

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Veterinární protivirové vakcíny založené na nukleových kyselinách
Veterinary antiviral vaccines based on nucleic acids

Bakalářská práce

Barbora Slunéčková

Školitel: Mgr. Martin Fraiberk, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama s použitím uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

V Praze, 11.8. 2021

Podpis:

Chtěla bych upřímně poděkovat svému školiteli Mgr. Martinu Fraiberkovi, Ph.D. za jeho cenné rady a zejména za čas, který mi při přípravě bakalářské práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mi byli velkou oporou v průběhu mého studia.

Abstrakt

Vakcíny založené na nukleových kyselinách (NK vakcíny) představují inovativní metodu očkování s celou řadou výhod i nevýhod, které brání jejich plnému využití v praxi. Jedním ze zásadních problémů je jejich nízká imunogenita a neschopnost vytvoření dlouhodobé imunity. Pro vylepšení efektivity vakcinace je nutno znát mechanismy imunitního systému hostitele, stejně jako strukturu a možnosti optimalizace nukleové kyseliny (NK). V současné době stále probíhá intenzivní výzkum dopravy NK vakcín do buněk hostitele a vývoj vhodných adjuvants pro navození adekvátní imunitní reakce.

Ve veterinárním odvětví se již NK vakcíny setkaly s mnohými úspěchy a několik z nich je již schváleno pro komerční použití. Jedná se především pro vakcinační látky proti rybím koňským a ptačím onemocněním.

Klíčová slova: vakcína, nukleové kyseliny, DNA, RNA

Abstract

Vaccines based on nucleic acids (NA vaccines) represent an innovative method of vaccination with a number of advantages and disadvantages, which repress their full potential of use in practice. One of the major problems is their low immunogenicity and their incapability to produce long-term immunity. To improve the effectiveness of vaccinations, it is necessary to know the mechanism of the host immune system as well as the structure and options of the nucleic acids (NA) optimization. Intensive research of the transportation of NA into the host cell and the development of suitable adjuvants to elicit an adequate immune response is still ongoing.

In veterinary practice, NA vaccines have already met with success and several of them are approved for commercial use. These are mainly vaccines against equine, avian and fish illnesses.

Keywords: vaccine, nucleic acids, DNA, RNA

Obsah

ABSTRAKT	1
OBSAH	2
SEZNAM ZKRATEK	3
1. ÚVOD	6
2. VROZENÁ IMUNITA	7
3. ADAPTIVNÍ IMUNITA	9
3.1. CD8+ T LYMFOCYTY	9
3.2. CD4+ T LYMFOCYTY	10
3.3. B LYMFOCYTY	12
3.3.1. Paměťové B lymfocyty.....	14
3.3.2. Izotypový přesmyk a somatická hypermutace.....	14
4. ADJUVANTS	15
5. OPTIMALIZACE A VÝROBA VEKTORŮ	16
5.1. DNA VAKCÍNY	16
5.2. MRNA VAKCÍNY	19
5.2.1. Samo-amplifikující mRNA	21
6. ZPŮSOBY DOPRAVY NUKLEOVÉ KYSELINY DO BUŇKY	21
6.1. FYZICKÉ METODY	21
6.2. CHEMICKÉ METODY	22
6.2.1. Lipidy	23
6.2.2. Polymery	25
6.2.3. Peptidy	26
6.2.4. Anorganické částice	27
7. VAKCÍNY PRO VETERINÁRNÍ POUŽITÍ	27
7.1. RYBÍ VIROVÁ ONEMOCNĚNÍ	28
7.2. KOŇSKÁ VIROVÁ ONEMOCNĚNÍ	29
7.3. PTAČÍ VIROVÁ ONEMOCNĚNÍ	30
8. ZÁVĚR	31
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	33

Seznam zkratk

-ssRNA	Negativní jednořetězcová ribonukleová kyselina
+ssRNA	Pozitivní jednořetězcová ribonukleová kyselina
AI	Ptačí chřipka
APC	Antigen prezentující buňka
ARCA _s	Anti-reverse cap analogs
ATP	Adenosintrifosfát
AuNPs	Zlaté nanočástice
BCR	Receptor B lymfocytu
CD40	Cluster of differentiation 40
CD40L	Cluster of differentiation 40 ligand
CIITA	Transaktivátor hlavního histokompatibilního komplexu II
CL	Kationtový lipozom
CMV	Cytomegalovirus
CNE	Kationtové nanoemulze
CpG	Deoxycytidin-fosfát-deoxyguanosin
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DC-STAMP	Dendritický transmembránový protein
DCs	Dendritické buňky
DEV	Virus herpesvirové enteritidy kachen
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin
DOTAP	1,2-dioleoyl-3-trimetylammonium-propan
DOTMA	1,2-di-O-octadecenyl-3-trimetylammonium propan
DSPE-PEG	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolamin-poly(ethylenglykol)
dsRNA	Dvouřetězcová ribonukleová kyselina
EF-1 α	Elongační faktor 1 α
EI	Koňská chřipka
eIF4E	Eukaryotní translační iniciační faktor E4
GC	Germinální centra
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GOI	Požadovaný gen („The gene of interest“)
HA	Hemaglutinin
HBV	Virus hepatitidy B
HCC	Hepatocelulární karcinom
HIRRV	Hirame novirhabdovirus
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPLC	Vysokotlaká kapalinová chromatografie
IBDV	Virus infekční burzidity drůbeže
IBV	Virus infekční bronchitidy drůbeže
ICOS	Inducible T cell co-stimulator
ICOSL	Inducible T cell co-stimulator ligand
IFN- γ/α	Interferon γ/α

IgM/A/E/G/D	Imunoglobulin M/A/E/G/D
IHNV	Virus infekční hematopoetické nekrózy
IL	Interleukin
IPNV	Virus infekční nekrózy pankreatu lososů
ISAV	Virus infekční anemie lososů
IVT	<i>In vitro</i> transkripce
LNP	Lipidické nanočástice
LP	Lipoplex
LPD	Lipid-Polymer-DNA lipopolyplex
LPR	Lipid-Polymer-RNA lipopolyplex
m7G	7-metylguanosin
MC	Minicircles
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
MN	Mikrojehličky („Microneedles“)
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NDV	Virus Newcastleké nemoci
NK	Nukleová kyselina
NK buňka	Přirození zabíječi („Natural killer cell“)
NK vakcína	Vakcína založená na nukleových kyselinách
NP	Nukleoprotein
Ori	Replikační počátek
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBAE	Poly(β -aminoester)
pDNA	Plazmidová deoxyribonukleová kyselina
PEI	Polyethylenimin
PLGA	Kopolymer kyseliny glykolové a mléčné
PLL	Poly(L-lysin)
PrM	Premembránový protein
PRRs	Pattern recognition receptors
PRV	Rybí orthoreovirus
SAM	Samo-amplifikující mediátorová ribonukleová kyselina
SPDV	Vir onemocnění pankreatu lososů
SV40	Simian virus 40
T _C	Cytotoxický T lymfocyt
T _{CM}	Centrální paměťový T lymfocyt
TCR	Receptor T lymfocytu
T _{EM}	Efektorový paměťový T lymfocyt
T _{fh}	Folikulární pomocný T lymfocyt
TGF β	Transformující růstový faktor β
Th1/2/17	Pomocný T lymfocyt 1/2/17
TLRs	Toll-like receptory
TNF- α	Faktor nádorové nekrózy α („Tumour Necrosis Factor α “)
Treg	Regulační T lymfocyt

T _{RM}	Tkáňový paměťový T lymfocyt
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina
UTR	Nepřekládaná oblast („Untranslated region“)
VHSV	Virus virové hemoragické septikémie
VLP	Částice podobné virům („Virus-like particles“)
VP2	Virový protein 2
WNV	Virus západonilské horečky

1. Úvod

Očkování je již dlouho známá metoda, jak se chránit před zhoubnými nemocemi a vybudovat si vůči nim imunitu. První poznatky o očkování známe již od roku 1000 z Číny a Indie, kdy právě neštovice (smallpox) představovaly vážné zdravotní riziko. Očkovalo se buď vdechováním rozdrcených strupů nemocných, či se vtíral hnis z puchýřů do čerstvých ran. Za prvního vynálezce vakcinační látky je považován Edward Jenner, který na základě pozorování zjistil, že lidé, kteří prodělali infekci kravskými neštovicemi již neonemocněli neštovicemi pravými. Roku 1796 poprvé injikoval virus kravských neštovic osmiletému chlapci a zajistil mu tím imunitu vůči pravým neštovicím. Anglický název *vaccine* či *vaccination* je odvozen od latinského názvu pro krávu – *vacca* (The College of Physician of Philadelphia, n.d.).

Od té doby byla objevena celá řada vakcinačních látek proti infekčním onemocněním založených převážně na atenuovaném či inaktivovaném patogenním agens. Novější metodou se poté staly subjednotkové vakcíny, kdy se podává pouze část patogenu. Může se jednat o jeden nebo více proteinů, peptidů či polysacharidů.

Již v 90. letech se začaly objevovat první zmínky o možnosti využití nukleových kyselin (NK) jakožto vakcinačních látek. Možnost intracelulární exprese námi vybraných genů hostitelem byla potvrzena ve studii Wolffa et al., 1990, při které byly do kosterní svaloviny myši dopraveny DNA i RNA molekuly obsahující geny pro luciferázu, β -galaktosidázu a chloramfenikol acetyltransferázu. Svalové buňky začaly produkovat proteiny kódované aplikovanými NK. Na základě tohoto pokusu se začalo uvažovat o použití této metody pro účely vakcinace nahrazením výše zmíněných referenčních genů sekvencemi pro patogenní antigeny (Wolff et al., 1990).

Při očkování NK se využívá exprese antigenu *in situ* přímo hostitelskou buňkou. Dochází tím k napodobení infekce organismu patogenem bez jeho přítomnosti. Zároveň nemůže dojít k obnově virulence, která hrozí u atenuovaných vakcín. Produkce buňkou pak zajišťuje správnou konformaci a posttranslační modifikace antigenu. To je další výhoda oproti inaktivovaným vakcínám, kde může při procesu atenuace docházet k poškození struktury antigenu. V současné době stále probíhá intenzivní výzkum efektivní dopravy NK vakcín do buněk hostitele.

Vytvořený antigen, respektive jeho části, jsou následně vystaveny na hlavním histokompatibilním komplexu I (Major histocompatibility complex I, MHCI) na povrchu buňky, kde jsou přístupné imunitnímu systému. Prezentací antigenu cestou MHCI dochází k účinné aktivaci buněčné složky imunity. To je jedna z výhod oproti peptidovým a atenuovaným vakcínám, které jdou cestou prezentace MHCII a buněčnou složku imunity dokážou vybudit jen obtížně nebo vůbec.

Díky expresi antigenu *in situ* odpadla potřeba tvořit patogenní proteiny složitě v laboratořích, protože veškeré potřebné mechanismy vlastní hostitelská buňka. Jedná se tím o usnadnění a zlevnění jejich přípravy oproti dosud využívaným vakcínám. NK vakcíny jsou bezpečné a jejich dalším plusem je možnost jejich rychlého a flexibilního vývoje v případě krizových situací, jako jsou například epidemie, pandemie či rozšíření nových mutací patogenů.

Nejzásadnějším problémem, se kterým se vývoj těchto vakcín potýká, je jejich nízká schopnost navodit dostatečnou imunitní odpověď. To lze ale vylepšit hned několika způsoby: použitím vhodných adjuvants, upravením samotné NK, použití vhodného nosiče pro

dopravu NK do buňky či zvolením ideálního místa a způsobu aplikace vakcinační látky. Jednotlivými částmi se budu zabývat podrobněji v průběhu své práce.

Nukleové kyseliny jsou tedy vhodným kandidátem pro boj proti infekčním onemocněním způsobených jak viry, bakteriemi či prvoky, ale také proti různým chronickým a autoimunitním onemocněním, alergiím či rakovinám.

V této práci jsem se zaměřila především na využití NK při výrobě vakcinačních látek proti veterinárním virovým onemocněním, které představují nezanedbatelné hospodářské riziko při chovu hospodářských zvířat.

Cíle této bakalářské práce jsou:

- 1. Zpracovat literární přehled o současných protivirových vakcínách založených na nukleových kyselinách ve veterinární oblasti (již registrovaných i těch ve fázi výzkumu) a přehled hospodářky významných virových onemocnění u hospodářských zvířat.**
- 2. Podat základní přehled procesů imunitního systému významných pro proces vakcinace a ustavení protektivní imunity.**

2. Vrozená imunita

Imunitu můžeme rozdělit do dvou kategorií: vrozená a adaptivní. Vrozená imunita je evolučně starší a působí nespecificky proti široké škále patogenů. Zahrnuje jak složky buněčné (fagocytující makrofág, neutrofil...), humorální (komplement, interferony...) nebo například i mechanické bariéry těla, jako je kůže či řasinkový epitel. Tyto složky jsou v těle připravené ještě před výskytem patogenu a jsou tedy schopny reagovat velmi rychle (řádově v minutách). Oproti tomu adaptivní imunita se aktivuje až po prvním setkání s antigenem a reaguje v rozmezí dnů až týdnů. Zahrnuje již antigeně specifické mechanismy a její podstata spočívá zejména v protilátkách produkovaných plazmatickými buňkami (diferencované B lymfocyty) a T lymfocyty. Více se adaptivní imunitou budu zabývat v následující kapitole.

Vrozená imunita stojí na počátku každé imunitní reakce. V této kapitole se zaměřím především na složky vrozené imunity, které jsou podstatné pro pochopení funkce NK vakcín a mechanismů účinku vakcinačních adjuvants.

Hlavní buněčnou složkou vrozené imunity jsou fagocytující buňky. Mezi ně můžeme zařadit makrofágy a dendritické buňky (DCs), které nejčastěji přetrvávají v místech možného výskytu patogenu, či neutrofilů a monocytů, které cirkulují v oběhové soustavě hostitele (Newton & Dixit, 2012).

Makrofágy a DCs také slouží jako antigen prezentující buňky (APC) vystavující části pohlcených antigenů na komplexech MHCII a tvoří tak pojítko mezi vrozenou a adaptivní imunitou. Více o prezentaci antigenů buňkami bude zmíněno u adaptivní imunity.

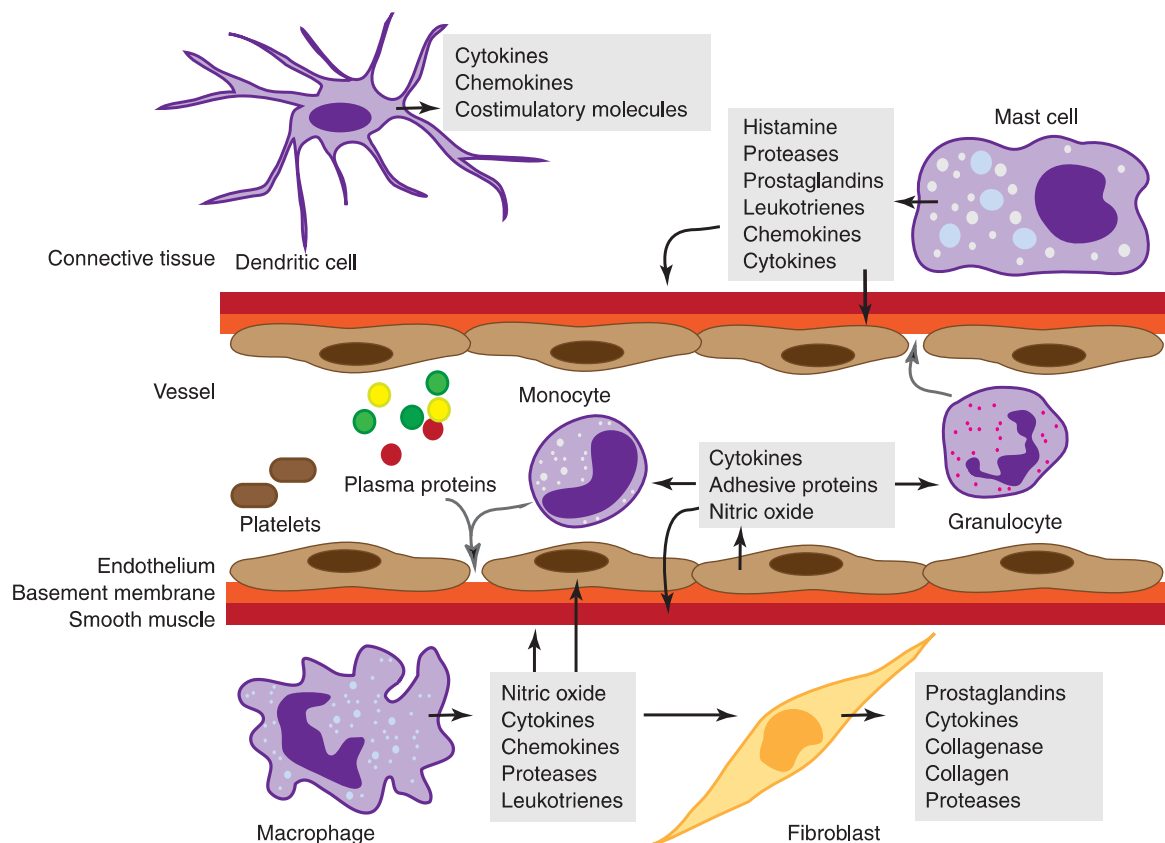
Jelikož vrozená imunita zasahuje proti patogenům nespecificky, je schopna rozeznávat celou řadu silně konzervovaných motivů vyskytujících se u patogenních agens. Tyto motivy se jinak nazývají PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) a může mezi ně patřit např. peptidoglykan, flagelin či lipopolysacharidy gramnegativních bakterií. Buňky vrozené imunity je rozpoznávají pomocí receptorů PRRs (Pattern recognition receptors), které mohou být jak

cytoplazmatické, tak membránové. PRRs můžeme rozdělit na několik subtypů podle jejich struktury a místa výskytu na Toll-like receptory (TLRs), NOD-like receptory, RIG-I-like receptory a další. Vrozená imunita zasahuje také proti tzv. DAMPs (Damage-associated molecular patterns), což jsou molekuly uvolněné z poškozených buněk do extracelulárního prostoru. Řadí se mezi ně například ATP, DNA či kyselina močová (Newton & Dixit, 2012).

V závislosti na rozeznání PAMPs nebo DAMPs dochází k aktivaci signálních drah pro produkci cytokinů, chemokinů a adhezivních molekul. Ty jsou podstatné pro aktivaci a přilákání dalších složek vrozené i adaptivní imunity do místa zánětu a rychlou eliminaci patogenu. Je tím zároveň docíleno i efektivnější prezentace antigenu APC a jeho předání složkám adaptivní imunity (Newton & Dixit, 2012).

Další složkou vrozené imunity jsou tzv. žírné buňky neboli mastocyty. Tyto buňky produkují množství látek regulující imunitní odpověď. Pomocí cytokinů a chemokinů indukují migraci, maturaci a diferenciaci buněk imunitního systému, zvyšují efektivitu prezentace antigenů APC a indukují produkci adhezivních molekul na endoteliálních buňkách v okolí postižené oblasti. Histamin například zajišťuje vazodilataci cév a tím usnadňuje průnik leukocytů do zánětlivé oblasti. Mimo jiné sekretují také látky schopné přímo eliminace patogenu a toxických látek a zároveň se podílí na remodelaci postižené tkáně (Galli et al., 2010).

Na obr. 1 můžeme vidět výše zmíněné typy buněčných složek vrozené imunity spolu se vzájemnými interakcemi pomocí produkovaných látek.



Obrázek 1: Schéma interakcí buněčných složek vrozené imunity a jimi produkované látky (Newton & Dixit, 2012).

3. Adaptivní imunita

Jak jsem již zmínila výše, adaptivní imunita zahrnuje především antigenně specifické mechanismy a je založena na B a T lymfocytech. Je aktivována až po prvním setkání s antigenem, což je zprostředkováno ve většině případů právě imunitou vrozenou. Nebýt vrozené imunity, nemohla by vzniknout imunita adaptivní. Obě kategorie spolu tedy úzce spolupracují. Dalším rysem adaptivní imunity, který je zásadní pro očkování, je tvorba tzv. imunologické paměti v podobě paměťových buněk.

Po transfekci buněk nukleovou kyselinou (tzn. buňky začnou exprimovat antigen kódovaný nukleovou kyselinou) je mnoho způsobů, jakými bude s antigenem nakládáno a jakými mechanismy bude aktivována adekvátní imunitní odpověď.

Sama transfekovaná buňka (keratinocyt, myocyt...) začne antigen prezentovat na svém membránovém komplexu MHCI. Transfekované buňky ale mohou antigen také uvolňovat pomocí exosomů, které jsou následně pohlceny APC a vystaveny na MHCII (Sudowe et al., 2009). Komplexy MHCII slouží především k prezentaci antigenů vychytávaných z okolí, zatímco MHCI prezentuje proteiny exprimované endogenně přímo buňkou. Oba komplexy jsou zásadní pro aktivaci dalších imunitních složek.

Po transfekci ale mohou buňky také prodělat apoptózu a v tom případě je antigen pohlcen APC v podobě apoptických tělísek (Lazzaro et al., 2015). Při pohlcení antigenu APC buňkou může také dojít ke zkřížené prezentaci (cross-presentation). Jedná se o jev, kdy je exogenně získaný antigen vystaven na komplexu MHCI. To umožní aktivaci buněčné imunity, přestože APC není sama infikovaná (Neefjes & Sadaka, 2012). Po vystavení antigenu na odpovídajících MHC DCs dojde k její migraci do nejbližší lymfatické uzliny a k aktivaci naivních B a T lymfocytů.

3.1. CD8+ T lymfocyty

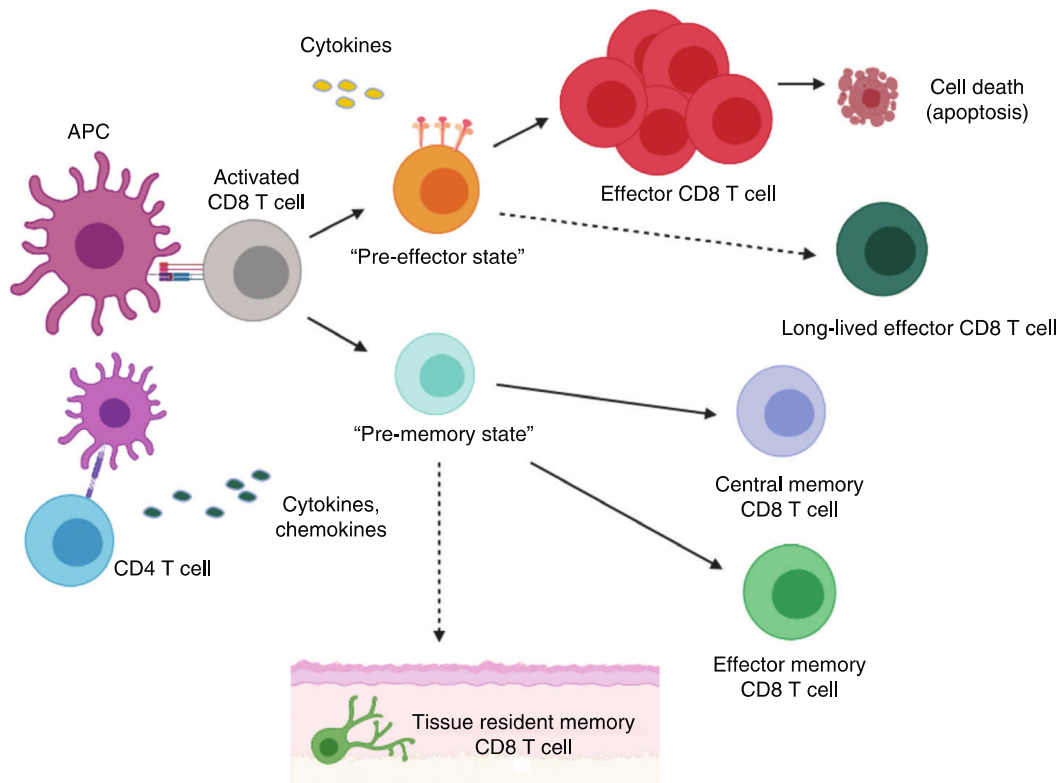
Peptid navázaný na komplexu MHCI je rozpoznáván pomocí receptoru TCR (T-cell receptor) CD8+ T lymfocytů které následně prodělají klonální expanzi na efektorové cytotoxické T lymfocyty (T_C) (den Haan et al., 2014). Jelikož komplex MHCI prezentuje peptidy vytvořené uvnitř buňky, T_C zasahují především proti intracelulárním parazitům a virům. T_C mohou infikované buňky eliminovat několika způsoby. Jedním z nich je vazba exprimovaným FasL (Fas ligand) na buněčný FasR (Fas receptor) a indukovat tak apoptózu napadené buňky. Druhým způsobem je sekrece proteinových granulí obsahující perforiny a granzymy, které dokáží narušit cytoplazmatickou membránu infikované buňky a fragmentovat její DNA (Lowin et al., 1996).

Část z nich se vyvine v tzv. paměťové buňky. Jsou dlouhověké, uchovávají v sobě informaci o antigenu, se kterým se setkaly. V případě napadení organismu stejným patogenem jsou schopny reagovat mnohem rychleji a efektivněji. I ty ale můžeme dále rozdělit na tři podmnožiny: centrální paměťové T lymfocyty (T_{CM}), efektorové paměťové T lymfocyty (T_{EM}) a tkáňové paměťové T lymfocyty (T_{RM}).

T_{EM} se vyznačují dobrou migrací do zánětlivých oblastí a poměrně velkou produkcí efektorových cytokinů, jako je interleukin 4 (IL-4), interferon- γ (IFN- γ) nebo perforin.

T_{CM} se oproti tomu nacházejí především v lymfatických orgánech, mají slabší cytotoxickou schopnost, ale zato dokáží aktivovat dendritické buňky a stimulovat je k vysoké produkci IL-12 (Sallusto et al., 1999). Posledním typem jsou T_{RM} , které zůstávají v místech náchylných na opakovaný výskyt patogenu jako je pokožka nebo střevní epitel (Ariotti et al., 2012).

Přehledné schéma postupného vývoje naivního $CD8^+$ T lymfocytu na výše zmíněné subtypy je znázorněn na obr. 2.



Obrázek 2: Schéma diferenciaci naivního $CD8^+$ T lymfocytu pomocí APC buňky na efektorové a paměťové buněčné subtypy (Arsenio, 2020).

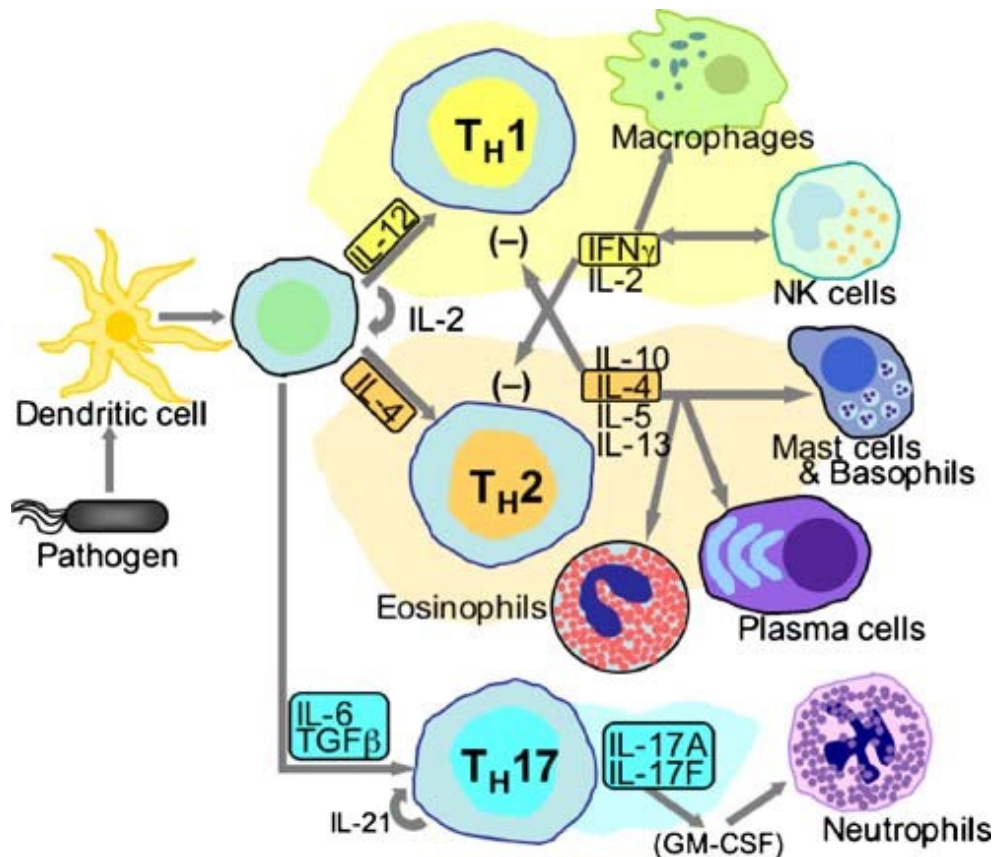
3.2. $CD4^+$ T lymfocyty

Peptidy vystavené na komplexu MHCII dendritických buněk jsou pro změnu rozpoznávány TCR $CD4^+$ T lymfocytů. Ty se klonální expanzí diferencují do tří podmnožin: pomocné T lymfocyty (Th1, Th2, Th17), regulační T lymfocyty (Treg) a folikulární pomocné T lymfocyty (Tfh). Systém diferenciaci $CD4^+$ T lymfocytů je i se směry účinku hlavních interleukinů uveden na obr. 3.

Th1 buňky jsou diferencovány především pomocí cytokinu IL-12 a tvoří se hlavně při virových nálezích. Samy buňky poté sekretují cytokiny IL-2, IL-21 a IFN- γ , které mohou aktivovat makrofágy či NK buňky (natural killer cells). IL-4 je naopak zásadní pro diferenciaci $CD4^+$ T lymfocytů na Th2 buňky uplatňující se při napadení organismu extracelulárními patogeny. Tento subtyp produkuje cytokiny IL-4, IL-5 a IL-13, které následně stimulují B lymfocyty k diferenciaci na plazmatické buňky a aktivuje složky přirozené imunity, jako jsou eozinofily či bazofily.

Oba subtypy buněk (Th1 a Th2) se ale také svými cytokiny navzájem inhibují (IL-4 produkovaný Th2 inhibuje tvorbu Th1, a stejně tak IFN- γ inhibuje tvorbu Th2). Tímto způsobem dochází k polarizaci imunitní odpovědi, kdy záleží na bilanci jednotlivých složek a jejich interakcích (Girardi, 2007).

Třetím typem pomocných T lymfocytů jsou Th17 buňky. Ty jsou aktivovány pomocí IL-6 a transformujícího růstového faktoru β (TGF β). Sekrecí IL-17 dokáží navádět neutrofile do místa zánětu a urychlit tím imunitní odpověď (Ye et al., 2001).



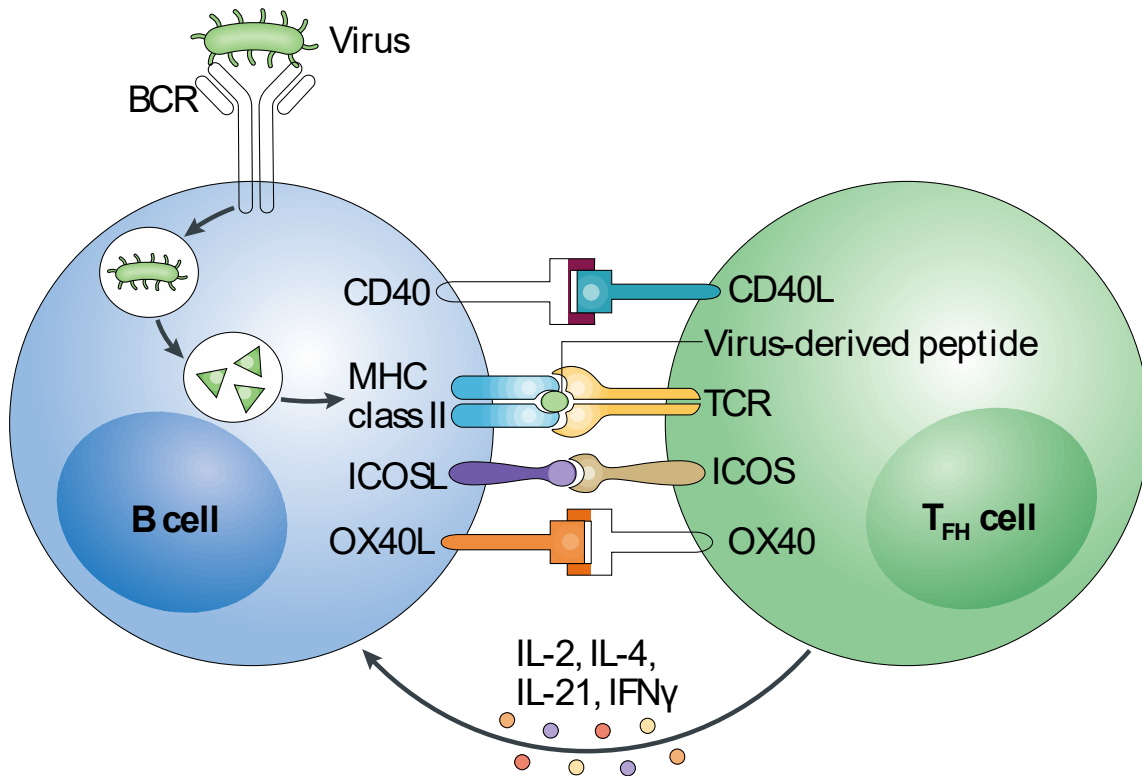
Obrázek 3: Diferenciace naivního CD4⁺ T lymfocytu na jeho pomocné subtypy, přehled sekretovaných cytokinů a cest jejich účinku (Girardi, 2007).

Treg T lymfocyty zajišťují především homeostázi. Také tlumí a regulují efektorovou funkci lymfocytů, aby bylo zamezeno destrukci vlastních hostitelských tkání nepřiměřenou imunitní odpovědí (Belkaid & Tarbell, 2009).

Posledním subtypem maturovaných CD4⁺ T lymfocytů jsou Tfh, které jsou diferencovány pomocí cytokinů IL-21 a IL-6. Stejně cytokiny také indukují tvorbu germinálních center (GC) v lymfatických uzlinách (Karnowski et al., 2012).

Když Tfh přes TCR rozezná antigen, aktivuje se a migruje na rozhraní B-T zóny v lymfatické uzlině. Zde má možnost setkat se s B lymfocyty, které již také pomocí receptoru BCR (B-cell receptor) zaznamenaly přítomnost antigenu v těle, pohltily ho a vystavily na svém komplexu MHCII. Pokud TCR rozezná antigen na MHCII B lymfocytu, znamená to, že se obě buňky setkaly se stejným antigenem a mohou tedy pokračovat ve své diferenciaci dále (den Haan et al., 2014). Osud B lymfocytů bude probrán později.

Jak je graficky znázorněno na obr. 4, vazba mezi B a T lymfocyty se děje mimo komplex MHCII a TCR především pomocí povrchových proteinů CD40 (na B lymfocytu) a CD40L (na Tfh buňce) (Banchereau et al., 1994), dále také přes ICOS (na Tfh buňce), který se váže na ICOSL B lymfocytu. Tfh buňky také sekretují cytokiny IL-2, IL-4, IL-21 a IFN- γ , které pomáhají proliferaci B lymfocytů, stimulují jejich izotypový přesmyk (podrobněji probráno níže) a tvorbu germinálních center (Swain et al., 2012).



Obrázek 4: Interakce mezi B lymfocylem a Tfh pomocnou buňkou (Swain et al., 2012).

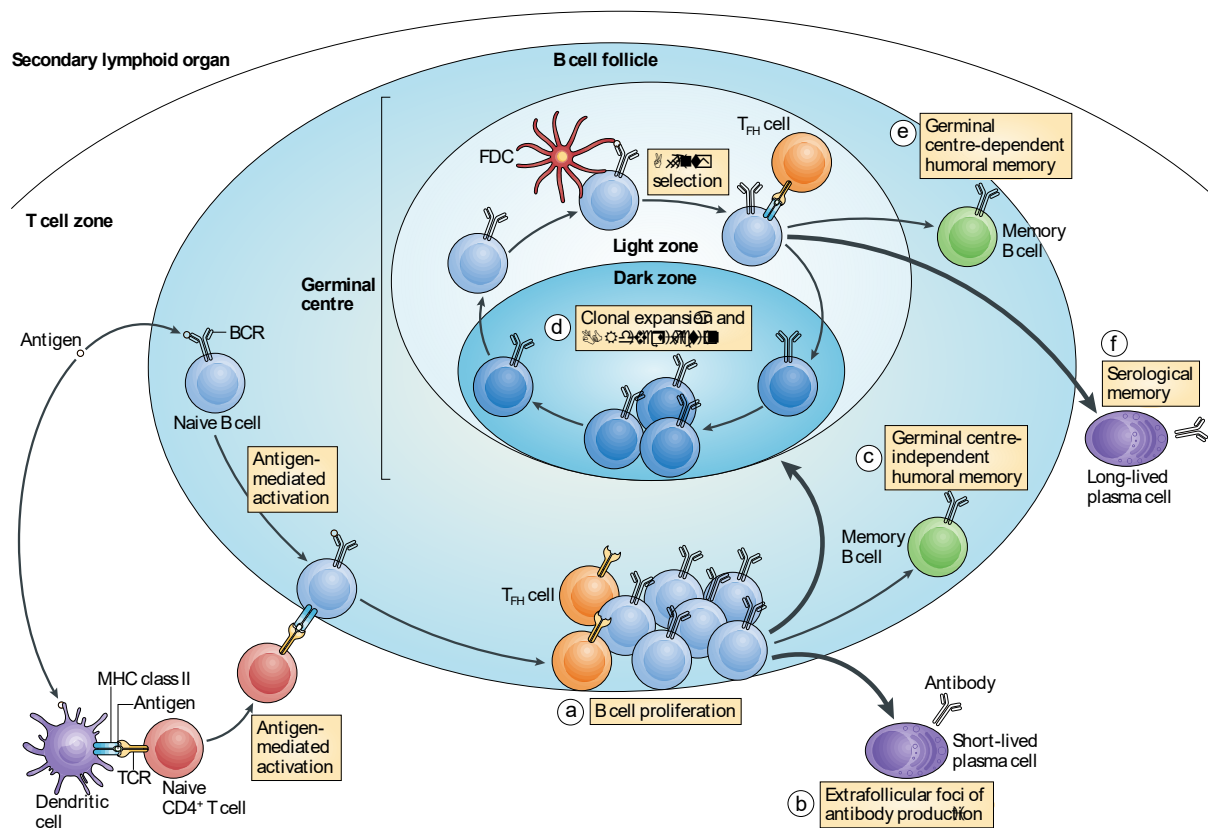
Díky těmto signálům jsou si Tfh buňky schopny uchovat svůj fenotyp pomocného lymfocytu a migrují spolu s B lymfocyty do GC. Zde obdobně jako v dřívějším případě pomáhají B lymfocytům v jejich proliferaci a diferenciaci na plazmatické či paměťové buňky (Karnowski et al., 2012; Schwickert et al., 2011).

Část Tfh lymfocytů se diferencuje na paměťové Tfh lymfocyty, které jsou zásadní pro reaktivaci paměťových B lymfocytů při opětovném setkání se stejným antigenem. Kromě oběhového systému je můžeme nalézt také na T-B hranici či dokonce v B zóně lymfatické uzliny, kde mohou rychleji zareagovat na výskyt již známého antigenu (Ise et al., 2014).

3.3. B lymfocyty

B lymfocyty vznikají stejně jako ostatní krevní buňky v kostní dřeni a svou diferenciaci dokončují v sekundárních lymfatických orgánech (slezina, lymfatické uzliny). Zde dochází k jejich aktivaci pomocí několika typů signálů: rozeznání antigenu pomocí imunoglobulinového BCR, pomoc od Tfh buněk a také stimulace cytokiny (Kurosaki et al., 2015).

Schéma vzájemných interakcí buněk imunitního systému v sekundární lymfatické uzlině, které budu následně podrobněji rozebírat, je uvedeno na obr. 5.



Obrázek 5: Mezibuněčné interakce a vývoj B lymfocytů v lymfatické uzlině (Kurosaki et al., 2015).

Jako první musí naivní B lymfocyt rozeznat pomocí BCR antigen. Ten může být jak solubilní v lymfě, tak vázaný na membránu DCs (den Haan et al., 2014).

Na rozhraní T a B zóny se B lymfocyty setkají s T_{fh} buňkami a dojde k jejich silné proliferaci (interakce mezi B lymfocylem a T_{fh} buňkou je probrána výše). Část z nich odchází a dávají vzniknout krátkověkým plazmatickým buňkám. Děje se tak, protože tyto buňky nebyly schopné navázat dostatečně silné spojení s T_{fh} a nedostalo se jim tedy dostatečné T_{fh} pomoci, aby mohly ve svém vývoji pokročit dále (diferenciace na GC). Jelikož BCR těchto buněk ještě neprodělal somatickou hypermutaci (probráno níže), mají menší afinitu k antigenu (Schwickert et al., 2011).

Část B lymfocytů, která navázala dostatečně silné spojení s T_{fh}, dá vzniknout GC. Zde B lymfocyty opět proliferují a podstupují somatickou hypermutaci v tzv. „tmavé“ zóně. Následně migrují do „světlé“ zóny, kde je afinita jejich BCR k antigenu testována pomocí folikulárních dendritických buněk (FDCs) a dostává se jim další pomoci od T_{fh}. Buňky s dostatečně kvalitními BCR odchází z GC jako dlouhověké plazmatické buňky. Ostatní B lymfocyty se vrací zpět do „tmavé“ zóny a celý cyklus se opakuje (Shinnakasu & Kurosaki, 2017).

3.3.1. Paměťové B lymfocyty

Část B lymfocytů se během své aktivace přemění na paměťové B lymfocyty. Podle způsobu jejich diferenciaci je můžeme rozdělit do dvou podskupin: T-nezávislé paměťové B lymfocyty a T-závislé paměťové B lymfocyty.

T-nezávislé paměťové B lymfocyty vznikají bez pomoci T_{fh}. Pomocí svého BCR rozeznávají hlavně bakteriální lipopolysacharidy a polymerní látky. Nedochozí u nich k izotypovému přesmyku a sekretují tedy převážně imunoglobuliny třídy M (IgM). Zatím není zcela jasné, zda by se specifitou protilátek a rychlostí imunitní odpovědi výrazně lišily od naivních B lymfocytů (Obukhanych & Nussenzweig, 2006).

Oproti tomu T-závislé paměťové B lymfocyty vznikají za pomoci T lymfocytů podobným způsobem jako plazmatické buňky (popsáno výše). Tyto buňky jsou dlouhověké, již prodělaly izotypový přesmyk a při opětovném setkání s antigenem reagují rychleji a efektivněji. Paměťové B lymfocyty na GC nezávislé se oddělili již po první proliferaci B lymfocytů. Jelikož jejich BCR neprodělal somatickou hypermutaci, jsou méně afinitní k antigenům než paměťové B lymfocyty na GC závislých. Tyto buňky se oddělily až po proliferaci v GC, prodělaly izotypový přesmyk i somatickou hypermutaci a jsou to tedy buňky schopné produkovat vysokoafinitní protilátky (Kaji et al., 2012; Kurosaki et al., 2015).

Podle produkovaných protilátek můžeme paměťové buňky také rozdělit na IgM, IgA, IgE a IgG paměťové buňky (Kurosaki et al., 2015).

3.3.2. Izotypový přesmyk a somatická hypermutace

V primární fázi protilátkové reakce buňky produkují především IgM a IgD, které mají poměrně malou afinitu k antigenu. Pomocí cytokinů a interakcí s T_{fh} dochází v B lymfocytech k izotypovému přesmyku (Aversa et al., 1994). Imunoglobuliny se obecně skládají ze dvou podjednotek lehkého a dvou podjednotek těžkého řetězce. Na konci každého řetězce se nachází variabilní doména, která zajišťuje afinitu k antigenu a během izotypového přesmyku se nemění. Změnu prodělává tzv. konstantní doména těžkého řetězce nacházející se za jeho variabilní oblastí a ta je zodpovědná za izotyp sekretovaného imunoglobulinu. Děje se tak na úrovni chromozomální rekombinace, při které jsou nepotřebné geny pro určitý typ Ig z této konstantní domény odstraněny (Coffman et al., 1993). Změna izotypu protilátky určuje její efektorový mechanismus, jakým způsobem bude interagovat s bílými krvinkami, složkami komplementu apod.

Somatická hypermutace se děje na základě bodových mutací genů pro variabilní oblasti imunoglobulinu, které jsou zodpovědné za rozeznání a vazbu antigenu. Tímto způsobem mohou B lymfocyty zvýšit afinitu svých protilátek. Jelikož se ale jedná o náhodné mutace, mohou tím také svou specifitu i snížit (Kurosaki et al., 2015).

Jak bylo zmíněno výše, jaký izotyp protilátek bude plazmatická buňka produkovat, lze regulovat pomocí cytokinů. Na příklad IL-4 sekretovaný Th2 buňkami stimuluje B lymfocyty k antigennímu přesmyku na IgE a IgG1 (Coffman et al., 1993), IL-13 k přesmyku na IgG4 a IgE (Punnonen et al., 1993) a IL-10 stimuluje produkci IgG1 a IgG3 (Brière et al., 1994).

TGF β , který je zároveň zodpovědný za aktivaci Th17 buněk, indukuje tvorbu IgA (Coffman et al., 1993; Zan et al., 1998) a T lymfocyty aktivující IL-21 je zodpovědný za izotypový přesmyk imunoglobulinů na IgG1 a IgG3 (Pène et al., 2004).

Neutralizující protilátky produkované plazmatickými buňkami jsou podstatnou složkou obrany organismu proti virovým onemocněním a znalosti o jejich účinku a indukci sekrece jsou podstatné pro vývoj a vylepšení efektivity vakcinačních látek.

4. Adjuvants

Jedním z největších problémů vakcín založených na nukleových kyselinách je právě jejich poměrně nízká imunogenicita. Pro vylepšení jejich schopnosti navodit dostatečně silnou imunitní odpověď se využívají tzv. adjuvants. Jedná se o látky, které se přidávají do očkovacích směsí a svými účinky zvyšují celkovou efektivitu očkování. Tyto látky cílí právě na vrozenou imunitu, která je nezbytná k aktivaci imunity adaptivní. Napomáhají aktivovat DCs a ostatní fagocytující buňky, pohlcovat antigen a indukují tvorbu prozánětlivých cytokinů.

Nejběžněji používaným adjuvants vakcinačních látek jsou soli hliníku, jinak také nazývané alum. Patří mezi ně například hydroxid hlinitý [Al (OH) $_3$], fosforečnan hlinitý (Al PO $_3$) nebo síran draselno-hlinitý [KAl (SO $_4$) $_2$]. Tyto látky se často přidávají do peptidových vakcín, a přestože několik studií potvrzuje jejich účinnost i při použití s NK vakcínami, je zde snaha vyvinout lepší a efektivnější metodu (Garg et al., 2017).

Vhodným kandidátem pro zlepšení imunogenicity NK vakcín se zdá být využití buněčných cytokinů a chemokinů. Ty po aplikaci dokáží mimikovat probíhající infekci (napadení organismu patogenem). Dojde k přitahování buněk imunitního systému z okolí a lymfatických nodů. Zajistí se tak lepší pohlcení exprimovaného antigenu, jeho předání složkám adaptivní imunity a rychlejší eliminace patogenního agens. Tyto látky mohou být buď přidány do vakcinační směsi ve své proteinové podobě, nebo mohou být kódovány přímo NK. Pokud je cytokin kódovaný nukleovou kyselinou, docílí se tím delší trvanlivosti jeho účinku (exprimují se stále nové molekuly) oproti jeho poměrně krátké životnosti při aplikaci v proteinové podobě. Mezi využívané nebo v současnosti studované cytokiny jakožto adjuvants NK vakcín patří například IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ či granulocyt-makrofág kolonii stimulující faktor (GM-CSF) (Okuda et al., 2000).

Podle typu použitého cytokinu či chemokinu můžeme také směřovat imunitní reakci požadovaným směrem. Pro aktivaci Th1 imunitní odpovědi lze využít IL-2, IL-12 nebo IFN- γ . Pro Th2 naopak IL-4 nebo IL-10 (Okuda et al., 2000).

Schopnost určitých cytokinů vyvolat požadovanou imunitní odpověď při použití s NK vakcínami byla potvrzena v práci Chowa et al., 1998. Spolu s plazmidem kódujícím obalový S protein viru hepatitidy B (HBV) byly myším podávány i plazmidy obsahující geny pro různé typy cytokinů. Zatímco plazmid s genem pro IL-4 indukoval Th2 imunitní odpověď a produkci IgG1 protilátek, plazmid s genem pro IL-12 či IFN- α indukoval Th1 imunitní odpověď a produkci IgG2b (Chow et al., 1998).

Díky rekombinantním technikám ale mohou být geny pro cytokiny či chemokiny vkládány přímo do plazmidů kódujících antigen. Příkladem může být vložení genu pro cytokin GM-CSF do plazmidu přímo před gen pro S protein HBV. Bylo tím docíleno silnější humorální i buněčné imunitní odpovědi (Qing et al., 2010).

Také nemetylované motivy deoxycytidin-fosfát-deoxyguanosin (CpG) přítomné na plazmidu mohou působit jako vestavěný adjuvant. V eukaryotním hostiteli jsou CpG motivy metylované. Nemetylované CpG motivy jsou hojně zastoupeny především v prokaryotních organismech a díky tomu dokáže hostitel snadno rozpoznat vlastní DNA od té cizorodé. Nemetylované úseky CpG jsou rozeznávány jako PAMPs endozomálním TLR9, stimulují makrofágy k produkci IL-12, IL-6 a faktoru nádorové nekrózy α (TNF- α) a navozující tak Th1 imunitní odpověď (Hemmi et al., 2000). TLR9 napomáhá také aktivovat DCs, které následně celou reakci umocní sekrecí IFN- γ (Rottembourg et al., 2010).

CpG sekvence jsou silně druhově specifické a jejich optimální imunogenicita se liší podle jejich délky či strukturních charakteristik. Jelikož CpG indukují produkci prozánětlivých cytokinů, vyvstaly obavy, že by použití CpG motivů mohlo způsobit nadměrné zánětlivé reakce, jak se tomu stává při některých bakteriálních nákazách. Na tuto problematiku bylo provedeno hned několik studií, část z nich zaznamenalo zánětlivé reakce ve svalech subjektů. Žádný z výsledků však nebyl natolik alarmující, aby překonal výhody získané použitím tohoto typu adjuvants (Chaung, 2006).

5. Optimalizace a výroba vektorů

Vakcinace pomocí nukleových kyselin využívá k expresi antigenu transkripční a translační mechanismus přímo hostitelské buňky a je tím usnadněna a urychlena jejich příprava oproti klasickým vakcínám.

NK vakcíny lze snadno upravovat, jsou velmi flexibilní a jejich rychlá příprava může být zásadní pro vývoj vakcín při akutních situacích, jako jsou lokální epidemie infekčních onemocnění, pandemie či výskyt úplně nového patogenu. Navíc jejich příprava není drahá, a proto jsou ideální volbou při výrobě vakcín ve velkém měřítku.

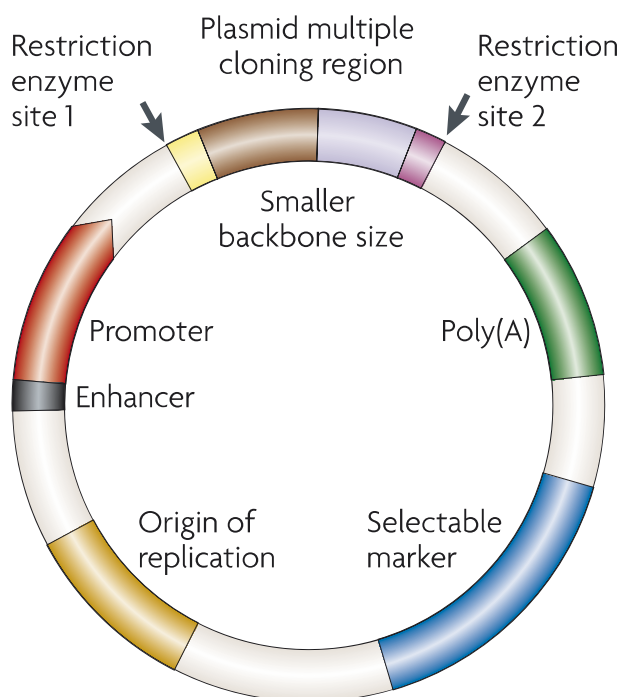
5.1. DNA vakcíny

Prvním vektorem, který byl využit k dopravě nukleotidové sekvence antigenu do buňky, byla právě plazmidová DNA (pDNA).

Jelikož pro správnou funkci DNA vakcín je potřeba dostat požadovaný plazmid až do jádra hostitelské buňky, jednou z hlavních obav jejich použití je možné začlenění pDNA do DNA hostitele. To by mohlo způsobit rakovinné bujení, při integraci do gonád přenos vážných mutací do dalších generací nebo vznik autoimunitních onemocnění. Tímto problémem se zabývalo hned několik studií a tvorba mutací po použití DNA vakcín nebyla dosud potvrzena. Bylo zjištěno, že při použití nových technik pro vylepšení vstupu plazmidů do buňky (např. pomocí elektroporace nebo gene gun, které budou probrány podrobněji v následující kapitole) byla zvýšena i pravděpodobnost integrace plazmidu do hostitelského genomu. Toto pozorování ale mohlo být způsobeno faktem, že čím více je plazmidů v buňce, tím je větší šance, že při purifikaci genomové DNA nemusí dojít k úplnému odstranění všech extrachromozomálních plazmidů (Manam et al., 2000; Z. Wang et al., 2004). I v tomto případě je ale frekvence integrace plazmidu do genomu dokonce menší, než je pravděpodobnost vzniku náhodných mutací (Ledwith et al., 2000). Díky těmto výsledkům bylo riziko vzniku mutací kvůli DNA

vakcínám označené za zanedbatelné. Doposud ale nebyla schválena žádná DNA vakcína proti lidským patogenům, a tudíž je jejich bezpečnost stále dodnes otázkou mnoha studií.

Nejčastějším problémem, se kterým se DNA vakcíny (a NK vakcíny celkově) setkávají, je jejich poměrně nízká imunogenicita. Jinými slovy, nedochází k dostatečné expresi antigenu, nebo jeho exprese nedokáže dostatečným způsobem stimulovat imunitní systém. Tím není docíleno natolik silné imunitní odpovědi, aby dala vzniknout paměťovým buňkám a dlouhodobé imunitě. Tento fakt je možno řešit hned několika způsoby. Jedním z nich je optimalizace plazmidu při jeho přípravě pomocí rekombinantních technik. Co vše musí funkční plazmid obsahovat a jakými způsoby se dosahuje lepší imunogenicity DNA vakcín bude probráno následovně. Na obr. 6 lze vidět možné uspořádání níže probraných částí plazmidu na kruhové DNA.



Obrázek 6: Schéma uspořádání jednotlivých oblastí na plazmidové DNA (Kutzler & Weiner, 2008).

Základem DNA vakcín je vhodný vektor pro dopravení antigenu do buňky, tzv. vector backbone. Využívají se především bakteriální plazmidy, které se po jejich optimalizaci nechají nejčastěji namnožit v bakteriích *E. coli*.

Tyto plazmidy obsahují všechny běžné oblasti potřebné pro jeho správnou funkci a replikaci. Jednou z nich je replikační počátek (Ori), který je zásadní pro amplifikaci plazmidu v replikujícím se organismu. Plazmid může obsahovat také selekční marker. Často se jedná o geny pro rezistenci vůči antibiotikům (Balbas & Bolivar, 1990; Urthaler et al., 2005).

Oblasti původního bakteriálního plazmidu (Ori, selekční markery, CpG...) mohou v hostiteli vyvolat řadu nechtěných účinků jako je umlčení transgenu, anafylaktický šok či rozšíření resistance k antibiotikům do mikroflóry hostitele. Z tohoto důvodu mohou být tyto části odstraněny. Vznikají tím minicircles DNA (MC), které obsahují pouze promotor a požadovaný gen. Další výhodou MC je jejich malá velikost. Čím je úsek DNA menší, tím lépe je buňkou přijímán a má lepší schopnost transfekce (Corinne et al., 2010; Darquet et al., 1997).

MC tedy vykazují silnější a déle trvající expresi antigenu oproti plazmidům (Munye et al., 2016).

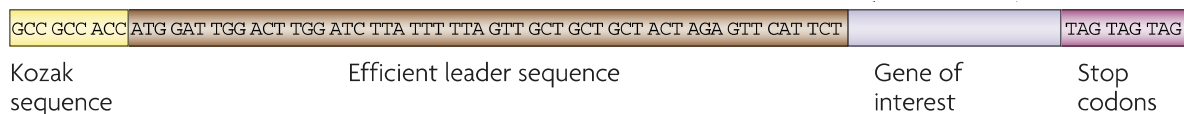
Důležitou součástí plazmidu, jak už bylo zmíněno výše, je také promotor. Zde nasedá RNA polymeráza a zahajuje se tím transkripce požadovaného genu. Původní bakteriální promotor na plazmidu nevyvolá požadovanou expresi antigenu a nahrazuje se tedy promotory jiných organismů s lepší efektivitou exprese genů a silnějšími enhancery v jejich okolí. Mezi takto využívané promotory patří např. promotor z viru SV40 (Simian virus 40) nebo lidského cytomegaloviru (Human CMV). Ten se řadí mezi nejsilnější (Zarrin et al., 1999). Díky své schopnosti exprese antigenu v široké škále buněk a tkání je to zatím nejpoužívanější virový promotor při konstrukci plazmidů (Furth et al., 1991).

Dalším, tentokrát nevirovým, promotorem je např. MHCII promotor. Ten ale musí být nejprve aktivovaný pomocí CIITA (MHC class II transactivator), jehož exprese může být zvýšena aplikací IFN- γ . Kombinací vektorů obsahující MHCII promotor a CIITA spolu s přidáním IFN- γ může být docíleno silné protilátkové imunitní odpovědi (Vanniasinkam et al., 2006). Také promotor elongačního faktoru-1 alfa (EF-1 α) představuje vhodného kandidáta pro tvorbu pDNA či MC. Při pokusech na savčích buňkách plazmidy vybavené tímto promotorem vykazovaly vyšší hodnoty exprese aplikovaných proteinů (Munye et al., 2016; Orlova et al., 2014). Vysokou transkripční schopnost v *E.coli* vykazoval promotor P70a, který je specifický pro podjednotku sigma 70. Tato jeho vlastnost by se dala dobře využít při přípravě mRNA v bakteriálních kulturách či lyzátech (Marshall & Noireaux, 2019).

Dalším typem používaných promotorů jsou promotory vlastní hostiteli. Ty mohou být specifické pro jednotlivé typy tkání a buněk hostitele a dá se tímto způsobem regulovat i místo exprese antigenu. Jedním z nich je například promotor svalové kreatinkinázy, který exprimuje antigen hlavně ve svalových buňkách. Oproti virovým promotorům ale vykazuje menší efektivitu, proto se často vytvářejí kombinované hybridní promotory zajišťující vysokou specifitu i efektivitu exprese antigenu (Bojak et al., 2002).

Zvýšit účinnost DNA vakcín jde také cílením exprese antigenu přímo do DCs. Mezi silné savčí DCs specifické promotory patří promotor pro dendritický transmembránový protein (DC-STAMP), aktivující CD4+ i CD8+ T lymfocyty, nebo Fascin-1 navozující buněčnou imunitní odpověď (Moulin et al., 2012; Ross et al., 2003).

Po promotoru následuje námi vložený gen, tzv. GOI (the gene of interest). Jedná se o sekvenci kódující imunogenní antigen získaný z patogenu. Jak je znázorněno na obr. 7, jako každý jiný gen má GOI na začátku sekvenci pomáhající rozpoznat iniciační kodon (AUG) ribozomem. Využívá se Kozakova sekvence, aby byla kompatibilní s translačním mechanismem hostitele. Dále následuje leader sekvence (jinak UTR, 5' nepřekládaná oblast) regulující translaci a gen je zakončen terminační oblastí obsahující stop kodony (UAA, UAG nebo UGA) (S. Wang et al., 2006).



Obrázek 7: Struktura optimalizovaného genu pro vakcinaci pDNA (Kutzler & Weiner, 2008).

Důležitou součástí plazmidu je také Poly(A) oblast kódující polyA ocásek na 3' konci mRNA. Ten slouží jako terminační signál pro ukončení transkripce, chrání mRNA před degradací a podílí se na exportu mRNA z jádra.

Optimalizace kodónů je také důležitou součástí úprav DNA vakcín. Každý organismus má vlastní soubor nejčastěji používaných transferových RNA (tRNA). Těch je v buňce produkováno nejvíce, zatímco těch vzácněji využívaných je méně. Pro vysokou efektivitu translace aplikovaných genů je nejpříhodnější využívat právě ty kodony, ke kterým má hostitelská buňka nejvíce odpovídajících tRNA (Nagata et al., 1999).

5.2. mRNA vakcíny

V posledních letech se výzkum NK vakcín stále více zaměřuje na využití mRNA v boji proti infekčním onemocněním. Oproti DNA vakcínám se mRNA nepotřebuje dostat až do samotného jádra buňky, k expresi antigenu potřebuje pouze translační aparát nacházející se v cytoplasmě. Je zde tedy o jednu překážku méně, kterou musí mRNA vakcína překonat při transfekci buňky a odpadáá tím i otázka mutagenese integrací nukleové kyseliny do genomu hostitele.

Molekuly mRNA je možno připravit oproti pDNA buď v bezbuněčných systémech pouze pomocí buněčných lyzátů (tato metoda se ale častěji využívá pro syntézu proteinů) (Marshall & Noireaux, 2019), nebo zcela synteticky tzv. *in vitro* transkripcí (IVT, *in vitro* transcription). Nejprve je potřeba sestavit templát (pDNA), ze kterého se bude posléze požadovaná mRNA transkribovat. Ten musí obsahovat silný promotor pro nasednutí DNA dependentní RNA polymerázy (promotor bakteriofága T7, T3 apod.) a sekvenci požadované mRNA s kódovaným antigenem. pDNA se poté linearizuje restričními enzymy, je přidána DNA dependentní RNA polymeráza a směs ribonukleosid trifosfátů a může být zahájena samotná transkripce. Templátová DNA se nakonec degraduje přidáním deoxyribonukleázy a celý objem je purifikován (Baiersdörfer et al., 2019; Beckert & Masquida, 2011).

Přestože se mRNA vakcíny zdají býti lepší volbou než pDNA v boji proti infekčním onemocněním, mRNA se potýká s jinými problémy, které brání jejímu plnému využití. Jedním z nich je právě její schopnost vyvolávat nadměrné zánětlivé reakce a molekulární nestabilita. Obdobně jako pDNA musí být tedy mRNA nejprve optimalizována a může se tak dít hned na několika úrovních.

Pro translaci genu v eukaryotickém hostiteli je zásadní 5' cap (5' čepička), která se nachází hned za začátkem molekuly a chrání ji tak před degradací. Mimo jiné je také rozpoznávána eukaryotním transkripčním iniciačním faktorem E4 (eIF4E) a podílí se tak na iniciaci translace. Eukaryotní 5' cap je metylovaný guanosin (m^7G , 7-methylguanosine) připojený k 5' konci molekuly RNA 5'-5' můstkem přes tři fosfáty (m^7GpppN). Pro optimalizaci stability mRNA a vyšší exprese antigenu může být m^7G cap nahrazena jejími analogy. Využívají se nejrůznější chemicky upravované analogy, mezi které patří také tzv. anti-reverse cap analogs (ARCAs). Při syntéze 5' cap se může stát, že se naváže v opačném směru, tedy 3'-5'. Takto navázaná čepička pak není rozpoznána eIF4E a není tedy zahájena translace. U ARCAs je ribóza metylovaného nukleotidu modifikovaná buď na C2 nebo C3 a nedochází tím k opačnému navázání čepičky. mRNA obsahující ARCAs vykazovaly oproti klasické čepičce vyšší míru translace, kvůli snížení množství špatně navázaných čepiček (Stepinski et al., 2001).

I ARCA se ale mohou dále modifikovat. Například použitím fosfotioátové čepičky (β -S-ARCA) bylo docíleno lepší stability molekuly mRNA a tedy i efektivnější translace u naivních DCs (Kuhn et al., 2010).

Další možností jsou tzv. 2S analogy. Ty obsahují 1,2-dithiodifosfátovou skupinu a můstek ze tří nebo čtyř fosfátů. Vykazují lepší afinitu k eIF4E a také chrání mRNA před odstraňováním čepiček enzymy (decapping enzyme). Díky těmto vlastnostem vykazují mRNA obsahující tyto analogy vyšší efektivitu translace (Strenkowska et al., 2016).

Jednou z nejnovějších metod jsou tzv. „CleanCap“. Jedná se o iniciační trimer nukleotidů obsahující klasickou čepičku, který je na molekulu mRNA přidán kotranskripčně. Pro představu, při použití m^7GpppA_mG se A a G páruje s templátovými T a C na pozici 1+ a 2+. Elongace mRNA poté započne přidáním nukleosid-trifosfátu na pozici 3+ (Vaidyanathan et al., 2018).

5' a 3' UTR oblasti hrají významnou roli v poločas rozpadu molekuly mRNA a efektivitě translace. 3'UTR obsahuje oblasti regulující polyadenylaci a také se zde mohou nacházet oblasti bohaté na adenylát a uridylát (AREs, AU-rich elements). Jedná se o sekvence AUUUA motivů, které napomáhají degradaci mRNA (Ysla et al., 2008). Nejčastěji používaným UTR při syntéze mRNA v laboratořích je lidský β -globin 3'UTR, který dokáže prodloužit poločas rozpadu molekuly na více jak 32 hodin (Adibzadeh et al., 2019; Holtkamp et al., 2006).

mRNA je zakončena polyA ocáskem. Jedná se o sekvenci jednotek adeninu, která chrání celou molekulu před degradací. Důležitá je především jeho délka, která určuje životnost celé molekuly. Využití sekvencí delších než 120 nukleotidů napomáhá zpomalit degradaci molekuly, zlepšuje její stabilitu a zvýší se tím i množství translatovaného antigenu (Holtkamp et al., 2006).

PolyA ocásek se při přípravě mRNA může na molekulu připojit buď posttranskripčně pomocí poly(A) polymerázy, nebo se může sekvence ocásku zakódovat přímo do templátové pDNA. Tímto způsobem bychom získali u všech molekul stejnou délku ocásku a jednalo by se o usnadnění celého procesu výroby mRNA. Bohužel homopolymerní sekvence polyA více než 175 párů bází není v cirkulárním plazmidu stabilní. Linearizací plazmidu pEVL bylo možno získat polyA ocásky dlouhé až 500 nukleotidů. Takto prodloužené mRNA vykazovaly vyšší míru translace v lidských T lymfocytech (Grier et al., 2016).

Stejně jako u DNA vakcín můžeme i zde GOI upravit pomocí optimalizace kodónů nebo adicí modifikovaných nukleosidů (nucleoside base modification). Exogenně dodaná mRNA je hostitelem rozpoznávána endozomálními TLR3, TLR7 a TLR8 jako PAMPs a spouští vrozenou imunitní odpověď produkcí interferonů. Z tohoto důvodu jsou do mRNA vkládány modifikované nukleosidy jako je pseudouridin, 5-metylcytidin, 5-metyluridin, nebo N6-metyladenosin, které brání rozpoznání TLRs a zabraňují tak vzniku nadměrné zánětlivé reakce (Karikó et al., 2005).

Speciálně TLR3 rozeznávají struktury dvouřetězcové RNA (dsRNA), které jsou v organismech neprirozené. Jedná se o znak virového napadení a spouští se tím degradace komplementární mRNA pomocí RNA interference. Vylepšit míru translace antigenu a snížit imunogenicitu mRNA vakcín lze také během jejich přípravy pomocí vysokotlaké kapalínové chromatografie (High-performance liquid chromatography, HPLC), která efektivně odstraňuje nechtěné kontaminace, mezi které patří i dvouřetězcové úseky RNA vzniklé během přípravy (Karikó et al., 2011). Jednou z nejnovějších metod odstranění dsRNA je jejich selektivní

zachytávání na celulózovou kaši v etanolovém pufru. Je to spolehlivá a rychlá metoda, která je oproti HPLC mnohem jednodušší a levnější (Baiersdörfer et al., 2019).

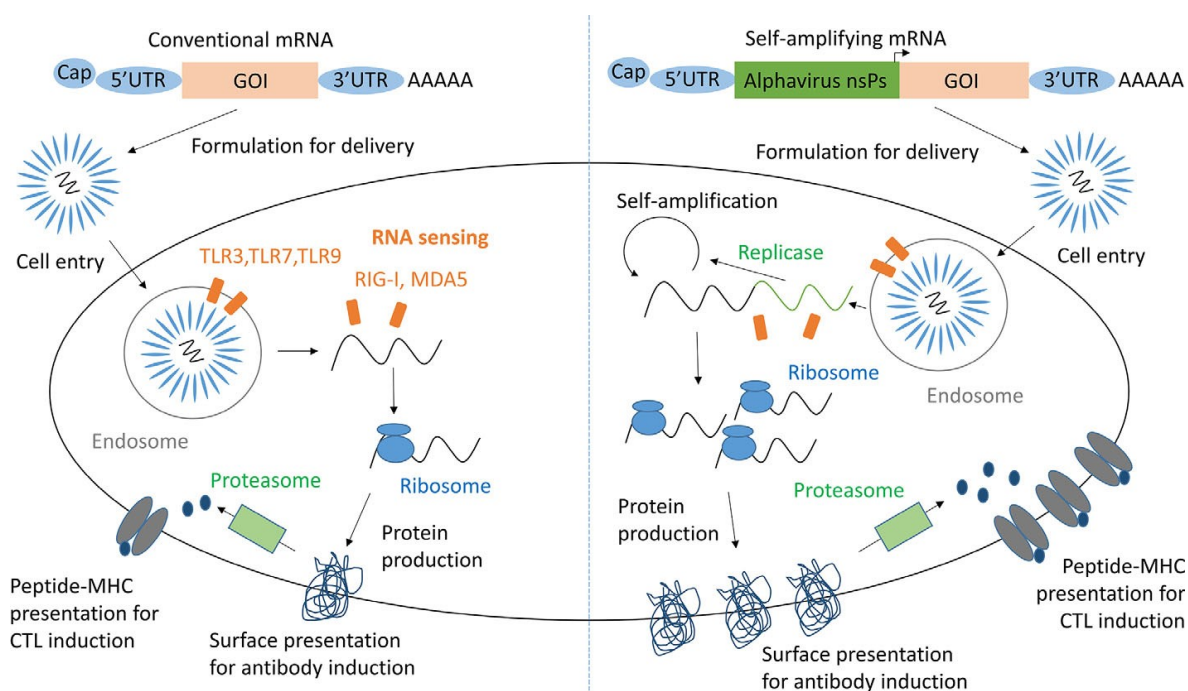
5.2.1. Samo-amplifikující mRNA

Speciálním typem mRNA je tzv. samo-amplifikující mRNA (self-amplifying mRNA, SAM). Nejčastěji je založena na genomu alphavirů, patřící do rodiny *Togaviridae*, které obsahují pozitivní jednořetězcovou RNA (+ssRNA). Všechny geny pro strukturální proteiny viru jsou odstraněny a nahrazeny GOI. Z původního vlákna zde zůstanou všechny základní části funkční mRNA (5' cap, 3'UTR, 5'UTR, polyA) a také oblast zodpovědná za replikaci molekuly. Ta obsahuje geny pro nestrukturní proteiny tvořící dohromady RNA dependentní RNA polymerázu, jinak nazývanou replikáza (Perri et al., 2003).

Díky tomu se SAM může v hostitelské buňce sama amplifikovat a navyšovat tak množství exprimovaného antigenu. Oproti konvenční mRNA tedy stačí vakcinovat menší dávkou SAM pro dosažení porovnatelného účinku (Vogel et al., 2018).

Jejich příprava se od konvenčních mRNA nijak výrazně neliší, oba druhy se syntetizují stejnými mechanismy, potřebují stejnou optimalizaci, potýkají se se stejnými problémy.

Níže na obr. 8 jsou ukázány rozdíly ve struktuře a mechanismech produkce antigenů mezi výše zmíněnými konvenčními mRNA a samo-amplifikujícími mRNA.



Obrázek 8: Rozdíly ve struktuře a mechanismech exprese antigenu v hostitelské buňce mezi konvenční mRNA a samo-amplifikující mRNA (Sandbrink & Shattock, 2020).

6. Způsoby dopravy nukleové kyseliny do buňky

6.1. Fyzické metody

Klasickým způsobem podání vakcinační látky do těla hostitele je aplikace pomocí injekce. Podle místa vpichu můžeme injekce rozdělit na intramuskulární, intradermální či subkutánní.

Existují ale i inovativnější a často méně invazivní způsoby dopravy, které zároveň zlepšují absorpci NK buňkou.

Mezi ně patří například Biojector neboli Jet delivery. Využívá se vysokotlakého proudu stlačené oxidu uhličitého (CO₂), který umožní vakcinační látce proniknout kůži bez použití jehly. Byla zaznamenána výrazně lepší absorpce NK buňkami svaloviny a kůže oproti klasické vakcinaci jehlou (Manam et al., 2000).

Gene gun představuje biolistický způsob dopravy nukleové kyseliny vázané na zlatých mikročásticích, které jsou vystřelené pomocí stlačeného helia (He). Při použití tlaku He 800 psi bylo docíleno dopravy zlatých částic až do bazálních vrstev lidské pokožky (epidermis), kde došlo k přímé transfekci Langerhansových buněk (pokožkové dendritické buňky, LC). Ty následně rychleji migrují do lymfatických uzlin a prezentují antigen na svých MHC I. I podání samotných zlatých částic bez NK stimuluje LC k migraci, a to pravděpodobně díky mechanickému poškození buněk. Cílení na DCs hostitele by jednoznačně zefektivnilo a urychlilo celý proces vakcinace (Larregina et al., 2001).

Metodou, která je nejpodobnější klasické injekci, jsou tzv. microneedles (MN). Mikro Jehličky o dané velikosti (nejčastěji kolem 750-650 μm) dovolují dodat vakcinační látku do přesně určené hloubky kůže, což napomáhá cílit na APC. Jsou zároveň méně invazivní a bezbolestné.

Microneedles se dají rozdělit na 4 subtypy:

- a) Pevné MN, které se nejprve musí namáčet do vakcinační látky, dokud nedojde k dostatečnému přilnutí NK na povrch jehliček (až 100 ponoření). Následně takto obalené jehličky penetrují kůži (Pearton et al., 2012).
- b) Pevné MN, které se neobalují NK. Nejprve se kůže ošetří roztokem NK a až poté je penetrována MN. Vytvoří se tím mikrokanálky pro vstup NK do požadované hloubky kůže (Birchall et al., 2008).
- c) Rozpustné MN z biopolymerů, které se opět obalí NK. Při penetraci kůže se ale při kontaktu s tkáňovým mokem rozpustí a uvolní NK (Sullivan et al., 2010).
- d) Duté MN, které dodají NK podobně jako klasická vakcinace injekcí – vstříkem malého množství tekutiny, ale dochází přitom k mnohem menšímu poškození kůže (Daugimont et al., 2010)

Další často využívanou technikou pro dopravu celé řady látek do buněk je elektroporace. Pomocí elektrických pulzů se docílí krátkodobého narušení cytoplazmatické membrány a umožní se NK jednodušeji vstoupit do buňky. Tím se zvýší i celková exprese kódovaného antigenu a zvýší se imunitní odpověď. Pravděpodobně může docházet i k dočasnému narušení jaderné membrány, což by umožnilo snadnější dopravu DNA do jádra nedělících se buněk (Widera et al., 2000).

6.2. Chemické metody

Aby se nukleová kyselina dostala do cílového místa a došlo k expresi antigenu, musí překonat hned několik překážek. Musí přežít v extracelulárním prostředí, překonat

cytoplazmatickou membránu, uniknout z endozomu a v případě DNA vakcín se musí dostat až do jádra přes jadernou membránu.

Extracelulární prostředí je velmi nepřátelské k volným nukleovým kyselinám a dochází zde k jejich rychlé degradaci díky přítomným nukleázám. Až 99 % volné pDNA je degradováno do 90 minut po její injekci. Jedná se z velké části o aktivitu endonukleáz (enzymy štěpící NK uprostřed řetězce). Podle typu NK a typu tkáně se na degradaci mohou více či méně podílet i exonukleázy (enzymy štěpící NK od konců) (Barry et al., 1999). Z tohoto důvodu jsou NK do buněk dopravovány pomocí nosičů, které je chrání před degradací, usnadňují jejich dopravu do buněk a zvyšují tak efektivitu vakcinace.

V následujících kapitolách je zmíněno pár vybraných příkladů takovýchto nosičů spolu s jejich hlavními vlastnostmi, přednostmi a případně překážkami jejich použití. Jedná se pouze o základní výběr nejpoužívanějších nosičů. Stále se syntetizují nové vhodné látky a jen kombinací těch stávajících vzniká nespočet možností složení nanočástic.

6.2.1. Lipidy

Nejčastěji používanými a nejlépe vyzkoušenými složkami, které se využívají pro dopravu NK do buňky jsou lipidy a komplexy z nich složené. Nejjednodušší jsou tzv. lipozomy. Jedná se o váčky z fosfolipidové dvojvrstvy, do kterých se uzavřou molekuly NK. Takovéto komplexy se souhrnně nazývají jako lipoplexy (LP) a pro dopravu NK do buňky pomocí těchto lipoplexů byl zaveden termín lipofekce.

Lipidické složení váčků může být velmi pestré a odvíjí se od něj celá řada jejich výsledných vlastností. Nejvyužívanějším typem jsou kationtové lipozomy (CL) obsahující lipidy, jako jsou např. 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan (DOTAP), 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propan (DOTMA) nebo 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE). Díky svému pozitivnímu náboji CL lépe interagují s negativně nabitými fosfátovými skupinami NK a usnadňují tak jejich přípravu. NK se smíchá s lipozomy a spontánně se vytvoří komplexy lipoplexů. Pozitivní náboj váčků zároveň napomáhá interakci s negativně nabitou plazmatickou membránou buněk hostitele (Felgner et al., 1987).

Při vakcinaci myší mRNA kódující protein Gag viru lidské imunitní nedostatečnosti (Human immunodeficiency virus, HIV) byla po přidání DOTAP:DOPE CL naměřena silnější cytotoxická i protilátková imunitní odpověď a indukce germinálních center (Pollard et al., 2013). Chemické vzorce lipidů použité ve výše zmíněné studii jsou uvedeny na obr. 9.

Lipid	Name
$\begin{array}{l} \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CO}-\text{O} \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{CH}-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$	DOTAP
$\begin{array}{l} \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CO}-\text{O} \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2 \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \text{CH}-\text{CH}_2-\text{O} \begin{array}{l} \text{O} \\ \\ \text{P}-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3 \\ \text{O} \end{array}$	DOPE (+) [†]

Obrázek 9: Chemické vzorce vybraných lipidů DOTAP a DOPE využívaných při přípravě kationtovým lipozomů (Midoux & Pichon, 2014).

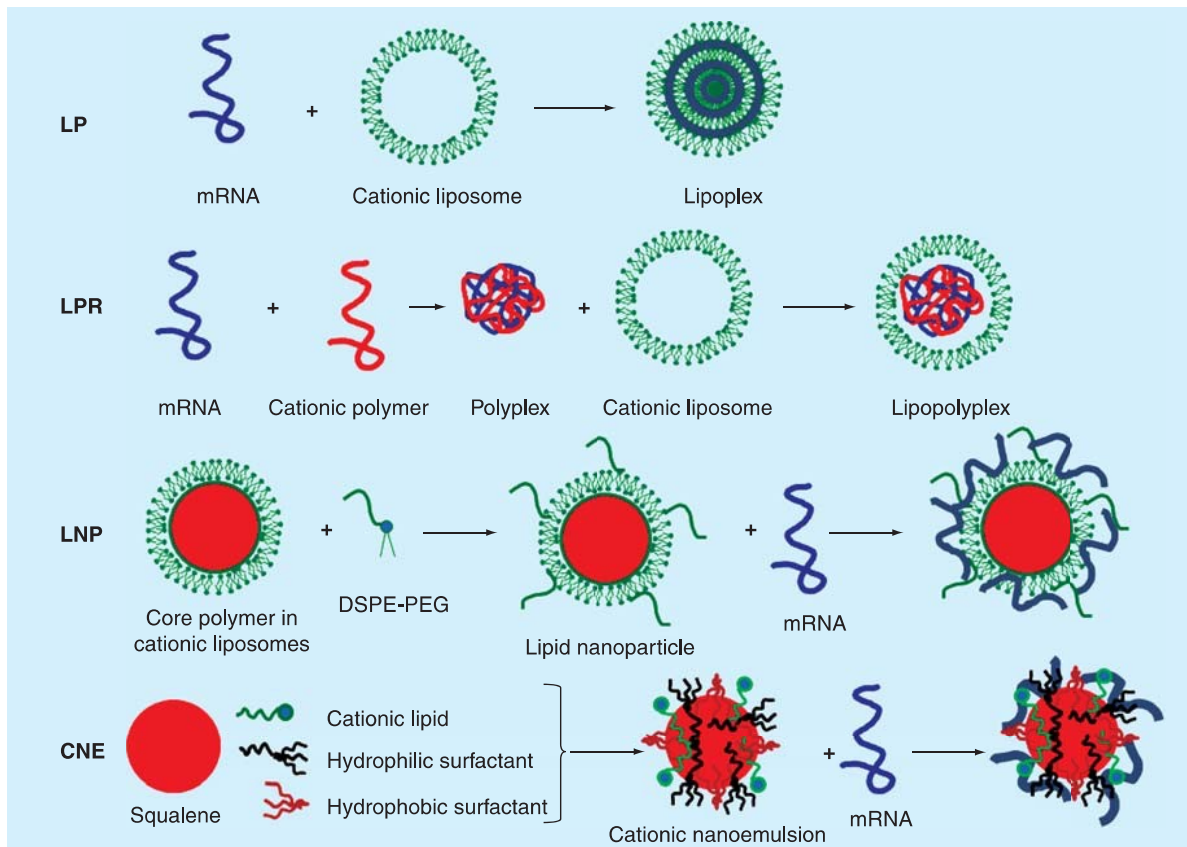
Na druhou stranu kationtové lipoplexy ale vykazují oproti neutrálním či aniontovým lipoplexům mnohem vyšší toxicitu. CL a pDNA podané samostatně toxické nejsou, spojením v lipoplex se ale jejich toxicita silně zvýší. V lipofektovaných buňkách byla naměřena vyšší exprese pro-apoptických genů a také zvýšené hodnoty IL-6 a IFN- α . Tyto cytokiny se rovněž podílejí na indukci apoptózy (Nguyen et al., 2007). V porovnání s aniontovými lipozomy, které vykazují téměř stejnou míru transfekce DNA, byla naměřena až o 40 % vyšší toxicita kationtových lipozomů (Patil et al., 2004). Přesnější mechanismus působení toxicity CL je stále předmětem mnoha výzkumů.

LP se do buňky dostávají nejčastěji klathrin-dependentní endocytózou následovanou únikem z endozomu. Dochází k flip-flop výměně záporně nabitých fosfolipidů na povrchu buňky, dojde k vyvážení nábojů a tvorbě neutrálně nabitých fosfolipidových párů. Tím dochází k fúzi obou membrán a k uvolnění záporně nabitě DNA do cytosolu (Rejman et al., 2005; Xu & Szoka, 1996). Při dopravě NK do buněk pomocí lipozomů se může nukleová kyselina nejprve spojit s kationtovým polymerem a ten se následně uzavře do lipozomu za vzniku tzv. lipopolyplexu (LPR/LPD). Pro tvorbu polymeru se využívají například poly(L-lysin) (PLL), protamin či poly(L-ornitin). Polymer chrání DNA před nukleázami, výsledné komplexy mají oproti klasickým lipozomům menší velikost (okolo 100 nm) a tím se zlepšuje i jejich transfekční aktivita. Jedním z důvodů může být fakt, že pomocí endocytózy jsou lépe přijímány spíše menší částice. Zároveň by PLL či protamin mohly sloužit jako jaderný lokalizační signál a dopravit DNA až do samotného jádra buňky (Gao & Huang, 1996).

Lipidické nanočástice (LNP) se skládají z polymerního jádra [např. poly(β -aminoester)] obaleného CL, který snižuje toxicitu jádra. NK je navázána na povrchu částice díky svému negativnímu náboji. CL může být navíc obohacený o 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-poly(ethylen glykol) (DSPE-PEG), což zamezuje agregaci částic a usnadňuje tím jejich resuspendaci a čištění (Su et al., 2011).

Pro dopravu samo-amplifikující mRNA se například využívá metoda pomocí kationtových nanoemulzí (CNE). Jedná se o částice připravené z kationtového peptidu (např. DOTAP), skvalenu, hydrofóbních a hydrofilních látek, které následně na svůj povrch váží molekuly SAM (Brito et al., 2014).

Schématické znázornění složení jednotlivých typů lipidických nosičů, kterými jsem se do této chvíle zabírala, je na obr. 10.



Obrázek 10: Typy a složení jednotlivých komplexů obsahující lipidy, které se využívají pro dopravu mRNA do buňky (Midoux & Pichon, 2014).

V neposlední řadě se také využívají tzv. virosomy, což jsou lipozomům podobné váčky s přidanými virovými glykoproteiny. Využívají se pro dopravu léčiv do buněk a mohou být vhodnou alternativou pro dopravu NK při vakcinaci. Svým složením mimikují obalené viry a uzavřením kondenzované NK do lumen váčku je NK dobře chráněná před její degradací. Jednotlivé glykoproteiny získané z různých virů se liší svou vazbou na buněčné receptory, schopností fúze s hostitelskou membránou a mohou tak cílit na různé typy buněk. Glykoprotein hemagglutinin (HA) získaný z viru chřipky se váže na sialovou kyselinu na povrchu cílových buněk, navozuje endocytózu a fúzi membrán. Je zde ale riziko rozpoznání HA hostitelskými protilátkami z dříve prodělané chřipkové infekce. To může vést ke snížení účinnosti transfekce (De Jonge et al., 2007).

6.2.2. Polymery

Pro dopravu NK lze využít také celou řadu kationtových polymerů jako jsou například poly(L-lysin) (PLL), polyethylenimin (PEI), poly(β -aminoester) (PBAE), polylactic-co-glykolová kyselina (PLGA), chitosan a další. Podobně jako u lipozomů, díky svému kladnému náboji dobře interagují s negativně nabitou NK a tvoří polyplex, který se následně může obohatit např. lipidy, peptidy či dalšími polymery (Gao & Huang, 1996).

PLL je přírodní biodegradabilní polymer, který dokáže silně vázat NK a kondenzovat ji do stabilních částic. Kvůli tomu pravděpodobně ale nedokáže NK efektivně uvolnit do cytosolu buňky a oproti PEI vykazuje menší efektivitu transfekce. Zároveň má PLL problém uniknout

z endozomu a zůstává v nich uvězněn. PEI oproti tomu vynikal svou rychlostí uvolnění NK a endozomálního úniku. PEI částice jsou přijímány buňkou klathrin-dependentní i kaveolární endocytózou. K efektivní transfekci dochází ale pouze u kaveolární cesty. NK musí z endozomu uniknout ještě před fúzí vakuolu s lysozomem, klathrin u klathrin-dependentní endocytózy ale brání roztržení vakuolu a NK je tak degradována (Itaka et al., 2004; Rejman et al., 2005).

Klasický únik z endozomu polymerů je zajištěn pomocí proton-sponge efektu. Aminokupiny polymerních látek jsou při fyziologickém pH do určité míry protonovány (pufrační kapacita). Při acidifikaci endozomu dochází ke vstupu H^+ a Cl^- do lumen vakuolu, ale vodíkové protony jsou vázány zbylými neprotonovanými aminokupinami polymeru. Vytvoří se tak nadbytek chloridových aniontů, které způsobí osmotický otok (osmotic swelling) endozomu. V lumen vakuolu se začne hromadit voda, která následně způsobí roztržení vakuolu a uvolnění jeho vnitřního obsahu do cytosolu buňky (Behr, 1997). Pufrací kapacita PEI byla pozorována *in situ* při dopravě polymeru do buňky současně s pH senzitivním fluorescenčním reportérem. Výsledkem byly nižší hodnoty pH kvůli odebírání protonů polymerem, než tomu bylo v lysozomálních vakuolách bez přítomnosti PEI (Roy et al., 2020).

Pro efektivní únik z endozomu lze využít i polymer PBAE, který je pH senzitivní a dobře degradovatelný. Při nízkém pH dochází k rychlému rozpuštění částic, uvolnění NK a proton-sponge efektu (Su et al., 2011).

PLGA je také polymer citlivý na změny pH a díky svým příznivým vlastnostem byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv pro terapeutické použití. Obohacením PLGA o vrstvu chitosanu dostala částice pozitivní náboj a byla také zvýšena absorpce částic makrofágy. Zároveň byly tyto částice při podání nosem schopny déle setrvat v nosní dutině díky mukoadhezivním vlastnostem chitosanu (Z. Li et al., 2016).

Chitosan, přírodní lineární polysacharid, byl dlouhou dobu využíván jako adjuvant díky své biokompatibilitě a nízké toxicitě. Jak již bylo zmíněno, má mukoadhezivní vlastnosti. Pravděpodobně dochází k elektrostatickým interakcím mezi pozitivně nabitými aminokupinami chitosanu a negativní kyselinou sialovou mucinu. (Soane et al., 2001; Vila et al., 2004).

6.2.3. Peptidy

Jelikož se samotné proteiny mohou použít jako vakcinační látka, jsou jejich vlastnosti a vlivy vůči tělu hostitele dobře prozkoumány. Jsou často využívány jako nosiče NK, nebo jsou přidávány díky svým specifickým vlastnostem k ostatním typům nosičů jako jsou např. lipopolyplexy, polymery či anorganické částice.

Jednou z hlavních cest dopravy NK do cytosolu buňky je cesta přes endozom, z kterého musí následně částice s NK uniknout ještě před jejich degradací snížením pH. K tomuto účelu slouží mnohé peptidy, které při změně pH acidifikací endozomu změny svoji konformaci a docílí tak narušení membrány endozomu a uvolnění vnitřního obsahu vakuolu do cytosolu. Tyto peptidy se označují jako peptidy penetrující cytoplazmatickou membránu a patří mezi ně např. amfipatický RALA protein. V jeho sekvenci se střídá hydrofilní arginin vázající DNA a hydrofóbní leucin interagující s lipidickou membránou. Snížením pH se změny jejich postavení v amfipatické α -helixy destabilizující membránu endozomu (McCarthy et al., 2014).

Další možností výroby proteinovým nanočástic je spojením želatiny typu B, protaminu sulfátu a pDNA. Želatina je levná dostupná netoxická látka, která má jistě potenciál ve využití pro dopravu molekul do buněk (Morán et al., 2015).

Spojením albuminu a již výše zmíněného polysacharidu chitosanu byly získány nanočástice s nižší toxicitou v porovnání s používanými polymery (PLL, PEI) a vysokou absorpcí buňkami (Karimi et al., 2014).

Virus-like particles (VLPs) mohou být díky svým vlastnostem také dalším vhodným kandidátem pro dopravu NK do buněk. Jedná se o virové proteiny schopné samouspořádání do částic podobným virům bez schopnosti se v hostiteli replikovat a způsobit tím onemocnění. Samotné prázdné viriony bez NK se již využívají díky svému exogennímu původu jako imunizační agens či jako adjuvants. Jelikož téměř dokonale mimikují infekční virovou částici, dokáží dobře vstoupit do buňky a také vázat a uvolnit NK. Modifikací kapsidy lze upravit i jejich specifitu. VLP odvozená od bakteriofága MS2, běžně napadající enterobakterie, byla schopna enkapsulovat celou řadu látek a modifikací peptidu SP94 (HCC-specific peptide) dokázala cílit výhradně na buňky hepatocelulárního karcinomu (Human hepatocellular carcinoma, HCC) (Ashley et al., 2011).

6.2.4. Anorganické částice

Hlavními klady využití zlatých nanočástic (AuNPs) pro dopravu NK je jejich snadná příprava a možnost modifikace jejich povrchu. Přidáním polyethylenglykolového řetězce se např. docílilo lepší stability nanočástic, snížení se jejich schopnosti agregace a NK byla lépe chráněna v krevním řečišti hostitele. NK je k AuNPs vázána slabšími interakcemi, než je tomu u jiných kationtových přenašečů, a díky tomu může docházet k lepšímu uvolnění NK do buňky. Efektivitu transfekce lze zvýšit využitím elektroporace (Kawano et al., 2006).

Mesoporézní silika nanočástice mají díky své porozitě oproti lipozomům stejné velikosti mnohem větší kapacitu pro navázání NK a jejich povrch snadno můžeme upravit navázáním dalších ligandů. Zásadním problémem je jejich nízká schopnost úniku z endozomálního váčku. To se ale dá vyřešit přidáním pomocných fúzogenních peptidů (Ashley et al., 2012).

Další možností je využití oxidovaných uhlíkových nanočástic vyznačující se jejich negativním nábojem a vysokou schopností pronikat fosfolipidovou membránou (Arayachukiat et al., 2015)

V neposlední řadě se dají využít i superparamagnetické nanočástice z magnetického oxidu železnato-železitého (Fe_3O_4). Pomocí magnetických sil lze částice lépe navádět na povrch cílových buněk, urychlit transfekci (v tomto případě magnetofekci) a lze docílit stejné efektivity transfekce i s malou dávkou NK (Y. Wang et al., 2014).

7. Vakcíny pro veterinární použití

Na rozdíl od vakcín proti lidským virovým onemocněním, ve veterinární oblasti se NK vakcíny začínají využívat čím dál tím častěji. Několik z nich je již schváleno a jsou využívány v běžné praxi. V závěrečné kapitole se budu převážně zabývat těmito schválenými vakcínami a také pokroky ve vývoji a výzkumu dalších NK vakcín při boji proti závažným veterinárně významným virovým onemocněním.

7.1. Rybí virová onemocnění

Ryby jsou jednou z hlavních složek potravy stále rostoucí lidské populace a jejich produkce se v posledních letech vysoce zvýšila. S rychlým rozvojem velkochovů vzrostla i potřeba zajistit zdraví rybích chovů a nutnost chránit je před celou řadou onemocnění. Ve velkých populacích dochází snadněji k rozvojem epidemii infekčních onemocnění a může snadno dojít k velkým úhynům a finančním ztrátám. Mezi přední původce virových onemocnění takto chovaných ryb patří např. virus infekční hematopoetické nekrózy (IHNV), virus virové hemoragické septikémie (VHSV) nebo Hirame novirhabdovirus (HIRRV). Dále můžeme zmínit i virus infekční nekrózy pankreatu lososů (IPNV) z rodiny *Birnaviridae*, virus infekční anemie lososů (ISAV) z rodiny *Orthomyxoviridae* či rybí orthoreovirus (PRV) z rodiny *Reoviridae*.

IHNV, stejně jako VHSV a HIRRV spadá pod rod Novirhabdovirů (*Rhabdoviridae*). Jedná se o obalené viry s negativním jednořetězcovým RNA (-ssRNA) genomem, které tvarem své kapsidy připomínají kulku. Napadá především lososy a pstruhy a způsobuje tmavnutí kůže, exophthalmii (vypouknutí oka z očníce) a krvácení do očí. Virus se replikuje převážně v hematopoetických buňkách a endoteliálních buňkách cév a způsobuje tím nekrózu ledvin, jater či sleziny. Při nedávných epidemiích IHNV roku 2016 v Iránu byla naměřena mortalita pstruhů duhových (*Oncorhynchus mykiss*) až 90 % 3 týdny po vypuknutí nákazy. Irán byl nucen snížit svou roční produkci (současně i kvůli epidemiím VHS a IHN) až o 40 000 tun (Ahmadivand et al., 2017). Dalším předním producentem ryb, především Atlantských lososů (*Salmo salar*), je Britská Kolumbie, provincie na jihozápadě Kanady. Mezi lety 2001 až 2003 postihly epidemie až 50 % všech přímořských farem a uhynulo nebo muselo být zlikvidováno až 12 milionů ryb (Saksida, 2006).

Kvůli těmto epidemiím bylo nutno rychle zakročit a zamezit tak dalším škodám. V roce 2005 schválena první DNA vakcína proti IHNV pro Atlantské lososy pro komerční využití jménem Apex-IHN®. Byla vyrobena švýcarskou firmou Novartis a prozatím je schválená k použití pouze v USA a Kanadě. Skládá se z plazmidové DNA obsahující 4 hlavní části: časný enhancer-obsahující CMV promotor, polyA signál z růstového hormonu skotu, selekční marker a gen pro virový glykoprotein. Nebyly zaznamenány žádné nepříznivé vedlejší účinky. Byl také vyvrácen přenos pDNA do rybích gonád a tedy i přenos do dalších generací. Vakcinační látka byla podána intramuskulárně a až u 50 % testovaných ryb byly detekovány v krevním séru neutralizující protilátky (Salonius et al., 2007). Glykoprotein také indukoval především produkci IFN typu I následovanou vyšší expresí genů na něm závislých. IFN typu I je důležitou součástí časně antivirové imunitní odpovědi (Purcell et al., 2006).

VHSV sdílí jako IHNV stejné charakteristiky novirhabdovirů. Při epidemiích pstruhů duhových (*Oncorhynchus mykiss*) v Iránu mezi lety 2014 až 2015 byla mortalita až 70 %. Nemoc se projevuje podobně jako IHNV tmavnutím kůže a exophthalmií. Navíc lze u nemocných jedinců pozorovat oteklé břicho a drobné krvácení kolem očí, na spodní čelisti a svalech. Histopatologicky bylo zjištěno zvětšení jater v důsledku překrvení sinusoid a nekróza ledvin spolu s degradací ledvinových kanálků. VHSV cílí převážně na endoteliální buňky cév a způsobuje tím krvácení kůže, svalů a vnitřních orgánů různého rozsahu (Ahmadivand et al., 2016). Zatím neslibnějším způsobem vakcinace se jeví opět plazmidová DNA kódující glykoprotein VHSV. Při vakcinaci pstruhů plazmidem kódující virový nukleoprotein (NP) bylo

také docíleno částečné imunity, zdaleka ale ne tak silné, jako při použití glykoproteinu. Více jak 50 % ryb očkovaných plazmidem s glykoproteinem či kombinací glykoproteinu a NP bylo séropozitivních (Lorenzen et al., 1998).

Stejně jako u předchozích zástupců rodu Novirhabdovirů se u vakcinace proti HIRRV studie zaměřují hlavně na využití specifického glykoproteinu. Při testování vakcinace pDNA na platýzech Japonských (*Paralichthys olivaceus*) byly naměřeny až dvojnásobné hodnoty exprese genů pro podjednotky MHCI a II a také pro TCR (Takano et al., 2004).

IPNV má jakožto zástupce birnavirů dvousegmentový dsRNA genom a ikosahedrální neobalenou kapsidu. Potěr infikovaný kmeny IPNV s mortalitou dosahující až 92 % vykazoval příznaky jako je tmavnutí kůže, nezvyklé plavání či ascites (hromadění tekutiny v dutině břišní). Byly nalezeny také vážné léze na játrech, slinivce břišní a na žludečních žlázách (Santi et al., 2004).

Pro vakcinaci celých chovů hospodářsky chovaných ryb je intramuskulární injekce složitou a zdlouhavou metodou. Pro zjednodušení vakcinace co největšího počtu jedinců vznikly tendence vyvinout vakcinační látku efektivní i při podání orální cestou. Tato látka ale musí přežít degradaci v trávicí soustavě, být dobře vstřebávána, indukovat dostatečnou imunitní odpověď a měla by být schopna se dobře míchat s potravou. Při pokusu vakcinace pstruhů potočních (*Salmo trutta*) a duhových (*Oncorhynchus mykiss*) byla pDNA kódující IPNV virový protein 2 (VP2) enkapsulována do alginátových mikrosfér chránící NK před degradací v žaludku. Po vakcinaci pstruzi vykazovali až třináctkrát vyšší expresi IFN a při následné experimentální infekci byla mortalita snížena na pouhých 15 % (de las Heras et al., 2010).

Další v současnosti schválenou pDNA vakcínou je CLYNAVTM od společnosti Elanco Animal Health. Byla schválena roku 2017 a chrání lososy atlantské (*Salmo salar*) před infekcí virem onemocnění pankreatu lososů (Salmon pancreas disease virus, SPDV) Jedná se o obalený *Alphavirus* z rodiny *Togaviridae* s +ssRNA genomem. U ryb infikovaných SPDV subtypem 3 byly nalezeny známky zánětu a nekrózy srdeční a kosterní svaloviny a slinivky břišní. Všechny tyto příznaky byly ale znatelně potlačeny u ryb očkovaných vakcínou CLYNAVTM. Ty také vykazovaly vyšší hodnoty neutralizujících protilátek a menší přenos viru na naivní skupinu ryb (European Medicines Agency, n.d.; Thorarinnsson et al., 2021).

7.2. Koňská virová onemocnění

West Nile virus (WNV) způsobující nemoc přenášenou komáry zvanou západonilská horečka (West Nile fever) představuje hrozbu pro celou řadu živočišných druhů včetně lidí. WNV spadá do rodiny *Flaviviridae*, což jsou obalené +ssRNA viry. Při vypuknutí WNV roku 2002 v Coloradu a Nebrasce bylo nahlášeno 1 478 případů onemocnění s úmrtností 29 %. Ztráty za uhynulé koně se došplhaly až na 600 660 dolarů a na léčbu nakažených bylo celkově vyplaceno 490 844 dolarů (USDA, 2003).

Nemoc se u koní projevuje horečkou a encefalomyelitidou (zánět mozku a míchy) projevující se lézemi na mozku (Seino et al., 2007). Jednou z možností vakcinace se stalo využití rekombinantního DNA plazmidu pCBWN kódující virový premembránový protein (PrM) a glykoprotein E. Již po jedné dávce podané intramuskulárně bylo docíleno ochrany koní proti WNV infekci. Bylo to potvrzeno vystavením vakcinovaných a nevakcinovaných koní infikovaným komárům (*Aedes albopictus*) (Davis et al., 2001). V roce 2005 byla schválena

DNA vakcína s názvem West Nile Innovator[®] pro komerční použití pro koně od společnosti Fort Dodge Animal Health/Pfizer (CDC Press Office, 2005; Cranenburgh, 2011).

Dalším závažným onemocněním je také koňská chřipka (Equine influenza, EI) z rodiny *Orthomyxoviridae*. Jedná se o obalené -ssRNA viry se segmentovaným genomem z 8 částí. Chřipkové viry se dají rozdělit do několika subtypů podle toho, jaké glykoproteiny (hemaglutinin a neuraminidázu) obsahuje virus na svém povrchu. EI způsobuje subtyp H3N8. Nemocní koně trpí únavou, kašláním, pneumonií, bronchitidou, záněty nosní sliznice, výtoky z nosu a očí a vysokými horečkami až 40°C. (Webster & Yuanji, 1991).

Jedním z příkladů je vypuknutí nákazy v roce 2018, kdy bylo v Argentině na závodistištích v provincii Mendoza nakaženo až 70 % koní. Následně byly případy onemocnění hlášeny až z šestnácti daleko od sebe vzdálených míst po celé zemi s morbiditou od 10 % do 70 % (Olguin-Perglione et al., 2020).

Při studii využití pDNA kódující virový protein HA jako experimentální vakcíny byly dvě skupiny poníků očkované pomocí gene gun a zlatých částic. Jedna skupina dostala očkovací látku přes kůži, druhá přes kůži a sliznici. Po vakcinaci vykazovala skupina očkovaná oběma způsoby současně nejvyšší hodnoty specifických IgG_a a IgG_b. Vyšší hodnoty IgA, které jsou podstatné pro ochranu proti chřipce, byly naměřeny až po vystavení všech skupin infekčnímu viru. Absence IgA po očkování mohla být z důvodu schopnosti pDNA navodit pouze Th1 odpovědi místo Th2. Přesto se ale u poníků očkovaných kůží a sliznicí neprojeví žádné klinické příznaky onemocnění. Kombinací dvou způsobů očkování bylo tedy docíleno absolutní ochrany před onemocněním (Lunn et al., 1999).

7.3. Ptačí virová onemocnění

Další velmi hospodářsky důležitou skupinou živočichů jsou ptáci, hlavně drůbež. Podobně jako u ryb, při chovu drůbeže ve velkých skupinách je mnohem větší šance na propuknutí zhoubného infekčního onemocnění. Dochází zde k mnohem snazšímu přenosu mezi jedinci a často to končí úhynem velkého množství ptactva.

Jednou z takovýchto nemocí je například ptačí chřipka, (Avian influenza, AI), která u ptáků způsobuje ztrátu chuti k jídlu, průjem, paralýzu a také cyanózu (modráni) hřebene a lalůček (Kodihalli et al., 2000).

Virus spadá, stejně jako virus EI, do rodiny *Orthomyxoviridae*. Mezi subtypy AI patří například H7N7, H5N8, H5N1 či H9N2.

Při testování imunogenicity virových proteinů byla aplikována pDNA obsahující gen pro virový NP metodou gene gun tři týdny starým kuřatům. Nebylo docíleno dostatečné imunitní odpovědi a více jak polovina pokusných kuřat po vystavení infekčnímu viru zemřela. Oproti tomu drůbež vakcinovaná pDNA kódující protein H5 byla z 86 % imunní proti subtypu H5N8. Dosažená imunita ale nechránila kuřata při infekci jiným subtypem, jako je například H7N7. Proti tomuto viru byla naopak imunní kuřata, která dostala pDNA kódující H7. Pro dosažení imunity proti oběma subtypům musela být kuřata očkována kombinací obou plazmidů (Kodihalli et al., 2000).

Zřejmě nejznámějším subtypem ptačí chřipky je vysoce patogenní kmen H5N1, který již od jeho objevení způsobil celou řadu epidemií. Byl izolován roku 1996 v Číně z husího chovu a hned roku 1997 v Hongkongu byl zaznamenán jeho první přenos na člověka. Zemřelo tehdy

6 lidí z 18 nakažených a tento fakt inicioval snahu o co nejrychlejší eradikaci tohoto onemocnění (McCargo, 2017). Vkládáním genu pro HA subtypu H5N1 do různých plazmidů byla zjištěna nejlepší exprese antigenu v buněčné kultuře kuřecích embryonálních fibroblastů při použití kodon-optimalizovaného plazmidu pCAGGoptiHA. Tento plazmid indukoval nejvyšší hodnoty neutralizačních protilátek a dokázal dokonale chránit kuřata před vypuknutím nákazy (Jiang et al., 2007). H5N1 může ale způsobit smrtelné onemocnění i u křepelek. Křepelky japonské (*Coturnix japonica*) byly intramuskulárně očkovány výše zmíněným plazmidem. Celkově byly každému jedinci podány 3 dávky vakcinační látky a již po druhé bylo možno pozorovat protilátky inhibující hemaglutinin. Vystavení infekčnímu viru (H5N1) přežily všechny křepelky, které dostávaly dávku plazmidu větší než 10 µg, zatímco všichni jedinci z kontrolní skupiny uhynuli do 4 dnů od nakažení (J. Li et al., 2012). Přímo na tento subtyp (H5N1) byla pro drůbež v roce 2017 schválena DNA vakcína firmy Agrilabs® s využitím lipid/polymerního adjuvants ENABL (AgriLabs, 2017).

DNA vakcíny jsou vyvíjeny proti celé řadě dalších ptačích infekčních onemocnění. Například proti infekční burziditě drůbeže (IBDV) byly testovány PLGA mikročástice s pDNA kódující virový VP2 podaný orálně či kápnutí do oka. U očkovaných kuřat byly po vystavení infekci nalezeny menší léze a menší počet T lymfocytů ve Fabriciově burze. Byla dokázána nižší mortalita a morbidita u více jak 80 % kuřat (Negash et al., 2013).

Dalším příkladem může být také pDNA kódující fúzogenní glykoprotein viru Newcastleké nemoci (NDV), která byla enkapsulována do PLGA nanočástic a jeho protekce proti onemocnění dosahovala až 100 % (K. Zhao et al., 2013).

Až 70 % protekce byla také získána proti viru infekční bronchitidy drůbeže (IBV) při vakcinaci pDNA obsahující gen pro glykoprotein a NP viru. Vakcinační látky byly podány orálně a nasálně pomocí atenuované *Salmonella enterica* (Jiao et al., 2011).

I proti herpesvirové enteritidě kachen (DEV) bylo testováno využití DNA vakcín. Testovaným kachnám byly intramuskulárně injikovány dva DNA plazmidy obsahující gen pro virový glykoprotein B, nebo D. U kachen očkovaných oběma plazmidy zároveň byly naměřeny výrazně vyšší hodnoty CD4+ a CD8+ T lymfocytů v periferní krvi a protekce proti onemocnění dosahovala až 70 % (Y. Zhao et al., 2014).

8. Závěr

Ve své práci jsem shrnula základní informace o tom, jakými způsoby imunitní systém reaguje na výskyt antigenu v organismu, jaká je podstata očkování a jak se vytváří dlouhodobá hostitelská imunita. Dále jsem se zabývala druhy NK vakcín, jejich složením a možnostmi jejich optimalizace z hlediska imunogenicity. Pro správnou funkci NK vakcín je také potřeba vyvinout vhodné adjuvants a zvolit adekvátní způsob dopravy do těla hostitele i do samotné hostitelské buňky. NK mají na své cestě do místa exprese bezpočet překážek, které musí překonat. Zároveň se musí chránit před degradací přítomnými nukleázami. K tomu se využívá celá řada nosičů skládající se nejčastěji z lipidů, polymerů či anorganických látek.

V závěru jsem také shrnula několik příkladů hospodářsky či veterinárně významných onemocnění ryb, koní a ptactva spolu s příklady k dnešnímu dni schválených a používaných NK vakcín.

Využití nukleových kyselin jakožto vakcinačních látek má do budoucna obrovský potenciál. Přestože je použití nosičů genetických informací DNA a RNA jako vakcín ve společnosti stále obávanou a často zavrhanou záležitostí, dosavadní studie nám potvrzují jejich bezpečnost, flexibilitu a nabízejí bezpočet možností, kterými by NK mohly přispět výzkumu v mnoha směrech. Ve veterinárním průmyslu mají již NK vakcíny několik zástupců schválených a v praxi využívaných očkovacích látek. Další z nich jsou stále ještě předmětem výzkumu. NK vakcíny proti lidským patogenům byly zatím méně úspěšné. Jedním z důvodů je jejich nízká imunogenicita a také obavy společnosti z použití nukleových kyselin jako nosičů genetické informace pro léčebné výkony. Momentálně probíhající závažná pandemie respiračního onemocnění Covid-19, způsobené koronavirem SARS-CoV-2, umožnila nastartování rychlého vývoje do té doby obávaných NK vakcín. Hlavně díky mRNA vakcínám, které byly vyvinuty díky své flexibilitě, jednoduchosti výroby a nízkým nákladům velmi rychle, mohlo být včas zakročeno proti tomuto nebezpečnému onemocnění. Jedná se o první schválené NK vakcíny pro lidi. K dnešnímu dni jsou na trhu dvě schválené mRNA vakcíny, a to od společností Moderna a Pfizer-BioNTech, které jsou založené na expresi povrchového glykoproteinu S.

Díky této nešťastné situaci by se tedy postoj společnosti vůči NK vakcínám mohl výrazně zlepšit a mohlo by se jednat o začátek jejich velkého rozvoje i v humánní medicíně. Stále je zde potřeba bojovat proti celé řadě onemocnění, ať už se jedná o další virové epidemie, alergie, rakoviny či chronická onemocnění. NK vakcíny by mohly představovat zásadní pokrok v lékařství a ochraně společnosti.

Seznam použité literatury

(* sekundární citace)

- Adibzadeh, S., Fardaei, M., Takhshid, M. A., Miri, M. R., Rafiei Dehbidi, G., Farhadi, A., Ranjbaran, R., Alavi, P., Nikouyan, N., Seyyedi, N., Naderi, S., Eskandari, A., & Behzad-Behbahani, A. (2019). Enhancing Stability of Destabilized Green Fluorescent Protein Using Chimeric mRNA Containing Human Beta-Globin 5' and 3' Untranslated Regions. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, *11*(1), 112–117. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30800251> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6359690>
- AgriLabs. (2017). *First DNA Vaccine Licensed for Chickens*. <https://www.prnewswire.com/news-releases/first-dna-vaccine-licensed-for-chickens-300554855.html>
- Ahmadvand, S., Soltani, M., Mardani, K., Shokrpour, S., Hassanzadeh, R., Ahmadpoor, M., Rahmati-Holasoo, H., & Meshkini, S. (2017). Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) outbreak in farmed rainbow trout in Iran: Viral isolation, pathological findings, molecular confirmation, and genetic analysis. *Virus Research*, *229*, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.013>
- Ahmadvand, S., Soltani, M., Mardani, K., Shokrpour, S., Rahmati-Holasoo, H., Mokhtari, A., & Hasanzadeh, R. (2016). Isolation and identification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Acta Tropica*, *156*, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.005>
- Arayachukiat, S., Seemork, J., Pan-In, P., Amornwachirabodee, K., Sangphech, N., Sansureerungsikul, T., Sathornsantikun, K., Vilaivan, C., Shigyou, K., Pienpinijtham, P., Vilaivan, T., Palaga, T., Banlunara, W., Hamada, T., & Wanichwecharungruang, S. (2015). Bringing macromolecules into cells and evading endosomes by oxidized carbon nanoparticles. *Nano Letters*, *15*(5), 3370–3376. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b00696>
- Ariotti, S., Beltman, J. B., Chodaczek, G., Hoekstra, M. E., Van Beek, A. E., Gomez-Eerland, R., Ritsma, L., Van Rheenen, J., Marée, A. F. M., Zal, T., De Boer, R. J., Haanen, J. B. A. G., & Schumacher, T. N. (2012). Tissue-resident memory CD8+ T cells continuously patrol skin epithelia to quickly recognize local antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(48), 19739–19744. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208927109>
- Arsenio, J. (2020). Single-cell analysis of CD8 T lymphocyte diversity during adaptive immunity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, *12*(2), 1–12. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1475>
- Ashley, C. E., Carnes, E. C., Phillips, G. K., Durfee, P. N., Buley, M. D., Lino, C. A., Padilla, D. P., Phillips, B., Carter, M. B., Willman, C. L., Brinker, C. J., Caldeira, J. D. C., Chackerian, B., Wharton, W., & Peabody, D. S. (2011). Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. *ACS Nano*, *5*(7), 5729–5745. <https://doi.org/10.1021/nn201397z>
- Ashley, C. E., Carnes, E. C., Phillips, G. K., Padilla, D., Paul, N., Brown, P. A., Hanna, T. N., Liu, J., Phillips, B., Mark, B., Carroll, N. J., Jiang, X., Dunphy, D. R., Willman, C. L., Petsev, N., Evans, D. G., Parikh, A. N., Chackerian, B., & Wharton, W. (2012). *The Targeted Delivery of Multicomponent Cargos to Cancer Cells via Nanoporous Particle-Supported Lipid Bilayers*. *10*(5), 389–397. <https://doi.org/10.1038/nmat2992>
- * Aversa, G., Punnonen, J., Carballido, J. M., Cocks, B. G., & de Vries, J. E. (1994). *CD40 ligand-CD40 interaction in Ig isotype switching in mature and immature human B cell*.

- Baiersdörfer, M., Boros, G., Muramatsu, H., Mahiny, A., Vlatkovic, I., Sahin, U., & Karikó, K. (2019). A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro Transcribed mRNA. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *15*(April), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.018>
- * Balbas, P., & Bolivar, F. (1990). *Design and Construction of Expression Plasmid Vectors in Escherichia coli*. *185*, 14–37.
- * Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Brière, F., Galizzi, J. P., Van Kooten, C., Liu, Y. J., Rousset, F., & Saeland, S. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annual Review of Immunology*, *12*(ii), 881–922. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.12.1.881>
- Barry, M. E., Pinto-González, D., Orson, F. M., McKenzie, G. J., Petry, G. R., & Barry, M. A. (1999). Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. *Human Gene Therapy*, *10*(15), 2461–2480. <https://doi.org/10.1089/10430349950016816>
- Beckert, B., & Masquida, B. (2011). Synthesis of RNA by In Vitro Transcription. *RNA: Methods and Protocols Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *703*, 298–299. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-248-9>
- Behr, J. P. (1997). The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia*, *51*(1–2), 34–36.
- * Belkaid, Y., & Tarbell, K. (2009). Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annual Review of Immunology*, *27*, 551–589. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132723>
- Birchall, J., Coulman, S., Pearton, M., Allender, C., Brain, K., Anstey, A., Gateley, C., Wilke, N., Morrissey, A., Birchall, J., Coulman, S., Pearton, M., Allender, C., Brain, K., Anstey, A., Gateley, C., Wilke, N., Morrissey, A., Dna, C., ... Morrissey, A. (2008). *Cutaneous DNA delivery and gene expression in ex vivo human skin explants via wet-etch microfabricated microneedles*. *2330*. <https://doi.org/10.1080/10611860500383705>
- Bojak, A., Hammer, D., Wolf, H., & Wagner, R. (2002). Muscle specific versus ubiquitous expression of Gag based HIV-1 DNA vaccines: A comparative analysis. *Vaccine*, *20*(15), 1975–1979. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00081-6](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00081-6)
- Brière, F., Servet-Delprat, C., Bridon, J. M., Saint-Remy, J. M., & Banchereau, J. (1994). Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *Journal of Experimental Medicine*, *179*(2), 757–762. <https://doi.org/10.1084/jem.179.2.757>
- Brito, L. A., Chan, M., Shaw, C. A., Hekele, A., Carsillo, T., Schaefer, M., Archer, J., Seubert, A., Otten, G. R., Beard, C. W., Dey, A. K., Lilja, A., Valiante, N. M., Mason, P. W., Mandl, C. W., Barnett, S. W., Dormitzer, P. R., Ulmer, J. B., Singh, M., ... Geall, A. J. (2014). A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. *Molecular Therapy*, *22*(12), 2118–2129. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.133>
- CDC Press Office. (2005). *CDC and Fort Dodge Animal Health Achieve First Licensed DNA Vaccine*. <https://www.cdc.gov/media/pressrel/r050718.htm>
- * Coffman, R. L., Leberman, D. A., & Rothman, P. (1993). Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Advances in Immunology*, *54*, 229–270. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60536-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60536-2)
- Corinne, M., Gaele, V., Mickael, Q., Magali, R., Pr at, V., & Scherman, D. (2010). pFARs, Plasmid free of antibiotic resistance markers, display high-level transgene expression in muscle, skin and tumour cell. *Journal of Gene Medicine*, *12*, 323–332. <https://doi.org/10.1002/jgm>
- Cranenburgh, R. (2011). DNA Vaccine Delivery. *BioPharm International*, *October*, 12–18.
- Darquet, A. M., Cameron, B., Wils, P., Scherman, D., & Crouzet, J. (1997). A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: Supercoiled minicircle. *Gene Therapy*, *4*(12), 1341–

1349. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300540>
- Daugimont, L., Baron, N., Vandermeulen, G., Pavselj, N., Miklavcic, D., Jullien, M. C., Cabodevila, G., Mir, L. M., & Pr eat, V. (2010). Hollow microneedle arrays for intradermal drug delivery and DNA electroporation. *Journal of Membrane Biology*, 236(1), 117–125. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9283-0>
- Davis, B. S., Chang, G.-J. J., Cropp, B., Roehrig, J. T., Martin, D. A., Mitchell, C. J., Bowen, R., & Bunning, M. L. (2001). West Nile Virus Recombinant DNA Vaccine Protects Mouse and Horse from Virus Challenge and Expresses In Vitro a Noninfectious Recombinant Antigen That Can Be Used in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Journal of Virology*, 75(9), 4040–4047. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.9.4040-4047.2001>
- De Jonge, J., Leenhouts, J. M., Holtrop, M., Schoen, P., Scherrer, P., Cullis, P. R., Wilschut, J., & Huckriede, A. (2007). Cellular gene transfer mediated by influenza virosomes with encapsulated plasmid DNA. *Biochemical Journal*, 405(1), 41–49. <https://doi.org/10.1042/BJ20061756>
- de las Heras, A. I., Rodríguez Saint-Jean, S., & Pérez-Prieto, S. I. (2010). Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(4), 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.12.006>
- * den Haan, J. M. M., Arens, R., & van Zelm, M. C. (2014). The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology Letters*, 162(2), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.10.011>
- European Medicines Agency. (n.d.). *Clynav vaccine*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/clynav>
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., & Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7413–7417. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413>
- Furth, P. A., Hennighausen, L., Baker, C., Beatty, B., & Woycick, R. (1991). The variability in activity of the universally expressed human cytomegalovirus immediate early gene 1 enhancer/promoter in transgenic mice. *Nucleic Acids Research*, 19(22), 6205–6208. <https://doi.org/10.1093/nar/19.22.6205>
- * Galli, S. J., Grimbaldston, M., & Tsai, M. (2010). Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of innate and acquired immunity. *Nat Rev Immunol*, 8(6), 478–486. <https://doi.org/10.1038/nri2327>
- Gao, X., & Huang, L. (1996). Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry*, 35(3), 1027–1036. <https://doi.org/10.1021/bi952436a>
- Garg, R., Kaur, M., Saxena, A., Prasad, R., & Bhatnagar, R. (2017). Alum adjuvanted rabies DNA vaccine confers 80% protection against lethal 50 LD50 rabies challenge virus standard strain. *Molecular Immunology*, 85, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.011>
- * Girardi, M. (2007). Cutaneous Perspectives on Adaptive Immunity. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 33(1–2), 4–14. <https://doi.org/10.1007/s12016-007-0040-9>
- Grier, A. E., Burleigh, S., Sahni, J., Clough, C. A., Cardot, V., Choe, D. C., Krutein, M. C., Rawlings, D. J., Jensen, M. C., Scharenberg, A. M., & Jacoby, K. (2016). pEVL: A Linear Plasmid for Generating mRNA IVT Templates With Extended Encoded Poly(A) Sequences. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 5(October 2015), e306. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.21>
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., & Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), 740–745.

- <https://doi.org/10.1038/35047123>
- Holtkamp, S., Kreiter, S., Selmi, A., Simon, P., Koslowski, M., Huber, C., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2006). Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood*, *108*(13), 4009–4017. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015024>
- Chang, H. C. (2006). CpG oligodeoxynucleotides as DNA adjuvants in vertebrates and their applications in immunotherapy. *International Immunopharmacology*, *6*(10), 1586–1596. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.06.001>
- Chow, Y. H., Chiang, B. L., Lee, Y. L., Chi, W. K., Lin, W. C., Chen, Y. T., & Tao, M. H. (1998). Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *The Journal of Immunology*, *160*(3), 1320–1329.
- Ise, W., Inoue, T., McLachlan, J. B., Kometani, K., Kubo, M., Okada, T., & Kurosaki, T. (2014). Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(32), 11792–11797. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404671111>
- Itaka, K., Harada, A., Yamasaki, Y., Nakamura, K., Kawaguchi, H., & Kataoka, K. (2004). In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intracytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine. *Journal of Gene Medicine*, *6*(1), 76–84. <https://doi.org/10.1002/jgm.470>
- Jiang, Y., Yu, K., Zhang, H., Zhang, P., Li, C., Tian, G., Li, Y., Wang, X., Ge, J., Bu, Z., & Chen, H. (2007). Enhanced protective efficacy of H5 subtype avian influenza DNA vaccine with codon optimized HA gene in a pCAGGS plasmid vector. *Antiviral Research*, *75*(3), 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.03.009>
- Jiao, H., Pan, Z., Yin, Y., Geng, S., Sun, L., & Jiao, X. (2011). Oral and nasal DNA vaccines delivered by attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium induce a protective immune response against infectious bronchitis in chickens. *Clinical and Vaccine Immunology*, *18*(7), 1041–1045. <https://doi.org/10.1128/CVI.00034-11>
- Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., Nagashima, T., Takahashi, Y., Kurosaki, T., Okada, M., Ohara, O., Rajewsky, K., & Takemori, T. (2012). Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(11), 2079–2097. <https://doi.org/10.1084/jem.20120127>
- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H., & Weissman, D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, *23*(2), 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>
- Karikó, K., Muramatsu, H., Ludwig, J., & Weissman, D. (2011). Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Research*, *39*(21), 1–10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr695>
- Karimi, M., Avci, P., Mobasser, R., Hamblin, M. R., & Naderi-Manesh, H. (2014). The novel albumin–chitosan core–shell nanoparticles for gene delivery: preparation, optimization and cell uptake investigation. *Bone*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1651-0>.The
- Karnowski, A., Chevrier, S., Belz, G. T., Mount, A., Emslie, D., D’Costa, K., Tarlinton, D. M., Kallies, A., & Corcoran, L. M. (2012). B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(11), 2049–2064. <https://doi.org/10.1084/jem.20111504>

- Kawano, T., Yamagata, M., Takahashi, H., Niidome, Y., Yamada, S., Katayama, Y., & Niidome, T. (2006). Stabilizing of plasmid DNA in vivo by PEG-modified cationic gold nanoparticles and the gene expression assisted with electrical pulses. *Journal of Controlled Release*, *111*(3), 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.12.022>
- Kodihalli, S., Kobasa, D. L., & Webster, R. G. (2000). Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines. *Vaccine*, *18*(23), 2592–2599. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00485-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00485-5)
- Kuhn, A. N., Diken, M., Kreiter, S., Selmi, A., Kowalska, J., Jemielity, J., Darzynkiewicz, E., Huber, C., Türeci, Ö., & Sahin, U. (2010). Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. *Gene Therapy*, *17*(8), 961–971. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.52>
- * Kurosaki, T., Kometani, K., & Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nature Reviews Immunology*, *15*(3), 149–159. <https://doi.org/10.1038/nri3802>
- * Kutzler, M. A., & Weiner, D. B. (2008). DNA vaccines: Ready for prime time? *Nature Reviews Genetics*, *9*(10), 776–788. <https://doi.org/10.1038/nrg2432>
- Larregina, A. T., Watkins, S. C., Erdos, G., Spencer, L. A., Storkus, W. J., Beer Stolz, D., & Falo, L. D. (2001). Direct transfection and activation of human cutaneous dendritic cells. *Gene Therapy*, *8*(8), 608–617. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301404>
- Lazzaro, S., Giovani, C., Mangiavacchi, S., Magini, D., Maione, D., Baudner, B., Geall, A. J., De Gregorio, E., D’Oro, U., & Buonsanti, C. (2015). CD8 T-cell priming upon mRNA vaccination is restricted to bone-marrow-derived antigen-presenting cells and may involve antigen transfer from myocytes. *Immunology*, *146*(2), 312–326. <https://doi.org/10.1111/imm.12505>
- Ledwith, B. J., Manam, S., Troilo, P. J., Barnum, A. B., Pauley, C. J., Griffiths, T. G., Harper, L. B., Beare, C. M., Bagdon, W. J., & Nichols, W. W. (2000). Plasmid DNA vaccines: Investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology*, *43*(4–6), 258–272. <https://doi.org/10.1159/000053993>
- Li, J., Jiang, Y., Zhao, S., Chang, X., Liu, J., Zeng, X., Li, Y., & Chen, H. (2012). Protective efficacy of an H5N1 DNA vaccine against challenge with a lethal H5N1 virus in quail. *Avian Diseases*, *56*(4 SUPPL.1), 937–939. <https://doi.org/10.1637/10150-040812-ResNote.1>
- Li, Z., Xiong, F., He, J., Dai, X., & Wang, G. (2016). Surface-functionalized, pH-responsive poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles for intranasal vaccine delivery: Effect of surface modification with chitosan and mannan. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *109*, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.08.012>
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Heppell, J., Wu, T., & Davis, H. (1998). Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish and Shellfish Immunology*, *8*(4), 261–270. <https://doi.org/10.1006/fsim.1997.0134>
- Lowin, B., Mattman, C., Hahne, M., & Tschopp, J. (1996). Comparison of Fas(Apo-1/CD95)- and perforin-mediated cytotoxicity in primary T lymphocytes. *International Immunology*, *8*(1), 57–63. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.1.57>
- Lunn, D. P., Soboll, G., Schram, B. R., Quass, J., McGregor, M. W., Drape, R. J., MacKlin, M. D., McCabe, D. E., Swain, W. F., & Olsen, C. W. (1999). Antibody responses to DNA vaccination of horses using the influenza virus hemagglutinin gene. *Vaccine*, *17*(18), 2245–2258. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(98\)00496-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(98)00496-4)
- Manam, S., Ledwith, B. J., Barnum, A. B., Troilo, P. J., Pauley, C. J., Harper, L. B., Griffiths, T. G., Niu, Z., Denisova, L., Follmer, T. T., Pacchione, S. J., Wang, Z., Beare, C. M., Bagdon, W. J., & Nichols, W. W. (2000). Plasmid DNA vaccines: Tissue distribution

- and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology*, 43(4–6), 273–281. <https://doi.org/10.1159/000053994>
- Marshall, R., & Noireaux, V. (2019). Quantitative modeling of transcription and translation of an all-E. coli cell-free system. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48468-8>
- McCargo, D. (2017). Timeline of Major Events. *Tearing Apart the Land, December*, xxiii–xxviii. <https://doi.org/10.7591/9780801463624-004>
- Mccarthy, H. O., McCaffrey, J., Mccrudden, C. M., Zholobenko, A., Ali, A. A., McBride, J. W., Massey, A. S., Pentlavalli, S., Chen, K. H., Cole, G., Loughran, S. P., Dunne, N. J., Donnelly, R. F., Kett, V. L., & Robson, T. (2014). Development and characterization of self-assembling nanoparticles using a bio-inspired amphipathic peptide for gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 189, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.048>
- * Midoux, P., & Pichon, C. (2014). Lipid-based mRNA vaccine delivery systems. *Expert Review of Vaccines*, 14(2), 221–234. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.986104>
- Morán, M. C., Rosell, N., Ruano, G., Busquets, M. A., & Vinardell, M. P. (2015). Gelatin-based nanoparticles as DNA delivery systems: Synthesis, physicochemical and biocompatible characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 134, 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.07.009>
- Moulin, V., Morgan, M. E., Eleveld-Trancikova, D., Haanen, J. B. A. G., Wienders, E., Looman, M. W. G., Janssen, R. A. J., Figdor, C. G., Jansen, B. J. H., & Adema, G. J. (2012). Targeting dendritic cells with antigen via dendritic cell-associated promoters. *Cancer Gene Therapy*, 19(5), 303–311. <https://doi.org/10.1038/cgt.2012.2>
- Munye, M. M., Tagalakis, A. D., Barnes, J. L., Brown, R. E., McAnulty, R. J., Howe, S. J., & Hart, S. L. (2016). Minicircle DNA Provides Enhanced and Prolonged Transgene Expression Following Airway Gene Transfer. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep23125>
- Nagata, T., Uchijima, M., Yoshida, A., Kawashima, M., & Koide, Y. (1999). Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells: Analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261(2), 445–451. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1050>
- * Neefjes, J., & Sadaka, C. (2012). Into the intracellular logistics of cross-presentation. *Frontiers in Immunology*, 3(FEB), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00031>
- Negash, T., Liman, M., & Rautenschlein, S. (2013). Mucosal application of cationic poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles as carriers of DNA vaccine and adjuvants to protect chickens against infectious bursal disease. *Vaccine*, 31(36), 3656–3662. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.011>
- * Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>
- Nguyen, L. T., Atobe, K., Barichello, J. M., Ishida, T., & Kiwada, H. (2007). Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(4), 751–757. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.751>
- Obukhanych, T. V., & Nussenzweig, M. C. (2006). T-independent type II immune responses generate memory B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 203(2), 305–310. <https://doi.org/10.1084/jem.20052036>
- Okuda, K., Kawamoto, S., & Fukushima, J. (2000). *Plasmids as Adjuvants for DNA Vaccination*. 29, 197–204.
- Olguin-Perglione, C., Vissani, M. A., Alamos, F., Tordoya, M. S., & Barrandeguy, M. (2020).

- Multifocal outbreak of equine influenza in vaccinated horses in Argentina in 2018: Epidemiological aspects and molecular characterisation of the involved virus strains. *Equine Veterinary Journal*, 52(3), 420–427. <https://doi.org/10.1111/evj.13176>
- Orlova, N. A., Kovnir, S. V., Hodak, J. A., Vorobiev, I. I., Gabibov, A. G., & Skryabin, K. G. (2014). Improved elongation factor-1 alpha-based vectors for stable high-level expression of heterologous proteins in Chinese hamster ovary cells. *BMC Biotechnology*, 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-56>
- Patil, S. D., Rhodes, D. G., & Burgess, D. J. (2004). Anionic liposomal delivery system for DNA transfection. *AAPS Journal*, 6(4). <https://doi.org/10.1208/aapsj060429>
- Pearton, M., Saller, V., Coulman, S. A., Gateley, C., Anstey, A. V., Zarnitsyn, V., & Birchall, J. C. (2012). Microneedle delivery of plasmid DNA to living human skin: Formulation coating, skin insertion and gene expression. *Journal of Controlled Release*, 160(3), 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.005>
- Pène, J., Gauchat, J.-F., Lécart, S., Drouet, E., Guglielmi, P., Boulay, V., Delwail, A., Foster, D., Lecron, J.-C., & Yssel, H. (2004). Cutting Edge: IL-21 Is a Switch Factor for the Production of IgG 1 and IgG 3 by Human B Cells. *The Journal of Immunology*, 172(9), 5154–5157. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5154>
- Perri, S., Greer, C. E., Thudium, K., Doe, B., Legg, H., Liu, H., Romero, R. E., Tang, Z., Bin, Q., Dubensky, T. W., Vajdy, M., Otten, G. R., & Polo, J. M. (2003). An Alphavirus Replicon Particle Chimera Derived from Venezuelan Equine Encephalitis and Sindbis Viruses Is a Potent Gene-Based Vaccine Delivery Vector. *Journal of Virology*, 77(19), 10394–10403. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10394-10403.2003>
- Pollard, C., Rejman, J., De Haes, W., Verrier, B., Van Gulck, E., Naessens, T., De Smedt, S., Bogaert, P., Grooten, J., Vanham, G., & De Koker, S. (2013). Type I IFN counteracts the induction of antigen-specific immune responses by lipid-based delivery of mRNA vaccines. *Molecular Therapy*, 21(1), 251–259. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.202>
- Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B. G., McKenzie, A. N. J., Menon, S., Zurawski, G., De Waal Malefyt, R., & De Vries, J. E. (1993). Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), 3730–3734. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3730>
- Purcell, M. K., Nichols, K. M., Winton, J. R., Kurath, G., Thorgaard, G. H., Wheeler, P., Hansen, J. D., Herwig, R. P., & Park, L. K. (2006). Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Immunology*, 43(13), 2089–2106. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.12.005>
- Qing, Y., Chen, M., Zhao, J., Hu, H., Xu, H., Ling, N., Peng, M., & Ren, H. (2010). Construction of an HBV DNA vaccine by fusion of the GM-CSF gene to the HBV-S gene and examination of its immune effects in normal and HBV-transgenic mice. *Vaccine*, 28(26), 4301–4307. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.04.023>
- Rejman, J., Bragonzi, A., & Conese, M. (2005). Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Molecular Therapy*, 12(3), 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.03.038>
- Ross, R., Sudowe, S., Beisner, J., Ross, X. L., Ludwig-Portugall, I., Steitz, J., Tüting, T., Knop, J., & Reske-Kunz, A. B. (2003). Transcriptional targeting of dendritic cells for gene therapy using the promoter of the cytoskeletal protein fascin. *Gene Therapy*, 10(12), 1035–1040. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301968>
- Rottembourg, D., Filippi, C. M., Bresson, D., Ehrhardt, K., Estes, E. A., Oldham, J. E., & von Herrath, M. G. (2010). Essential Role for TLR9 in Prime but Not Prime-Boost Plasmid DNA Vaccination To Activate Dendritic Cells and Protect from Lethal Viral Infection.

- The Journal of Immunology*, 184(12), 7100–7107.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803935>
- Roy, S., Zhu, D., Parak, W. J., & Feliu, N. (2020). Lysosomal Proton Buffering of Poly(ethylenimine) Measured in Situ by Fluorescent pH-Sensor Microcapsules. *ACS Nano*, 14(7), 8012–8023. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b10219>
- Saksida, S. M. (2006). Infectious haematopoietic necrosis epidemic (2001 to 2003) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in British Columbia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72(3), 213–223. <https://doi.org/10.3354/dao072213>
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), 708–712. <https://doi.org/10.1038/44385>
- * Saloni, K., Simard, N., Harland, R., & Ulmer, J. B. (2007). The road to licensure of a DNA vaccine. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 8(8), 635–641.
- * Sandbrink, J. B., & Shattock, R. J. (2020). RNA Vaccines: A Suitable Platform for Tackling Emerging Pandemics? *Frontiers in Immunology*, 11(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.608460>
- Santi, N., Vakharia, V. N., & Evensen, Ø. (2004). Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 322(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.12.016>
- Seino, K. K., Long, M. T., Gibbs, E. P. J., Bowen, R. A., Beachboard, S. E., Humphrey, P. P., Dixon, M. A., & Bourgeois, M. A. (2007). Comparative efficacies of three commercially available vaccines against West Nile virus (WNV) in a short-duration challenge trial involving an equine WNV encephalitis model. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(11), 1465–1471. <https://doi.org/10.1128/CVI.00249-07>
- * Shinnakasu, R., & Kurosaki, T. (2017). Regulation of memory B and plasma cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*, 45, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.003>
- Schwickert, T. A., Vitoria, G. D., Fooksman, D. R., Kamphorst, A. O., Mugnier, M. R., Gitlin, A. D., & Nussenzweig, M. L. D. (2011). A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1243–1252. <https://doi.org/10.1084/jem.20102477>
- Soane, R. J., Hinchcliffe, M., Davis, S. S., & Illum, L. (2001). Clearance characteristics of chitosan based formulations in the sheep nasal cavity. *International Journal of Pharmaceutics*, 217(1–2), 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00602-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00602-0)
- Stepinski, J., Waddell, C., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., & Rhoads, R. E. (2001). Synthesis and properties of mRNAs containing the novel “anti-reverse” cap analogs. *Rna*, 1486–1495.
- Strenkowska, M., Grzela, R., Majewski, M., Wnek, K., Kowalska, J., Lukaszewicz, M., Zuberek, J., Darzynkiewicz, E., Kuhn, A. N., Sahin, U., & Jemielity, J. (2016). Cap analogs modified with 1,2-dithiodiphosphate moiety protect mRNA from decapping and enhance its translational potential. *Nucleic Acids Research*, 44(20), 9578–9590. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw896>
- Su, X., Fricke, J., Kavanagh, D. G., & Irvine, D. J. (2011). In vitro and in vivo mRNA delivery using lipid-enveloped pH-responsive polymer nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 8(3), 774–787. <https://doi.org/10.1021/mp100390w>
- Sudowe, S., Dornitzki, S., Montermann, E., Bros, M., Grabbe, S., & Reske-Kunz, A. B. (2009). Uptake and presentation of exogenous antigen and presentation of endogenously produced antigen by skin dendritic cells represent equivalent pathways for the priming of cellular immune responses following biolistic DNA immunization. *Immunology*, 128(1 PART 2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02947.x>

- Sullivan, S. P., Koutsonanos, D. G., Del Pilar Martin, M., Lee, J. W., Zarnitsyn, V., Choi, S. O., Murthy, N., Compans, R. W., Skountzou, I., & Prausnitz, M. R. (2010). Dissolving polymer microneedle patches for influenza vaccination. *Nature Medicine*, *16*(8), 915–920. <https://doi.org/10.1038/nm.2182>
- * Swain, S. L., McKinstry, K. K., & Strutt, T. M. (2012). Expanding roles for CD4 + T cells in immunity to viruses. *Nature Reviews Immunology*, *12*(2), 136–148. <https://doi.org/10.1038/nri3152>
- Takano, T., Iwahori, A., Hirono, I., & Aoki, T. (2004). Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. *Fish and Shellfish Immunology*, *17*(4), 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.04.012>
- The College of Physician of Philadelphia. (n.d.). *The History of Vaccines - Timeline*. <https://www.historyofvaccines.org/timeline/all>
- Thorarinnsson, R., Wolf, J. C., Inami, M., Phillips, L., Jones, G., Macdonald, A. M., Rodriguez, J. F., Sindre, H., Skjerve, E., Rimstad, E., & Evensen, Ø. (2021). Effect of a novel DNA vaccine against pancreas disease caused by salmonid alphavirus subtype 3 in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish and Shellfish Immunology*, *108*, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.12.002>
- Urthaler, J., Buchinger, W., & Necina, R. (2005). Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy. *Acta Biochimica Polonica*, *52*(3), 703–711. https://doi.org/10.18388/abp.2005_3434
- USDA. (2003). *Economic Impact of West Nile Virus on the Colorado and Nebraska Equine Industries: 2002. April*. https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/equine/downloads/wnv2002_CO_NB.pdf
- Vaidyanathan, S., Azizian, K. T., Haque, A. K. M. A., Henderson, J. M., Hendel, A., Shore, S., Antony, J. S., Hogrefe, R. I., Kormann, M. S. D., Porteus, M. H., & McCaffrey, A. P. (2018). Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *12*(September), 530–542. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.06.010>
- Vanniasinkam, T., Reddy, S. T., & Ertl, H. C. J. (2006). DNA immunization using a non-viral promoter. *Virology*, *344*(2), 412–420. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.08.040>
- Vila, A., Sánchez, A., Janes, K., Behrens, I., Kissel, T., Jato, J. L. V., & Alonso, M. J. (2004). Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *57*(1), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2003.09.006>
- Vogel, A. B., Lambert, L., Kinnear, E., Busse, D., Erbar, S., Reuter, K. C., Wicke, L., Perkovic, M., Beissert, T., Haas, H., Reece, S. T., Sahin, U., & Tregoning, J. S. (2018). Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Molecular Therapy*, *26*(2), 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.11.017>
- Wang, S., Farfan-Arribas, D. J., Shen, S., Chou, T. hui W., Hirsch, A., He, F., & Lu, S. (2006). Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine*, *24*(21), 4531–4540. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.023>
- Wang, Y., Cui, H., Li, K., Sun, C., Du, W., Cui, J., Zhao, X., & Chen, W. (2014). A magnetic nanoparticle-based multiple-gene delivery system for transfection of porcine kidney cells. *PLoS ONE*, *9*(7), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102886>
- Wang, Z., Troilo, P. J., Wang, X., Griffiths, T. G., Pacchione, S. J., Barnum, A. B., Harper, L. B., Pauley, C. J., Niu, Z., Denisova, L., Follmer, T. T., Rizzuto, G., Ciliberto, G., Fattori,

- E., Monica, N. L., Manam, S., & Ledwith, B. J. (2004). Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Therapy*, *11*(8), 711–721. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302213>
- Webster, R. G., & Yuanji, G. (1991). New Influenza virus in horses. *Australian Veterinary Journal*, *68*(9), 303–303. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1991.tb03263.x>
- Widera, G., Austin, M., Rabussay, D., Goldbeck, C., Barnett, S. W., Chen, M., Leung, L., Otten, G. R., Thudium, K., Selby, M. J., & Ulmer, J. B. (2000). Increased DNA Vaccine Delivery and Immunogenicity by Electroporation In Vivo. *The Journal of Immunology*, *164*(9), 4635–4640. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4635>
- Wolff, J. O. N. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., & Felgner, P. L. (1990). *Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo*. March.
- Xu, Y., & Szoka, F. C. (1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry*, *35*(18), 5616–5623. <https://doi.org/10.1021/bi9602019>
- Ye, P., Rodriguez, F. H., Kanaly, S., Stocking, K. L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J. E., Bagby, G. J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J. J., & Kolls, J. K. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *Journal of Experimental Medicine*, *194*(4), 519–527. <https://doi.org/10.1084/jem.194.4.519>
- Ysla, M. R., Wilson, M. G., & Brewer, G. (2008). Assay of Adenylate Uridylate-Rich Element-Mediated mRNA Decay in Cells. *Bone*, *23*(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)02403-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)02403-8). Assays
- Zan, H., Cerutti, A., Dramitinos, P., Schaffer, A., & Casali, P. (1998). CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu-->S alpha and sequential S mu-->S gamma, S gamma-->S alpha DNA recombination. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *161*(10), 5217–5225.
- Zarrin, A. A., Malkin, L., Fong, I., Luk, K. D., Ghose, A., & Berinstein, N. L. (1999). Comparison of CMV, RSV, SV40 viral and V λ 1 cellular promoters in B and T lymphoid and non-lymphoid cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, *1446*(1–2), 135–139. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(99\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(99)00067-6)
- Zhao, K., Li, W., Huang, T., Luo, X., Chen, G., Zhang, Y., Guo, C., Dai, C., Jin, Z., Zhao, Y., Cui, H., & Wang, Y. (2013). Preparation and efficacy of newcastle disease virus DNA vaccine encapsulated in PLGA nanoparticles. *PLoS ONE*, *8*(12), 6–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082648>
- Zhao, Y., Cao, Y., Cui, L., Ma, B., Mu, X., Li, Y., Zhang, Z., Li, D., Wei, W., Gao, M., & Wang, J. (2014). Duck Enteritis Virus Glycoprotein D and B DNA Vaccines Induce Immune Responses and Immunoprotection in Pekin Ducks. *PLoS ONE*, *9*(4), e95093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095093>