perkus M. E., Tartaglia J., Paoletti E., (1995), *J. Leukocyte Biol.*, 58, 1-13.
14. Mielcarek N., Cornette J., Schach A. M., et al., (1997), *Infect. Immunol.*, 65, 544-550.
15. Davis H. L., Whalen R. G., (1995), *Mol. Cell. Hum. Dis. Ser.*, 5, 368-387.
16. Cattaneo, A., Biocca, S., (1999), *TIBTECH*, 17, 115-121.
17. Heritage P. L., Underdown B. J., Brook M. A., McDermott M. R., (1998), *Vaccine*, 16, 2010-2017.
18. Harokopakis E., Hajshengallis, G., Michalek, S. M., (1998), *Infect. Immun.*, 66, 4299-4304.
19. Desai M. P. Labhasetwar V., Amidon G. L., Levy R. J., (1996), *Pharm. Res.*, 13, 1838-1845.
20. Lodmell D. L., Ray N. B., Parnell M. J., Ewalt L. C., Hanlon C. A., Sanderlin D. S., Rupprecht C. E., (1998), *Nat. Med.*, 4, 949-952.
21. Chen S. C., Jones D. H., Fynan E. F., Farrar G. H., Clegg J. C., Greenberg H. B., Herrmann J. E., (1998), *J. Virol.*, 72, 5757-5761.
22. Baltimore D., Heilman C., (1998), *Sci. Am.*, 279, 98-103.
23. Martin T., Parker S. E., Hedstrom R., Le T., Hoffman S. L., Norman J., Hobart P., Lew D., (1999), *Hum. Gene Ther.*, 10, 759-768.
24. Aspden T. J., Mason J. D., Jones N. S., Lowe J., Skaugrud O., Illum L. J., (1997), *Pharm. Sci.*, 86, 509-513.
25. Mrsny R. J., Daugherty A. L., Fryling C. M., FitzGerald D. J., (1999), *Vaccine*, 17, 1425-1433.
26. Kyd J. M., Cripps A. W., (1999), *Vaccine*, 17, 1775-1781.
27. Myers G. A., Ermak T. H., Georgakopoulos K., Ingrassia J., Gray, H., Kleanthous H., Lee C. K., Monath T. P., (1999), *Vaccine*, 17, 1394-1403.
28. Gherardi M. M., Esteban M., (1999), *Vaccine*, 17, 1074-1083.
29. Tacket C. O., Mason H. S., Losonsky G., Clements J. D., Levine M. M., Arntzen C. J., (1988), *Nat. Med.*, 4, 607-609.
30. Lehner T., Wang Y., Ping L., Bergmeier L., Mitchell E., Cranage M., Hall G., Dennis M., Cook N., Doyle C., Jones I., (1999), *J. Infect. Dis.*, 179, 489-492.
31. Montgomery P. C., Ralferty D. E., (1998), *Oral Microbiol. Immunol*, 13, 139-149.
32. Teitelbaum D., Arnon R., Sela M., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3842-3847.
33. Mason H. S., Arntzen C. J., (1995), *Trends in Biotech.*, 13, 388-392.
34. Haq T. A., Mason H. S., Clements J. D., Arntzen C. J., (1995), *Science*, 268, 714-716.
35. Thanavala, Y., Yang, Y.-F., Lyons, P., Mason, H. S., Arntzen C., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 3358-3361.
36. Yusibov V., Modelska A., Steplewski K., Agandjanyan M., Weiner D., Hooper D. C., Koprowski H., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 5784-5788.
37. Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M., Pniewski T., Lettelier M., Lisova O., Yusibov V., Koprowski H., Plucienniczak A., Legocki A. B., (1999), *FASEB J.* (w druku).
38. Marinaro M., Boyaka P. N., Jackson R. J., Finkelman F. D., Kiyono H., Jirillo E., McGhee J. R., (1999), *Journal of Immunology*, 162, 114-121.
39. Davis H. L., (1988), *DNA-Based Immunization Against Hepatitis B: Experience with Animal Models*, in: Eds. H. Koprowski, D. B. Weiner, *DNA Vaccination/ Genetic Vaccination*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 57-68.
40. Pachuk C. J., Arnold R., Herold R. B., Ciccarelli R. B., Higgins T. J., (1998), *Humoral and Cellular Immune Responses to Herpes Simplex Virus-2 Glycoprotein D Generated by Facilitated DNA Immunization of Mice*, in: Eds. H. Koprowski, D. B. Weiner, *DNA Vaccination/ Genetic Vaccination*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 79-89.
41. Babiuk L. A., Lewis P. J., van Drunen S., Liang X., (1998), *Nucleic Acid Vaccines:*



- Veterinary Applications*, in: Eds. H. Koprowski, D. B. Weiner, Lite-van Den Hurk Tikoo S., *DNA Vaccination/ Genetic Vaccination*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 90-106.
42. Pessi T., Stas Y., Marttinen A., Isolauri E., (1998), *J. Nutr.*, 128, 2313-2318.
43. Tejada-Simon M. V., Lee J. H., Ustunol Z., Pestka J. J., (1999), *J. Dairy Sci.*, 82, 649-660.
44. Le Borgne S., Mancini M., Le Grand R., Schleef M., Dormont D., Tiollais P., Riviere Y., Michel M. L., (1998), *Virology*, 240, 304-315.
45. Yamanouchi K., Barrett T., Kai C., (1998), *Rev. Sci. Tech.*, 17, 641-653.
46. Modelska A., Dietzschold B., Sleysh N., Fu Z. F., Stepiewski K., Hooper D. C., Koprowski H., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 2481-2485.

## The new approaches in the area of vaccines development and administer

### Summary

Overviews of current vaccine development in respects to the idea of elaborate vaccines simple to handling and administer. The progress made recently in technologies concerning adjuvants, antigen formulation and vaccine delivery systems has been summarized. Special attention has been focused on mucosal way of vaccine application and orally induced immunity as well the newest achievements in the technology using plant as vaccine carriers.

### Key words:

subunit vaccine, DNA vaccine, edible vaccine, adjuvants, oral immunization.

### Adres do korespondencji:

Józef Kapusta, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14,  
61-704 Poznań, e-mail: jozefk@ibch.poznan.pl