

ZAŁOŻENIA I PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA ŻYWYCH WEKTORÓW BAKTERYJNYCH WE WSPÓŁCZESNEJ WAKCYNOLOGII

Katarzyna Roeske^{1*}, Radosław Stachowiak¹, Jacek Bielecki¹

¹Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w kwietniu 2015 r.
Zaakceptowano w listopadzie 2015 r.

1. Wakcynologia – rys historyczny i perspektywy. 2. Swoista (nabyta) odpowiedź immunologiczna. 3. Komórki efektorowe odpowiedzi typu komórkowego. 4. Prezentacja antygeny i jego rozpoznanie przez limfocyty. 5. Pamięć immunologiczna. 6. Szczepionki indukujące odpowiedź komórkową. 7. Szczepionki podjednostkowe. 8. Adiuwanty. 9. Szczepionki wektorowe. 10. Bakterie patogenne jako wektory szczepionkowe. 11. Bakterie niepatogenne jako wektory szczepionkowe. 12. Podsumowanie

Principles and perspectives of using live bacterial vectors in modern vaccinology

Abstract: Various strategies can be used to deliver antigens to the cytosol of antigen presenting cells, e.g. using nanoparticles, liposomes, immune stimulating complexes, viruses or bacteria. Among them, the use of bacterial carriers constitutes probably the most studied strategy. Depending on the extra- or intracellular life cycle of the pathogen, different immune responses are required for protection. Vaccines formulated on the basis of killed whole cells or isolated cell fractions tend to induce strong antibody response, however, they are ineffective at inducing cellular immunity. Due to these characteristics such antigens are used mainly to immunize against extracellular pathogens. Conversely, live attenuated mutants induce a broad range of immune responses including CD8⁺ T cell response, thereby leading to effective immunization against intracellular pathogens. Besides adjuvant properties provided by carried molecular patterns, live bacterial carriers have other important advantages, such as the ability to mimic natural infection and possibility to be administered in a needle-free manner. Remarkably, vector-based vaccines can be designed to enable induction of immune response against their own or carried heterologous antigens. Both pathogenic and commensal microorganisms are used in the next generation vaccine design, however, due to the potential risk of conversion to a virulent strain and causing infection or the loss of immunogenic potency, pathogenic vectors are less likely to use. Questions concerning safety which have arisen with the advent of live-attenuated bacterial vectors made the researchers turn their attention to non-pathogenic bacteria.

1. Vaccinology – historical background and perspectives. 2. Acquired immunity. 3. Effector cells of cell-mediated immune response. 4. Antigen presentation and its recognition by T-cells. 5. Immunological memory. 6. Vaccines inducing cellular immune response. 7. Subunit vaccines. 8. Adjuvants. 9. Vector vaccines. 10. Pathogenic bacteria as vaccine vectors. 11. Non-pathogenic bacteria as vaccine vectors. 12. Summary

Słowa kluczowe: odpowiedź komórkowa, pamięć immunologiczna, prezentacja antygeny, szczepionka, wektor bakteryjny
Key words: antigen presentation, bacterial vector, cell-mediated immune response, immune memory, vaccine

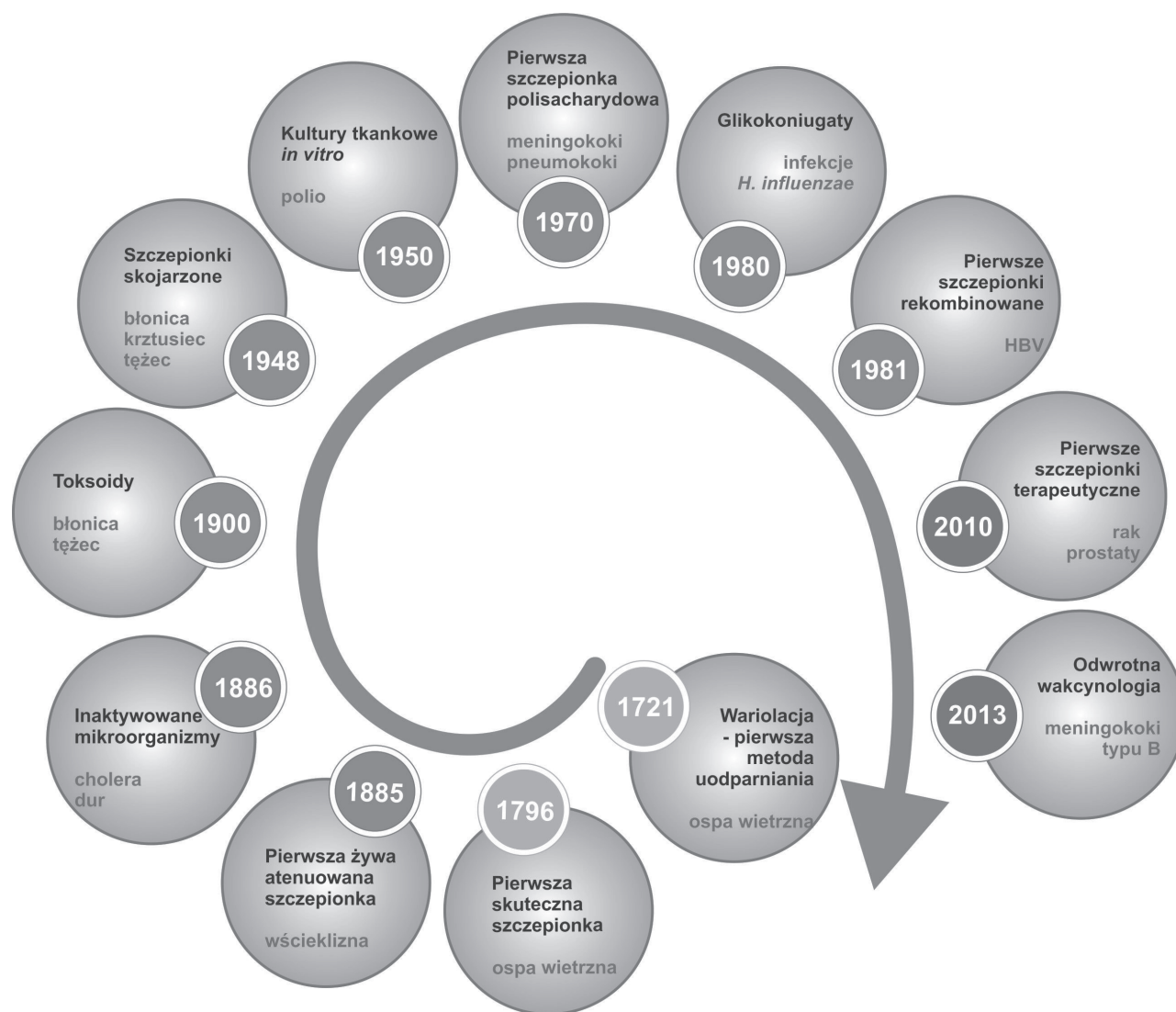
1. Wakcynologia – rys historyczny i perspektywy

Postępy w nauce od zawsze stanowiły siłę napędową w badaniach nad konstrukcją nowych, skutecznych szczepionek (Rys. 1). Termin „szczepionki” w znaczeniu preparatu biologicznego wzmagającego odporność na daną chorobę oraz koncepcja szczepień zostały wprowadzone przez Edwarda Jennera w 1796 roku. Wykorzystał on materiał zakaźny ospy krowianki do zaszczepienia 8-letniego chłopca, co przyniosło efekt w postaci skutecznej immunizacji przeciw wirusowi ospy prawdziwej [73]. Złotą erę wakcynologii zapoczątkowały odkrycia Pasteura i Kocha, którzy opracowali preparaty szczepionkowe opierające się na żywych, atenuowanych mikroorganizmach, organizmach inaktywowanych bądź produkowanych przez nie toksynach. Ludwik Pasteur w 1885 roku dokonał pierwszych skutecznych szczepień chroniących przed wirusem wście-

klizny. Opracował on metodę szybkiego namnażania wirusa poprzez hodowlę w organizmach królików oraz jego atenuacji na drodze odwadniania płynu mózgowo-rdzeniowego zainfekowanych wirusem królików poprzez jego ekspozycję na działanie powietrza [13]. Robert Koch w toku swoich badań nad przecinkowcem cholery (*Vibrio cholerae*) dowiódł, że pojedyncze zakażenie chroni przed kolejnymi infekcjami w czasie tej samej epidemii. Pierwsze próby zastosowania zabitych komórek *V. cholerae* do immunizacji zostały natomiast podjęte pod koniec XIX wieku przez Jaime Ferrána, a także Sawtschenko i Sabolotnego [47].

Początek XX wieku przyniósł odkrycie nowego typu szczepionek, w których wykorzystywano toksoidy, inaktywowane na drodze chemicznej lub termicznej toksyny bakteryjne, które pozbawione były cech toksyczności, ale jednocześnie wykazywały potencjał immunizacyjny. Powstały szczepionki na bazie toksyny

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego; ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. (22) 55 41 311; e-mail: kroeske@biol.uw.edu.pl



Rys. 1. Główne odkrycia wakcynologii – objaśnienia w tekście

tężcowej *Clostridium tetani* oraz toksyny błoniczej *Corynebacterium diphtheriae*. Następnym krokiem było opracowanie pierwszych skojarzonych szczepionek, uodparniających na błonicę i tężec (Di-Te) lub na błonicę, krztusiec i tężec równocześnie (Di-Per-Te). Kolejny przełom w badaniach z dziedziny wakcynologii nastąpił w drugiej połowie XX wieku jako następstwo rozwoju technik hodowli komórkowych, dzięki którym możliwe stało się namnażanie cząstek wirusowych. Umożliwiło to stworzenie szczepionek skutecznie immunizujących przeciw rotawirusom czy wirusom zapalenia wątroby typu A, polio, różyczki, świnki, odry i ospy wietrznej. Dalszy postęp w dziedzinie mikrobiologii doprowadził do opracowania szczepionek polisacharydowych, które wywoływały odpowiedź przeciw polisacharydom otoczkowym bakterii takich jak *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* serotyp A, C, W i Y czy *Haemophilus influenzae*. Tego typu terapeutyki indukowały jednak stosunkowo słabą reakcję odpornościową u dzieci. Opracowanie szczepionek

w formie glikokoniugatów pozwoliło na pokonanie tych ograniczeń, gdyż powodowało indukcję humoralnych mechanizmów odpornościowych. Odkrycia biologii molekularnej pozwoliły również na skonstruowanie preparatów immunizujących przeciw mikroorganizmom nie dającym się namnażać w hodowli komórkowej, takim jak wirus zapalenia wątroby typu B (HBV) czy wirus brodawczaka ludzkiego (HPV). Szczepionki przeciw tym patogenom mają postać oczyszczonych, zrekombinowanych białek wirusa, które tworzą niewielne cząstki wirusowe (viral-like particle, VLP) [20].

Ostatnie dwie dekady przyniosły nowe rozwiązania w wakcynologii, które umożliwiają poszukiwanie najbardziej immunogennych antygenów. Zsekwencjonowanie kompletnych genomów organizmów chorobotwórczych oraz człowieka doprowadziło do powstania tzw. „odwrotnej wakcynologii”, techniki, która na drodze analiz genomicznych pozwala na wytypowanie najlepszych celów dla komórek układu odpornościowego. Genom danego organizmu stanowi bowiem rezerwuar

genów kodujących białka stanowiące potencjalny immunogen, który może być zastosowany do konstrukcji szczepionki [40]. Sztandarowym przykładem wykorzystania tej techniki jest opracowanie szczepionki wywołującej odpowiedź przeciw bakterii *Neisseria meningitidis* serotypu B (MenB), która w przeciwieństwie do meningokoków innych typów pokryta jest polisacharydem wykazującym duże podobieństwo do polisacharydu obecnego w ludzkich tkankach. Cecha ta sprawiła, że szczepionki glikokoniugatowe były nieskuteczne w immunizacji przeciw MenB. Wybrane na drodze analiz genomu białka poddano ekspresji w komórkach *E. coli*, dzięki czemu uzyskano pierwszą skuteczną szczepionkę przeciw MenB [30].

Kolejnym wyzwaniem współczesnej wakcynologii stało się również opracowanie szczepionek przeciw mikroorganizmom wykazującym duże różnice w ekspresji antygenów, jako że preparaty opracowane w XX wieku wykazują skuteczność głównie w profilaktyce zakażeń patogenami cechującymi się niską zmiennością antygenową. Rozwiązaniem jest stosowanie szczepionek zawierających antygeny wielu szczepów jednocześnie. Przykładem takich immunoterapeutyków są poliwalentne szczepionki koniugatowe zawierające antygeny 7, 9 lub 13 spośród 93 znanych serotypów streptokoków [8] lub poliwalentna szczepionka przeciw wirusowi grypy zmieniana sezonowo w oparciu o przewidywania dotyczące ewolucji biologicznej szczepów [48]. Do tej pory nie udało się jednak opracować skutecznej i trwale immunizującej szczepionki przeciw mikroorganizmom, które charakteryzuje bardzo duże tempo mutacji, takim jak wirusy HIV czy HCV. Potrafią one uniknąć mechanizmów obronnych organizmu gospodarza dzięki zmianom antygenów będących celem układu odpornościowego.

W ciągu ostatniego wieku szczepienia w bardzo znaczącym stopniu przyczyniły się do ograniczenia zapadalności na choroby zakaźne oraz zmniejszyły wywołaną przez nie śmiertelność. Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization, WHO) podaje, że szczepienia mogą ratować życie od 2 do 3 milionów ludzi każdego roku. Dzięki rozbudowanym programom szczepień choroby takie jak ospa prawdziwa czy polio zostały wyeliminowane na całym świecie. Z danych raportu WHO z 2014 roku wynika, że w latach 2000–2012 o 78% spadła również liczba zgonów spowodowanych przez odrę. Jednocześnie organizacja informuje, że przy pomocy szczepień można kontrolować zapadalność na jedynie 25 ze wszystkich znanych chorób zakaźnych (Tab. I). W 2012 roku w czołówce chorób powodujących najwyższą śmiertelność i przeciw którym nie istnieje skuteczna szczepionka AIDS (1,6 miliona zgonów), gruźlica (1,3 miliona zgonów) czy malaria (0,6 miliona zgonów). Coraz większe zagrożenie stanowią również nowotwory, które w 2012 roku spowo-

Tabela I

Dostępne szczepionki uodparniające przeciw chorobom zakaźnym

Choroby bakteryjne	Choroby wirusowe
wąglik	odra
cholera	różyczka
zakażenia meningokokowe	grypa
dyfteryt	świnka
tężec	WZW A
krztusiec	WZW B
gruźlica	WZW E
zakażenia pneumokokowe	polio
dur brzuszny	wirusowe zapalenie mózgu
zakażenia	wścieklizna
<i>Haemophilus influenzae</i>	ospa wietrzna
	zakażenia papillomawirusami
	zakażenia rotawirusami
	żółta febra
	japońskie zapalenie mózgu

dowały śmiertelność rzędu 8,2 miliona osób. Ich profilaktyka za pomocą szczepień stanowi więc poważne wyzwanie dla współczesnej wakcynologii.

2. Odporność swoista

Szczepienie ma na celu wywołanie swoistej odpowiedzi odpornościowej, dlatego warunkiem niezbędnym do opracowania nowych metod skutecznej immunizacji jest bardzo dokładne poznanie jej mechanizmów. Terminem swoistej odpowiedzi immunologicznej określa się mechanizm nabytej odporności organizmu zależny od rozpoznania antygenów przez przeciwciała produkowane przez limfocyty B (odpowiedź humoralna) i receptory znajdujące się na limfocytach T (odpowiedź komórkowa). Cechuje ją specyficzność względem unikalnego antygeny oraz zdolność do wywoływania tzw. pamięci immunologicznej zapewniającej długotrwałą odporność organizmu na dany patogen.

Przeciwciała produkowane przez limfocyty B wiążą się z antygenami na powierzchni czynników infekcyjnych. Może to skutkować zniszczeniem patogenu w drodze różnych mechanizmów takich jak fagocytoza czy aktywacja dopełniacza lub mobilizacją komórek odpornościowych na skutek wydzielania mediatorów stanu zapalnego. Przeciwciała są odpowiedzialne za eliminowanie zakażeń patogenami, które mają pozakomórkowy etap w swoich cyklach życiowych lub które produkują metabolity wydostające się poza komórki gospodarza.

Drugim typem odpowiedzi swoistej, która ma decydujące znaczenie w niszczeniu patogenów wewnątrzkomórkowych, a także przy zwalczaniu komórek nowotworowych jest odpowiedź typu komórkowego. Komórkami efektorowymi tej odpowiedzi są limfocyty cytotoksyczne, CD8⁺ (cytotoxic T cell, CTL) oraz limfocyty pomocnicze, CD4⁺ (helper T cell, Th). Komórki

CD8⁺ rozpoznają obce antygeny i prowadzą do zabicia komórki zainfekowanej wirusem, wewnątrzkomórkową bakterią czy też do eliminacji komórki nowotworowej, podczas gdy komórki CD4⁺ stymulują aktywność pozostałych leukocytów poprzez wydzielanie cytokin bądź przez bezpośredni kontakt z nimi.

Na skuteczność odporności nabytej wpływają zarówno prawidłowy przebieg humoralnej oraz komórkowej odpowiedzi, jak i odpowiednia interakcja między komórkami efektorowymi obu typów odpowiedzi. Bardzo duże znaczenie w odpowiedzi humoralnej, zwłaszcza na antygeny białkowe, ma współpraca limfocytów T helperowych CD4⁺ z limfocytami B. Co najważniejsze, w przebiegu odporności nabytej powstają limfocyty pamięci, dzięki którym ponowny kontakt z tym samym antygenem prowadzi do szybszej i efektywniejszej odpowiedzi odpornościowej [68].

3. Komórki efektorowe odpowiedzi typu komórkowego

Limfocyty T pomocnicze (CD4⁺, Th)

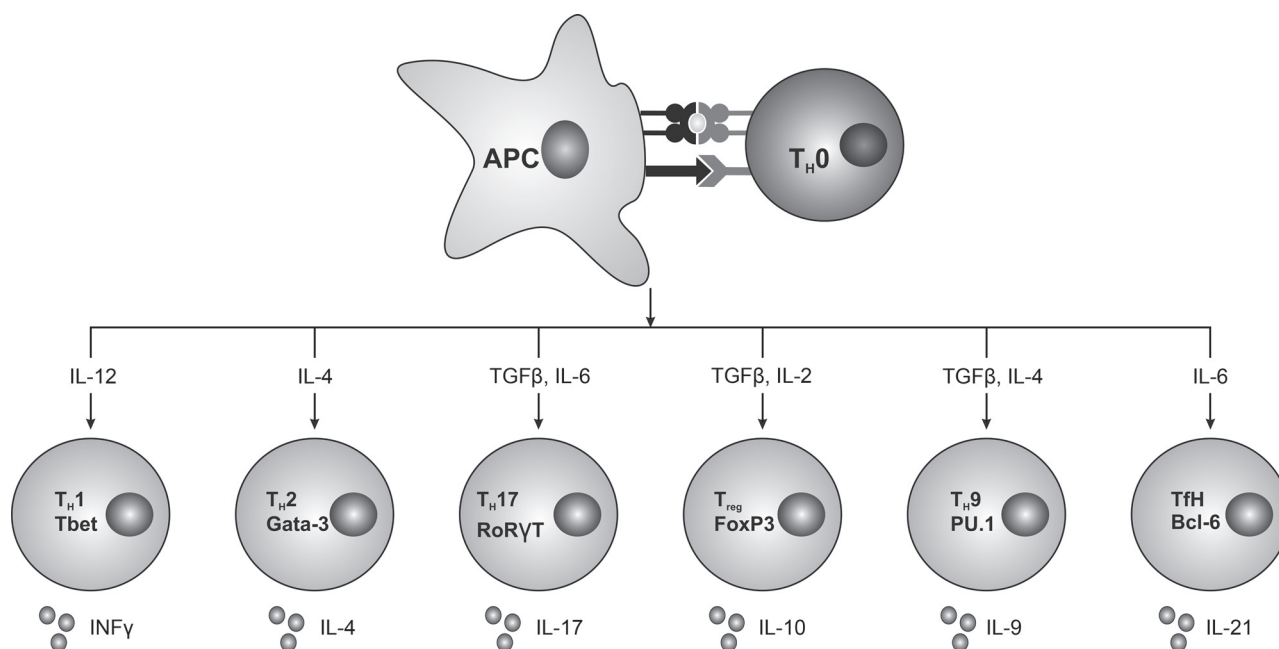
Limfocyty T pomocnicze (T helper cells, Th) o fenotypie CD4⁺ odgrywają kluczową rolę w rozwoju odporności nabytej. Regulują funkcje efektorowe limfocytów B i limfocytów T cytotoksycznych, komórek odporności wrodzonej, szczególnie o aktywności fagocytarnej, a także odpowiadają za utrzymanie homeostazy i uczestniczą w kontroli reakcji autoimmunizacyjnych. Są również mediatorami pamięci immunologicznej, a zmniejszenie ich liczby w organizmie przyczynia się do zwiększonej podatności na choroby infekcyjne. Tak różnorodną rolę mogą pełnić dzięki różnicowaniu naiwnych limfocytów T CD4⁺ do odmiennych efektorowych limfocytów T w odpowiedzi na aktywację antygenami prezentowanymi przez komórki prezentujące antygen (APC, antigen-presenting cells).

W 1986 roku Mosmann i wsp. [54] wykazali istnienie dwóch populacji limfocytów T CD4⁺, (Th1 i Th2) różniących się profilem produkowanych cytokin oraz markerami powierzchniowymi. Cechą charakterystyczną limfocytów Th1 wspomagających głównie odpowiedź typu komórkowego jest wydzielanie interferonu- γ (IFN- γ) oraz interleukiny-2 (IL-2). Limfocyty Th2 biorące udział w odpowiedzi humoralnej produkują inny, charakterystyczny zestaw cytokin: interleukiny IL-4, IL-5 i IL-13. W 2003 roku zidentyfikowano kolejną populację limfocytów T CD4⁺, która charakteryzuje się zdolnością do syntezy następującego zestawu interleukin: IL-17A, IL-17F i IL-22 [55]. Limfocyty te nazwano Th17 [36, 61] i wykazano ich rolę między innymi w generowaniu odporności przeciwbakteryjnej we wczesnych etapach zakażeń *M. tuberculosis* [43]. Ponadto aktywowane, naiwne limfocyty T CD4⁺

różnicują w limfocyty o fenotypie CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ charakteryzujące się aktywnością supresorową [17]. Są one zaangażowane w utrzymanie tolerancji na antygeny własne i obce. Powstają one w obwodowych narządach limfoidalnych, co odróżnia je od naturalnych regulatorowych limfocytów T o takim samym fenotypie powstających w grasicy [35]. Wśród różnych funkcjonalnie populacji limfocytów T CD4⁺ opisano pęcherzykowe limfocyty T_{fh} (follicular T helpers). Migrują one do ośrodków rozmnażania (GC, germinal centers) limfocytów B w tkance limfoidalnej, gdzie wspomagają ich różnicowanie w komórki plazmatyczne lub limfocyty B pamięci [62]. Scharakteryzowano również inne populacje limfocytów Th, takie jak aktywne w trakcie zakażeń pasożytniczych i mogące się przyczyniać do chorób autoimmunizacyjnych limfocyty Th9 [85] czy Th22, które mogą być zaangażowane w reakcje odpornościowe i naprawę tkanki skórnej [23].

Powstanie tak zróżnicowanych populacji efektorowych i regulatorowych limfocytów T CD4⁺ zależy od ekspresji specyficznych czynników transkrypcyjnych i rodzaju transkrybowanych genów, co w hodowlach *in vitro* warunkowane jest obecnością różnych zestawów cytokin tworzących mikrośrodowisko w trakcie aktywacji naiwnych limfocytów T CD4⁺ przy udziale receptora TCR. Różnicowanie naiwnych limfocytów Th do populacji Th1 wymaga obecności IL-12, która jest produkowana przez komórki dendrytyczne aktywowane substancjami pochodzącymi od patogenów. Powstałe limfocyty Th1 wytwarzają natomiast IFN- γ , który aktywuje makrofagi działające na bakteryjne i wirusowe czynniki infekcyjne. Tego typu sprzężenie dodatkowo obserwowane jest również przy różnicowaniu populacji komórek Th2, która generowana jest w obecności IL-4. Ta cytokina aktywuje limfocyty B oraz pobudza makrofagi i monocyty do wydzielania cytokin prozapalnych, pośrednio przyczyniając się do wytworzenia ogniska zapalnego, co prowadzi do usunięcia infekcji tego typu patogenami. W przypadku zakażeń grzybami lub niektórymi gatunkami bakterii komórki prezentujące antygen wytwarzają z kolei IL-1 β , IL-6 i IL-23 indukujące powstanie limfocytów Th17, które przez sekrecję IL-17 i rekrutację neutrofilów pośredniczą w obronie przed patogenami zewnątrzkomórkowymi [69]. Różnicowanie limfocytów iTreg odbywa się natomiast w obecności TGF- β i IL-2 [93].

Odebranie pozakomórkowego sygnału ze strony cytokin przez aktywowane limfocyty Th powoduje zmianę ekspresji czynników transkrypcyjnych. Różnicowanie do komórek Th1 zależy od aktywacji czynnika STAT1 i ekspresji T-box (T-bet) [41]. W procesie różnicowania limfocytów Th2 IL-4 aktywuje z kolei czynnik STAT6, co prowadzi do syntezy czynnika transkrypcyjnego Gata3 [4]. Przy powstawaniu limfocytów Th17 indukowana jest ekspresja czynnika ROR γ T [22], nato-

Rys. 2. Różnicowanie limfocytów CD4⁺

Limfocyty Th posiadają zdolność różnicowania do różnych populacji w zależności od obecności cytokin w trakcie rozpoznania kompleksów MHC-peptyd, np. komórki Th1 różnicują w obecności IL-12. Indukcja różnicowania powoduje uruchomienie ekspresji różnych czynników transkrypcyjnych, np. RoRYT w limfocytach Th17. Powstałe populacje limfocytów wytwarzają cytokiny regulujące przebieg odpowiedzi odpornościowej na patogen.

miast czynnik transkrypcyjny Foxp3 syntetyzowany jest w przypadku komórek regulatorowych Treg (Rys. 2).

Limfocyty cytotoksyczne (CD8⁺, Tc)

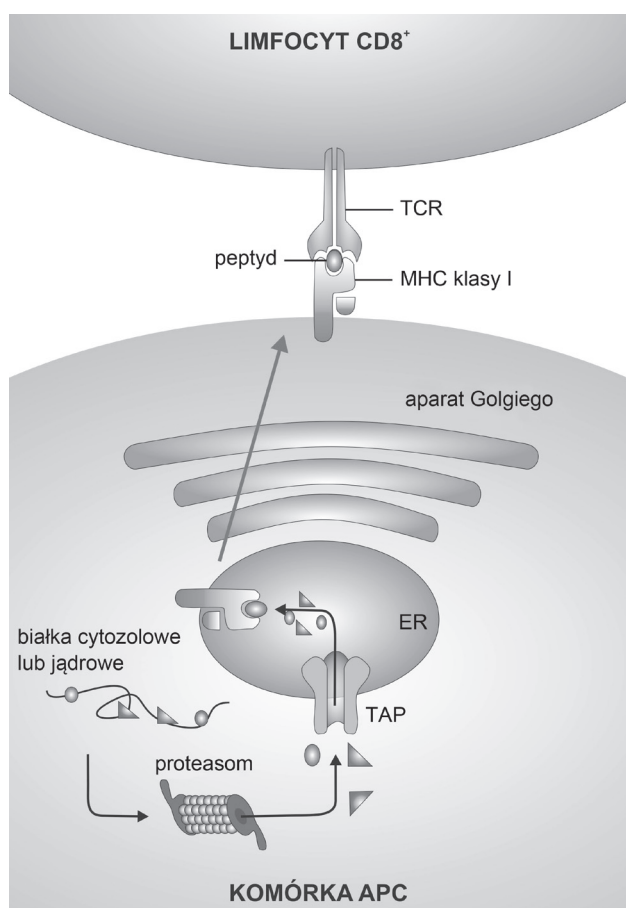
Limfocyty T cytotoksyczne (Tc) cechujące się obecnością powierzchniowego markera CD8 odpowiadają za eliminację komórek nowotworowych lub komórek zainfekowanych patogenami wewnątrzkomórkowymi. Swoją funkcję efektorową zyskują dzięki produkcji cytokin takich jak IFN- γ czy TNF- α (tumor necrosis factor α) lub poprzez aktywność cytolityczną. Po aktywacji limfocytów Tc dochodzi do uwolnienia granzymów i uszkadzających błonę komórkową perforyn, a także do indukcji apoptozy w zainfekowanej komórce na drodze FasL. Produkowana przez limfocyty Tc cytokina FasL łączy się z komórką przeznaczoną do apoptozy za pośrednictwem zewnątrzkomórkowej domeny receptora Fas, FASR, który zawiera również domenę transbłonową kotwiczącą receptor i domenę cytoplazmatyczną, zwaną domeną śmierci FADD (Fas associated death domain) o charakterze wykonawczym. Przekazuje ona sygnał do białek cytoplazmy, kontrolujących fazę kontrolno-decyzyjną [70].

4. Prezentacja antygeny i jego rozpoznanie przez limfocyty T

Antygeny są cząsteczkami lub fragmentami cząsteczek posiadającymi zdolność do wiązania się z przeciwciałem lub receptorem na powierzchni limfocy-

tów B lub T. Jeśli przyczyniają się one do wzbudzenia odpowiedzi odpornościowej, nazywa się je immunogenami. Nie wszystkie antygeny mają potencjał immunogeny, co jest bardzo istotnym aspektem konstruowania nowych szczepionek, które powinny indukować wysoki poziom odpowiedzi odpornościowej, aby skutecznie chronić przed patogenymi mikroorganizmami. Immunogenność zależy od wielu czynników. Duże znaczenie ma stopień obcości danej molekule dla organizmu, gdyż autoantygeny zazwyczaj nie indukują odpowiednio silnej odpowiedzi odpornościowej. Równie istotne są parametry fizyczne – duże cząsteczki takie jak białka, polisacharydy czy kwasy nukleinowe należą do najbardziej immunogennych. Cząsteczki o mniejszej masie molekularnej mogą zaś funkcjonować jako hapteny, antygeny zyskujące immunogenność po połączeniu z odpowiednim nośnikiem. Obok fizyko-chemicznych cech antygeny, skuteczną odpowiedź przeciw niemu warunkuje również jego stężenie i droga podania. Immunogenność antygeny może być również wzmacniana poprzez dostarczanie antygeny z innymi substancjami, zwanymi adiuwantami [68].

Limfocyty biorące udział w komórkowej odpowiedzi immunologicznej rozpoznają antygeny, które są prezentowane na komórkach eukariotycznych w kompleksach z cząsteczkami układów zgodności tkankowej MHC klasy I (limfocyty Tc) i MHC klasy II (limfocyty Th). Cząsteczki MHC klasy I eksprymowane na wszystkich jądrzastych komórkach prezentują peptydy endogenego, cytoplazmatycznego lub jądrowego pochodzenia (Rys. 3). Znane są dwa szlaki prezentacji antygeny



Rys. 3. Ścieżka prezentacji antygeny w kompleksach z cząsteczkami MHC klasy I.

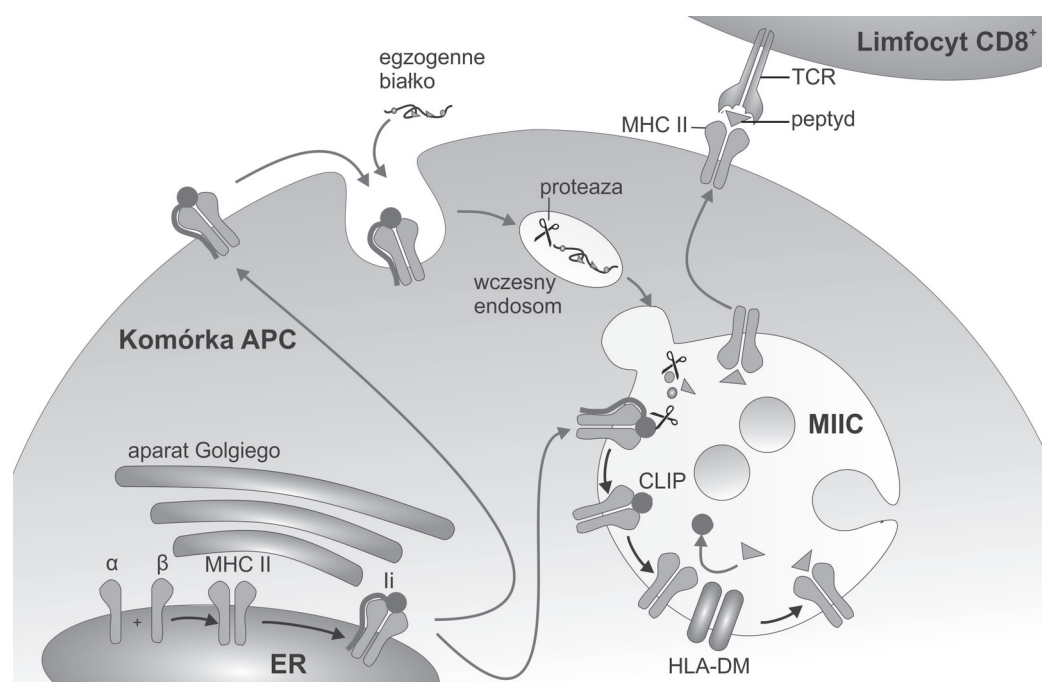
Prezentacja wewnątrzkomórkowych immunogennych peptydów jest wynikiem serii zdarzeń. Antygeny ulegają degradacji w proteasomie, a powstałe peptydy są translokowane za pomocą transporterów TAP do ER, gdzie tworzą kompleksy z cząsteczkami MHC I. Kompleksy peptyd-MHC I są uwalniane z ER i przy udziale aparatu Golgiego transportowane na powierzchnię komórki, gdzie mogą być rozpoznane przez limfocyt cytotoksyczny. APC – komórka prezentująca antygen; TAP – transporter associated protein; ER – retikulum endoplazmatyczne; TCR – receptor limfocyty T.

w MHC I: a) endogenny szlak przetwarzania antygenów wewnątrzkomórkowych w proteasomie i tworzenia kompleksów z MHC I, b) prezentacja krzyżowa pozakomórkowych antygenów, które trafiają do wnętrza komórki prezentującej na drodze endocytozy lub peptydów pochodzących z degradacji antygeny białkowego przekazywanych przez wyspecjalizowane wewnątrzkomórkowe kanały zwane „gap junctions”. W procesie krzyżowej prezentacji zachodzącej tylko w niektórych typach APC antygeny trafiają do komórki na drodze fagocytozy lub makropinocytozy, a następnie ulegają kompleksowaniu z MHC I na drodze jednego z trzech znanych szlaków. Pierwszym z nich jest proces o nieznanym mechanizmie, udokumentowany dla wirusów, kompleksów immunostymulujących czy liposomów, w którym białko przedostaje się z fagosomu do cytoplazmy, a następnie wchodzi na ścieżkę TAP-zależnej prezentacji [75]. Drugim sposobem jest opuszczenie

fagosomu przez antygen, jego obróbka w proteasomie, a następnie powrót do fagosomu, w którym zachodzi łączenie z MHC klasy I [67]. Trzecia ścieżka zwana wakuolarną różni się od pierwszej brakiem zaangażowania transporterów TAP i proteasomu w kompleksowaniu antygeny z MHC [67].

Najczęściej wykorzystywany jest klasyczny, endogenny szlak prezentacji. Białka cytoplazmatyczne lub jądrowe podlegają w nim ubikwitynylacji, a następnie degradacji w proteasomie. Są to białka, których czas trwania kończy się, białka będące defektywnymi produktami translacji zwanymi DRiPs (defective ribosomal products) lub białkowe produkty patogenów wewnątrzkomórkowych. Powstałe w wyniku degradacji peptydy są translokowane do retikulum endoplazmatycznego (ER) przez białka transportujące TAP (transporters associated with antigen presentation), gdzie łączą się z cząsteczkami MHC I. Heterodimery MHC I składają się z polimorficznych łańcuchów: ciężkiego α i lekkiego zwanego β_2 -mikroglobuliną (β_2m). Związanie 8–10-aminokwasowego peptydu do rowka MHC I zapewnia stabilność całej strukturze. W stanie nie wiążącym peptydu łańcuchy MHC są stabilizowane przez białka chaperonowe ER takie jak kalretikulina, ERp57, izomeraza PDI czy tapazyna. Ostatnie z wymienionych białek oddziałuje z transporterem TAP, zapewniając łączność między procesem translokacji peptydu do ER i jego dostarczaniem do MHC I. Po związaniu peptydu białka chaperonowe są uwalniane, a kompleksy są transportowane na powierzchnię komórki, gdzie mogą być rozpoznane przez limfocyty T cytotoksyczne (CD8⁺, Tc) [56].

W przeciwieństwie do MHC klasy I, kompleksy MHC klasy II są obecne na profesjonalnych komórkach prezentujących antygen takich jak komórki dendrytyczne (DC), makrofagi i limfocyty B. Ich ekspresja może być jednak wzbudzona przez IFN- γ lub inne czynniki na nieprofesjonalnych komórkach prezentujących, takich jak fibroblasty, komórki nabłonkowe, keratynocyty, co obserwuje się w przypadku dermatoz, a także na jelitowych komórkach glejowych w przebiegu choroby Crohna. Kompleksy MHC II powstają w ER z transmembranowych łańcuchów α i β i połączonych z łańcuchem niezmiennym Ii zapobiegającym tworzeniu kompleksów z peptydami pochodzącymi z degradacji wewnątrzkomórkowych białek. Kompleksy te trafiają do endosomu MIIC (MHC class II compartment), gdzie łańcuch Ii jest trawiony. Pozostały w rowku heterodimeru peptyd CLIP jest następnie wymieniany przy udziale chaperonu HLA-DM na specyficzny peptyd pochodzenia pozakomórkowego uzyskany poprzez degradację na ścieżce endosomalnej (Rys. 4). Następnie kompleksy MHC II-peptyd są transportowane na powierzchnię komórki, gdzie mogą zaprezentować antygen limfocytom T CD4⁺ [56].



Rys. 4. Ścieżka prezentacji antygeny w kompleksach z cząsteczkami MHC klasy II.

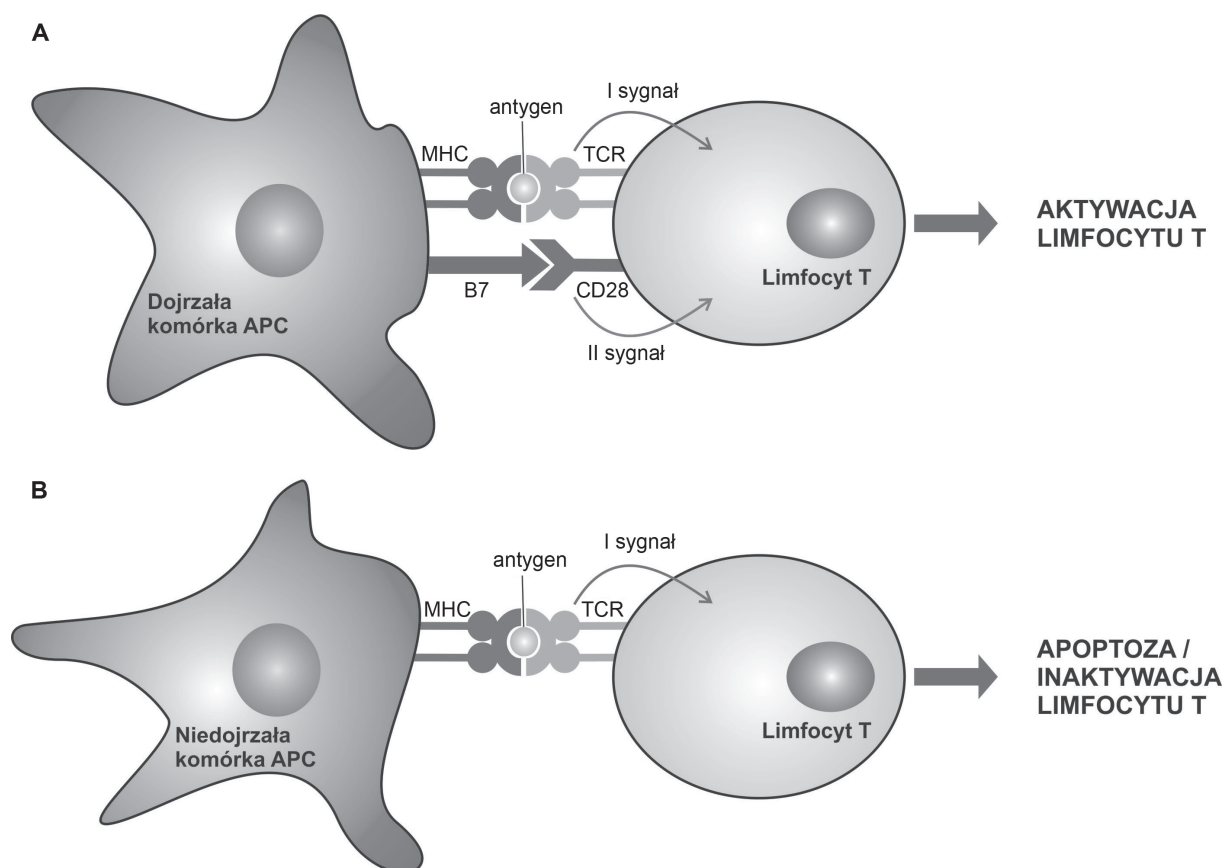
Składanie heterodimerów MHC II z łańcuchów α i β oraz łańcucha zmiennego Ii odbywa się w ER. Przy udziale aparatu Golgiego są one bezpośrednio lub poprzez błonę komórkową transportowane do kompartmentu MIIC. W MIIC łańcuch Ii oraz białka pobrane poprzez endocytozę są trawione przez obecne tam proteazy. Peptyd CLIP będący produktem degradacji Ii początkowo blokuje rowek wiążący peptyd w dimerze MHC II, a następnie jest wymieniany na antygenowy peptyd przy pomocy chaperonu HLA-DM. Kompleksy peptyd-MHC II są kolejno transportowane na powierzchnię błony komórki APC, gdzie mogą być rozpoznane przez limfocyty pomocnicze. APC – komórka prezentująca antygen; ER – retikulum endoplazmatyczne; TCR – receptor limfocyty T; CLIP – fragment peptydu Ii związanego z MHC II; MIIC – kompartment MHC II.

Cytotoksyczne lub pomocnicze limfocyty T do proliferacji i różnicowania w komórki efektorowe wymagają obecności trzech sygnałów. Dwa z nich dostarczane są przez komórki dendrytyczne, których rola w aktywacji bądź wywołaniu stanu anergii limfocytów jest kluczowa. Pierwszy sygnał zapewnia interakcja cząsteczek MHC wiążących peptyd na komórce dendrytycznej z receptorem TCR (T cell receptor) na limfocycie. W celu uniknięcia anergii limfocytów T oraz umożliwienia im proliferacji niezbędny jest drugi, kostymulujący sygnał zapewniany przez interakcję cząsteczek kostymulatorowych obecnych jedynie na dojrzałych APC, takich jak białka B7 (CD80 i CD86) łączących się z powierzchniowymi cząsteczkami CD28 limfocytów T (Rys. 5). Ekspresja białek B7 na komórkach prezentujących antygen wzrasta w trakcie ich dojrzewania wskutek aktywacji przez związki, których źródłem są patogeny i jest wzmagana przez cytokiny, które stanowią trzeci sygnał aktywacji. Stopień ekspresji CD80 i CD86 warunkuje z kolei interakcję między cząsteczkami CD40 na komórkach dendrytycznych i ligandem CD40L na limfocytach. Aktywowane limfocyty CD4⁺ wytwarzają CD40L, który stymuluje ekspresję CD40 na APC, przez co zyskują one zdolność pobudzenia antygenowo swoistych limfocytów CD8⁺. Interakcja między cząsteczką kostymulatorową a CD28 limfocyty T indukuje aktywny transport białek sygnał-

wych limfocyty T do miejsca kontaktu z komórką APC. Ich akumulacja wzmagą intensywność i wydłuża czas trwania procesu sygnalizacyjnego zapoczątkowanego przez pierwszy sygnał.

W przypadku infekcji patogenami wewnątrzkomórkowymi komórkami efektorowymi odpowiedzi odpornościowej są limfocyty CD8⁺. Ich aktywacja zależy od obecności antygenowo-specyficznego prekursora, siły oddziaływania receptora TCR z kompleksem MHC I-peptyd czy poziomu cytokin prozapalnych. W przeciwieństwie do limfocytów Th, zapoczątkowanie programu prowadzącego do osiągnięcia funkcji efektorowej oraz wytworzenia pamięci immunologicznej przez limfocyty Tc wymaga uzyskania trzeciego sygnału zapewnianego przez IL-12 lub IFN- α . W przypadku jego braku dochodzi jedynie do ograniczonej klonalnej ekspansji i wytworzenia stanu tolerancji [52].

Rola limfocytów CD4⁺ w inicjowaniu odpowiedzi limfocytów CD8⁺ jest złożona i w dużej mierze zależy od tego, w jakich warunkach analizowany jest dany model infekcji. Liczne eksperymenty, w których dokonano immunizacji przy pomocy wirulentnych (adenowirusy, wirus grypy) lub nieinfekcyjnych czynników (owoalbumina jaja kurzego) wykazały, że limfocyty Th są niezbędne do zajścia odpowiedzi typu komórkowego, gdyż aktywują APC dostarczając ligand CD40L w procesie zwanym „licencjonowaniem”. Z drugiej strony



Rys. 5. Ścieżki aktywacji limfocytów T.

A. Dojrzała komórka APC aktywuje limfocyt T dostarczając 2 sygnały. B. Niedojrzała komórka APC dostarcza jedynie I sygnał, co prowadzi do śmierci lub inaktywacji limfocyta.

niejednokrotnie w toku badań wykazano, że w przypadku infekcji patogenami takimi jak wirus limfocytarnego zapalenia splotu naczyniówkowego (LCMV) czy wirus HIV dochodzi do wzbudzenia silnej odpowiedzi limfocytów $CD8^+$, niezależnej od pomocy limfocytów pomocniczych, co związane jest ze zdolnością danych czynników infekcyjnych do aktywacji APC poprzez receptory PRR (pattern recognition receptors). Udokumentowano także przypadki, w których mimo wykorzystania tego samego modelu infekcji uzyskiwano rozbieżne rezultaty dotyczące roli limfocytów $CD4^+$ w generowaniu odpowiedzi limfocytów $CD8^+$ [88]. Wszystkie wirusowe i bakteryjne patogeny niosą ligandy PRR (m. in. LPS, CpG, DNA, flagellinę), dzięki którym mogą wzbudzać odpowiedź zapalną i prowadzić do aktywacji APC. Nadal nie jest więc jasne, które z interakcji między PAMP i PRR sprawiają, że aktywacja APC jest zależna lub niezależna od limfocytów Th. W przypadku infekcji patogenami niosącymi słabe ligandy PRR, limfocyty $CD4^+$ wspomagają dojrzewanie APC poprzez regulację ekspresji cząsteczek kostymulatorowych oraz zapewnianie trzeciego sygnału ze strony cytokin takich jak IL-12. Infekcje patogenami, które indukują słabą syntezę IFN typu I mogą również wymagać obecności limfocytów pomocniczych do wytworze-

nia trzeciego sygnału dla limfocytów cytotoksycznych poprzez indukcję wytwarzania IL-12 w komórkach dendrytycznych. W przeciwieństwie do wyżej wymienionych, infekcje patogenami, które wywołują silną odpowiedź zapalną i produkcję wysokich stężeń IFN typu I wiążą się z wystarczającą regulacją ekspresji cząsteczek kostymulatorowych na komórkach prezentujących antygen, w związku z czym udział limfocytów $CD4^+$ w ich dojrzewaniu nie jest wymagany [9].

5. Pamięć immunologiczna

Bardzo ważnym aspektem przebiegu swoistej odpowiedzi immunologicznej jest indukcja pamięci immunologicznej. Komórki pamięci są komórkami potomnymi naiwnych limfocytów, które uległy klonalnej ekspansji w trakcie odpowiedzi immunologicznej i przetrwały po wyeliminowaniu antygeny. Zapewniają one natychmiastową ochronę organizmu przy ponownym kontakcie z danym antygenem. Limfocyty T pamięci zdecydowanie różnią się od limfocytów T naiwnych, ponieważ odpowiadają na niższe stężenia antygeny, produkują szerszy wachlarz antywirusowych oraz prozapalnych cytokin, wzbudzają szybką cytoli-

tyczną aktywność oraz skuteczniej migrują do innych tkanek objętych infekcją [69]. Udowodniono również, że dzielą się one w znacznie szybszym tempie niż limfocyty T naiwne tuż po rozpoczęciu infekcji wirusowej, ale podobnie jak one wykazują 48–72-godzinną fazę opóźnienia, w której nie ulegają podziałom [87].

Komórki T pamięci dzielą się na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowią efektorowe limfocyty T pamięci (T_{EM}), które rezydują w tkankach lub krążą po organizmie. Są one odpowiedzialne za natychmiastową obronę organizmu przed patogenami ze względu na zachowaną gotowość do pełnienia funkcji efektorowej. Do drugiej grupy należą limfocyty T_{CM} , centralne limfocyty pamięci, które nadzorują obwodowe tkanki limfoidalne, gdzie mogą proliferować w odpowiedzi na prezentację antygeny przez APC [69].

Komórki pamięci stanowią jedynie niewielką frakcję limfocytów powstałych podczas odpowiedzi immunologicznej. Stosunek prekursorów limfocytów efektorowych i pamięci zależy od różnej ekspresji czynników transkrypcyjnych, na którą wpływają z kolei stymulacja przez antygen, cytokiny i wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne. W toku analiz naiwnych limfocytów T znakowanych genetycznymi znacznikami w warunkach lokalnej i systemowej infekcji wykazano, że, niezależnie od warunków, jednocześnie zachodzi różnicowanie do obu typów komórek [28]. Czas życia limfocytów pamięci oraz ich liczba zależą od poziomu cytokin. W przypadku limfocytów pamięci $CD4^+$ i $CD8^+$, cytokinami umożliwiającymi ich przetrwanie są IL-7 i IL-15, indukujące proliferację [78]. Sun i wsp. [76] w badaniach z wykorzystaniem myszy laboratoryjnych pozbawionych limfocytów $CD4^+$ wykazali, że właśnie limfocyty $CD4^+$ są odpowiedzialne nie tylko za dostarczanie trzeciego sygnału indukcji niezbędnego do różnicowania limfocytów Tc, ale również za utrzymanie populacji limfocytów $CD8^+$ pamięci. Za populację długożyjących limfocytów T pamięci uważa się limfocyty T_{CM} , w związku z czym obecnie prowadzi się intensywne badania nad opracowaniem leków sprzyjających różnicowaniu limfocytów naiwnych $CD4^+$ do komórek pamięci tego typu. Araki i wsp. [5] dowiedli, że rapamycyna, obniżając aktywność kinazy treoninowo-serynowej mTOR będącej sensorem różnych czynników środowiskowych i regulatorem metabolizmu komórkowego, wpływa na przyspieszoną konwersję naiwnych limfocytów T do limfocytów T_{CM} .

6. Szczepionki indukujące odpowiedź typu komórkowego

Preparaty szczepionkowe konstruowane w przeszłości oparte na inaktywowanych organizmach lub produkowanych przez nie białkach zostały zaprojektowane

w taki sposób, aby stymulować odpowiedź humoralną skierowaną przeciw powierzchniowym cząsteczkom komórek bakteryjnych czy wirusów. Dowiedziono jednak, że odpowiedź taka jest nieskuteczna w wywoływaniu odporności przeciw patogenom wewnątrzkomórkowym [16]. Preparaty nowej generacji powinny wzbudzać odpowiedź typu komórkowego z udziałem limfocytów T_h oraz T_c , gdyż jedynie te komórki mogą wywoływać ochronę przed patogenami, które wykazują dużą zmienność serotypową (adenowirusy), prowadzą wewnątrzkomórkowy tryb życia lub które cechuje zdolność do wytwarzania form latentnych (np. HIV, *Herpes*, HBV, HCV, *Helicobacter pylori*, *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Francisella tularensis*, *Salmonella enterica*, *Brucella* spp., *Burkholderia* spp.). Należy podkreślić, że ten typ odpowiedzi chroni także przed rozwojem nowotworów lub chorobami autoimmunizacyjnymi. Najnowsze badania dotyczące odpowiedzi immunologicznej myszy zakażonych prątkami gruźlicy dowodzą, że limfocyty B mogą regulować przebieg infekcji *M. tuberculosis* poprzez produkcję cytokin czy przeciwciał, jednak ich rola w kontroli zakażenia jest poboczna [83]. Limfocyty B mogą mieć jedynie ograniczony kontakt z antygenami prątków tuż przed ich wniknięciem do komórki gospodarza lub w czasie ich rozprzestrzeniania między komórkami. Szczepionki indukujące odpowiedź komórkową muszą być konstruowane w sposób umożliwiający dostarczenie antygeny do APC, dzięki czemu będzie on prezentowany w kontekście cząsteczek MHC na powierzchni komórki. Głównym zadaniem współczesnej wakcynologii jest opracowanie preparatów wzbudzających odpowiedź typu komórkowego. Nowe szczepionki powinny być więc konstruowane tak, aby wybiórczo aktywować limfocyty T o określonym fenotypie i w ściśle określonej lokalizacji. Najważniejszym aspektem badań jest opracowanie metod generowania stabilnej puli limfocytów T pamięci prawidłowo umiejscowionych w szczepionym organizmie w taki sposób, aby wektor szczepionkowy był jak najbardziej bezpieczny dla szczepionego organizmu, a patogen w przypadku infekcji był jak najszybciej usuwany. W celu dobrania warunków sprzyjających wywoływaniu długotrwałej odporności szczepionego organizmu opracowano szereg systemów dostarczania antygeny, do których należą szczepionki pojednostkowe kierowane i wzmacniane przy udziale adiuwantów oraz szczepionki wektorowe wykorzystujące wirusy oraz żywe atenuowane lub niewirulentne bakterie.

7. Szczepionki pojednostkowe

Próby opracowania nowych szczepionek pojednostkowych podyktowane są wzrastającym zapotrzebowaniem na szczepionki bardzo dobrze zdefiniowane

pod względem molekularnym, które zastąpią preparaty oparte na całych inaktywowanych patogenach zawierających wiele antygenów jednocześnie. Obecnie podejmuje się próby konstrukcji szczepionek opartych na wybranych antygenach będących celem dla układu odpornościowego, a nawet na ich najbardziej immunogennych, pojedynczych peptydach zwanych epitopami, pochodzących od czynnika infekcyjnego, komórki nowotworowej bądź alergenu. Szczepionki o minimalnej zawartości antygenów, cechujące się jednocześnie wysoką specyficnością opracowywane są na podstawie wysokoprzepustowych analiz *in silico* lub eksperymentalnych metod mapowania epitopów [49]. Docelowe preparaty mogą być wprowadzane jako oczyszczone białko, peptyd lub niebiałkowy składnik patogenu bądź ulegać ekspresji z wektora plazmidowego lub zrekombinowanego wirusa. Poszukiwanie podjednostkowych szczepionek stanowi obecnie ważny trend współczesnej wakcynologii. Większość opracowywanych szczepionek wywołujących odporność przeciw leishmaniozom wywoływanym przez wiciowce z rodziny *Leishmania* ma podjednostkową formę. Dowiedziono skuteczności zastosowania szczepionki zawierającej białko gp63 z adiuwantem hsp70, która powodowała wzrost poziomu IFN- γ oraz obniżenie ekspresji IL-4 i IL-10 w surowicy myszy laboratoryjnych [42]. Trwają również prace nad szczepionką podjednostkową wywołującą odporność przeciw *Chlamydia muridarum*, w której wykorzystano główne białko błony zewnętrznej MOMP [81] czy przeciw *F. tularensis*, w której białko szoku cieplnego DnaK połączono z powierzchniowym białkiem patogenu Tul4 [7]. Obie szczepionki stymulowały wydzielanie IFN- γ oraz produkcję przeciwciał. W drugą fazę badań klinicznych wchodzi obecnie szczepionka H56 przeciw *M. tuberculosis* zawierająca trzy gruźlicze antygeny: Ag85B, ESAT-6 oraz białko stanu latencji Rv2660c, jak również adiuwant IC31, która w myszach wzbudza silną odpowiedź limfocytów CD4⁺ i powstrzymuje reaktywację latentnej formy gruźlicy [86].

W ciągu ostatnich 20 lat najwięcej uwagi poświęcono konstrukcji szczepionek DNA, które z powodzeniem wprowadzono do użytku w weterynarii m.in. do prewencji zakażeń łososi wodnymi rabdowirusami [26] czy zachorowań psów na czerniaka złośliwego jamy ustnej [33]. Pomimo sukcesu szczepionek DNA o weterynaryjnym zastosowaniu, istnieje silna potrzeba optymalizacji warunków ich użycia do szczepienia ludzi. Podejmowane są liczne próby opracowania wektorów DNA – sukcesem zakończyła się między innymi druga faza badań klinicznych ludzkiej terapeutycznej szczepionki DNA VGX-3100 w postaci plazmidu kodującego antygeny E6/E7 wirusów HPV 16 i HPV 18 dostarczanego przy pomocy elektroporacji *in vivo* (dane National Cancer Institute z lipca 2014 roku). Podanie szczepionki kobietom, u których wykryto raka szyjki macicy

typu CIN 2/3 doprowadziło do indukcji limfocytów T cytotoksycznych i znacznego ograniczenia wzrostu nowotworu lub jego zaniku [10].

8. Adiuwanty

Molekularna formuła szczepionkowa często bywa słabo immunogenna, co sprawia, że poszukiwane są odpowiednie adiuwanty, formuły szczepionkowe oraz wektory wzmagające poziom odpowiedzi komórkowej.

Adiuwantem szczepionkowym określa się składnik, który może wspomagać efektywność szczepionki poprzez indukcję silnej odpowiedzi immunologicznej. Koncepcja zastosowania adiuwantów została zaproponowana w 1925 roku przez Ramona, który zaobserwował, że dodanie do szczepionek tężcowej i błoniczej substancji takich jak agar, tapioka, lecytyna, olej krochmalowy czy saponina powoduje wzrost miana specyficznych przeciwciał [71]. Jednocześnie, w 1926 roku, Glenny i wsp. zaobserwowali, że nanoszenie antygeny na nierozpuszczalne cząsteczki związków glinu przed immunizacją generuje lepszą odpowiedź za pośrednictwem przeciwciał niż w przypadku zastosowania rozpuszczalnej formy immunogenego białka [51]. Od tego odkrycia związki glinu były bardzo powszechnie wykorzystywane do wzmagania odpowiedzi immunologicznej.

Zastosowanie adiuwantów w wakcynologii jest bardzo szerokie – są one wykorzystywane do modulowania odpowiedzi immunologicznej poprzez dostarczenie antygeny w natywnej formie, redukują potrzebę wieloetapowej immunizacji i obniżają tym samym jej koszty, a także przyczyniają się do wzmożonej odpowiedzi u dzieci lub dorosłych pacjentów z obniżoną odpornością [1]. Mogą być również podzielone na 2 klasy w zależności od dominującego mechanizmu działania na: a) systemy nośnikowe oraz b) wzmacniacze odpowiedzi immunologicznej. Systemy nośnikowe koncentrują antygen i prezentują go w zorganizowanej formie, podczas gdy wzmacniacze aktywują mechanizmy wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [53]. Efektami działania adiuwantów są: wzrost produkcji przeciwciał i zwiększenie populacji antygenowo-specyficznych limfocytów T, wydłużenie czasu trwania odpowiedzi, wzmocniona ochrona przeciw różnym wariantom tego samego patogenu czy zmniejszona liczba dawek wymaganych do uzyskania ochronnego poziomu przeciwciał czy limfocytów pamięci. Tabela II przygotowana według publikacji przeglądowej Mohan i wsp. [53] przedstawia listę znanych adiuwantów oraz mechanizmy ich działania.

Wyniki najnowszych badań nad zastosowaniem nowoczesnych systemów adiuwantów wspomagających indukcję odpowiedzi immunologicznej przez szczepionki

Tabela II
Adiuwanty szczepionkowe

Typ	Formuła	Działanie
SOLE ALUMINIUM	fosforan aluminium, wodorotlenek aluminium	spowalnianie tempa uwalniania antygeny, wydłużanie kontaktu antygeny z układem immunologicznym, stymulowanie odpowiedzi limfocytów Th2
INNE SOLE MINERALNE, np. fosforan wapnia	sole wapnia, żelaza, cyrkonu	ułatwiona adsorpcja antygeny, indukcja wysokiego poziomu przeciwciał IgG
KOMPLETNY ADIUWANT FREUNDA	inaktywowane termicznie komórki z rodzaju <i>Mycobacterium</i>	stymulacja komórkowej odpowiedzi immunologicznej oraz produkcji IgG i IgA
EMULSJE (niekompletny adiuwant Freunda, montanid, MF59, adiuwant 65)	typu „olej w wodzie” i „woda w oleju”	stymulacja limfocytów B i Tc
BAKTERYJNE		
TOKSYNY: toksyna CT <i>Vibrio cholerae</i> toksyna PT <i>Bordetella pertussis</i> toksyna A i B <i>Clostridium difficile</i> toksyna STx <i>Shigella dysenteriae</i> enterotoksyny <i>Staphylococcus</i>	mieszana lub koniugowana z antygenami śluzówkowymi inaktywowane komórki <i>B. pertussis</i> (mieszanina toksyny zawiera LPS) oczyszczony preparat oczyszczony preparat oczyszczony preparat	wzmaganie immunogenności słabych antygenów wzmaganie komórkowej odpowiedzi immunologicznej zwiększanie poziomu przeciwciał IgA wzmaganie odpowiedzi humoralnej i komórkowej zwiększanie poziomu przeciwciał IgG i IgA
NIETOKSYCZNE BIAŁKA: lipopeptydy dipeptyd muramyłowy (MDP)	izolowane z bakteryjnych lipoprotein izolacja ze ściany komórkowej mykobakterii	adiuwanty przy szczepieniach drogą pokarmową stymulacja niespecyficznego mechanizmu skierowanego przeciw bakteriom i komórkom rakowym
proteosomy	niejednorodne preparaty błony zewnętrznej meningokoków	zwiększanie poziomu IgA
LIPOSOMY	syntetyczne sfery składające się z warstwy lipidowej otaczającej antygen	wzmaganie humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej
ŚRODKI POWIERZCHNIOWO CZYNNIE (Quil-A)	składnik detergentu saponiny izolowanej z <i>Quillaja saponaria</i>	wzmaganie odpowiedzi przeciw T-zależnym i T-niezależnym antygenom
KOMPLEKSY IMMUNOSTYMULUJĄCE (ISCOM)	cząstki formowane podczas mieszania cholesterolu z Quil-A	stymulacja produkcji immunoglobulin wszystkich klas, wzmaganie komórkowej odpowiedzi immunologicznej, w tym odpowiedzi CTL
ADIUWANTY WODOROWĘGLANOWE	złożone związki wodorowęglanowe naturalnego pochodzenia, np. γ -inulina	indukcja humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej
OLIGONUKLEOTYDY CpG	niemetylowane dinukleotydy CpG obecne w DNA bakterii	bezpośrednia aktywacja limfocytów B i komórek dendrytycznych poprzez receptory TLR9, wzmaganie komórkowej odpowiedzi immunologicznej
WZORCE MOLEKULARNE lub ich pochodne (LPS, MPL, peptydoglikan, flagellina, kwasy lipotejchojowe)	składniki komórkowe bakterii lub ich chemicznie uzyskiwane pochodne (np. MPL – lipid A <i>Salmonella minnesota</i> pozbawiony grupy (R)-3-hydroksydekanoilowej	wzmaganie wrodzonych mechanizmów immunologicznych (fagocytozy, wydzielana prostaglandyn, rekrutacji komórek stanu zapalnego) oraz humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej
CYTOKINY GM-CSF	–	indukcja migracji komórek dendrytycznych, zwiększenie ekspresji MHC I na ich powierzchni
INF	–	indukcja proliferacji komórek T, aktywacja komórek NK, modulowanie produkcji cytokin
IL-1	–	rekrutacja neutrofilów do miejsca stanu zapalnego
IL-2	–	wzmaganie komórkowej odpowiedzi immunologicznej limfocytów CD4 ⁺
IL-6	–	stymulacja limfocytów B

Tabela II c.d.

Typ	Formuła	Działanie
IL-12 IL-15 IL-18	–	indukcja komórek NK oraz limfocytów B i T indukcja komórek NK oraz limfocytów T wzmacnianie proliferacji komórek NK oraz limfocytów CD8 ⁺
CHEMOKINY	–	wzmacnianie wrodzonych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej
POLIMERY		
biodegradowalne (polilaktidy PLA, PLG)	–	adsorpcja antygenów na powierzchni lub ich zamknięcie wewnątrz, stopniowe uwalnianie antygeny
niedegradowalne (złoto, lateks, krzem, polistyren)	–	usprawnianie dostarczania antygeny do wnętrza komórek prezentujących antygen
WIRUSOWE		
wirosomy	struktury powstałe z połączenia lipidów błonowych z białkami błonowymi wirionu	dostarczanie antygeny do wnętrza komórek prezentujących antygen
VLP (ang. virus-like particles)	wielkocząsteczkowe kompleksy białek kapsydu nie zawierającego informacji genetycznej	wzmacnianie odpowiedzi humoralnej i komórkowej

DNA u ludzi są obiecujące. W badaniach klinicznych przetestowano już dużą liczbę adiuwantów będących celami receptorów Toll-like takich jak TLR4 lub TLR9. W Stanach Zjednoczonych w 2006 roku za drugi po związkach glinu adiuwant dopuszczony do użytku w licencjonowanych ludzkich szczepionkach uznano monofosfolipid-A (MPL), który jest agonistą TLR4 [29]. W Europie dopuszczone jest również stosowanie wirosomów, cząstek VLP (virus-like particles) i emulsji typu „olej w wodzie” takich jak MF59, AS03 i AF03 [25]. Pozytywne wyniki daje zastosowanie adiuwantów cytokinowych – testuje się między innymi podanie interleukiny-12 stymulującej różnicowanie aktywowanych naiwnych limfocytów T do populacji limfocytów Th1 czy czynnika wzrostu makrofagów GM-CSF, który indukuje dojrzewanie APC [24]. Należy zaznaczyć, że wybór adiuwanta może znacząco wpłynąć na ostateczny wynik szczepienia. Ota i wsp. [59] udowodnili, że obecność glinu w składzie szczepionek używanych w Rozszerzonym Programie Szczepień WHO (Expanded Programme of Immunization, EPI) spowodowała obniżenie skuteczności szczepionki MVA85B stosowanej w immunizacji noworodków przeciw gruźlicy.

Adiuwanty mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako składnik kompleksowego szczepienia podjednostkowymi szczepionkami w immunizacji typu „prime-boost”, która wzmacnia odporność organizmu uprzednio traktowanego szczepionką wektorową. Dzięki tej technice pokonany może być problem pojawiającej się odporności na zastosowany wektor. Lin i wsp. [46] wykazali, że podanie szczepionki H56 w kompleksie z adiuwantem IC31 opóźnia i osłabia objawy kliniczne gruźlicy, a także zapobiega reaktywacji uśpionej infekcji w makakach uprzednio immunizowanych szczepem BCG i eksponowanych na działanie *M. tuberculosis*.

9. Szczepionki wektorowe

Szczepionki wektorowe dostarczają antygeny do komórek prezentujących antygen wykorzystując organizmy posiadające naturalną zdolność do wnikania do wnętrza komórki eukariotycznej, takie jak wirusy czy bakterie. Spośród wszystkich znanych typów szczepionek, szczepionki oparte na żywych atenuowanych mikroorganizmach najskuteczniej indukują komórkowe mechanizmy odporności, przy czym w najwyższym stopniu modulują odpowiedź cytotoksycznych limfocytów T. Skutecznie wzbudzają również syntezę przeciwciał, a niekwestionowaną zaletą ich użycia jest możliwość podania bez użycia strzykawki [70, 82]. Śmierć zainfekowanej komórki dodatkowo promuje fagocytozę przez komórki APC, co przyczynia się do zwiększonej prezentacji antygeny. Wektory oparte na wirusach lub bakteriach za sprawą niesionych przez nie wzorców molekularnych, takich jak LPS, CpG czy flagellina, mają ponadto właściwości auto-adiuwantów, dzięki czemu wzmacniana jest prezentacja heterologicznego antygeny.

Zgodnie z naturalnym cyklem życiowym, wektory wirusowe posiadają zdolność do efektywnego wnikania do ludzkich komórek i do wewnątrzkomórkowej ekspresji niesionych genów. Naśladowanie infekcji ułatwia indukcję silnej odpowiedzi limfocytów T, w tym limfocytów cytotoksycznych, dzięki czemu indukowane jest powstawanie limfocytów T pamięci i trwała odporność przeciw patogenom wewnątrzkomórkowym. Do konstrukcji szczepionek wykorzystywane są zarówno replikujące, jak i niezdolne do replikacji wirusy, takie jak: pokswirusy, adenowirusy, alfawirusy, flawiwirusy, pikornawirusy czy paramyksowirusy. Wybór odpowiedniego wirusowego wektora zależy od charakterystyki

patogenu, przeciw któremu wywoływana jest odpowiedź oraz od tego czy szczepionka ma powodować całkowitą immunizację lub być stosowana w modelu „prime-boost”. Większość wektorów wirusowych będących przedmiotem badań klinicznych opiera się na atenuowanych adenowirusach lub zmodyfikowanym wirusie Ankara (MVA). Adenowirusy dzięki zdolności do replikacji w ludzkich komórkach wydłużają ekspresję antygeny i jego prezentację na komórkach APC, co przyczynia się do wzmożonej odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Duża powszechność infekcji adenowirusowych powoduje jednak, że zachodzi skierowana przeciw wektorowi odpowiedź immunologiczna skutkująca szybkim usuwaniem wirusa i obniżoną immunogennością szczepionki [18]. Dwie szczepionki oparte na adenowirusach 35 i 5 eksprymujących antygen Ag85A *M. tuberculosis* są obecnie w fazie II niezależnych od siebie badań klinicznych w Republice Południowej Afryki [38, 72]. Dowiedziona została ich skuteczność w indukowaniu odporności pacjentów uprzednio szczepionych BCG i wzmaganiu produkcji IFN- γ przez komórki Th i Tc. Podobnie jak w przypadku adenowirusów, niereplikujący wirus MVA ma duży potencjał do indukcji limfocytów CD4⁺. MVA85A jako pierwsza szczepionka na bazie tego wirusa osiągnęła fazę II b badań klinicznych. Badania z udziałem dzieci nie potwierdziły jednak skuteczności szczepionki, natomiast dowiodły zdolności wektora do wzmagania syntezy IFN- γ [79].

Wykorzystanie wektorów wirusowych niesie za sobą pewne ograniczenia, do których zalicza się trudności w produkcji na dużą skalę, ograniczoną wielkość informacji genetycznej pakowanej do kapsydu niektórych wirusów, odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciw samemu wektorowi oraz brak możliwości transdukcji do niektórych typów komórek. Co więcej, wirusy wywołują silną odpowiedź zapalną, a integracja do genomu gospodarza może przyczynić się nawet do wytworzenia stanów chorobowych takich jak białaczka [80]. Alternatywą dla użycia wektorów na bazie wirusów jest wykorzystanie komórek bakteryjnych. W ciągu ostatniego półwiecza postępy w biologii molekularnej i rozumieniu bakteryjnych cykli życiowych przyczyniły się do znacznego postępu w pracach nad stworzeniem wektorów bakteryjnych zdolnych do dostarczania heterologicznych antygenów do komórek APC *in vivo*. Poznano drogi trwałe i dobrze scharakteryzowanej atenuacji genów wirulencji, możliwa stała się regulacja poziomu ekspresji i lokalizacji antygeny niesionego przez komórkę bakteryjną, opracowano różne drogi podania bakteryjnego preparatu szczepionkowego, a co więcej określono potencjał do wzbudzania wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej.

Dużą zaletą wykorzystania żywych wektorów bakteryjnych jest zdolność do naśladowania naturalnej

infekcji, dzięki czemu aktywowana może być zarówno niespecyficzna odpowiedź prozapalna, jak i, w przypadku użycia modyfikowanych szczepów wnikających do komórek APC, antygenowo specyficzna odpowiedź komórkowa. Bakteryjne wektory dzięki jednoczesnemu dostarczaniu sygnału antygenowego oraz wzorców molekularnych związanych z patogenami lub ligandów TLR umożliwiają przełamanie stanu tolerancji organizmu wobec antygeny, co jest podstawowym założeniem immunoterapii opierającej się na odpowiedzi cytotoksycznych limfocytów T. Rozpoznanie niesionych przez komórki APC wzorców prowadzi do pozytywnej regulacji ekspresji cząsteczek kostymulatorowych na powierzchni, dojrzewania i migracji komórek APC, co wzmacnia odpowiedź immunologiczną przeciw dostarczanemu antygenowi. Inną zaletą nośników antygenowych na bazie bakterii jest to, że mogą one być zaprojektowane w taki sposób, aby wywoływać odporność przeciw własnym bądź eksprymowanym heterologicznie antygenom, a składniki szczepionkowe mogą być dostarczone w formie białka, DNA lub terapeutycznego.

10. Bakterie patogenne jako wektory szczepionkowe

Od lat 80. XX wieku podejmowane są liczne próby wykorzystania żywych wektorów bakteryjnych do dostarczania antygenów. Wykorzystują one naturalną zdolność wirulentnych bakterii do wnikania do wnętrza komórek eukariotycznych, dzięki czemu dostarczony antygen może wywoływać komórkową odpowiedź immunologiczną. Do konstrukcji żywych, atenuowanych szczepionek wykorzystuje się bakterie *Shigella flexneri* [90, 92], *S. enterica* [19, 65], *Yersinia enterocolitica* [3], *Listeria monocytogenes* [44, 50], *Mycobacterium bovis* BCG [6, 32] i wiele innych. Do tej pory jedynie dwie szczepionki pozytywnie przeszły testy kliniczne i zostały dopuszczone do użytku [21]. Pierwsza z nich, szczepionka Ty21 uodparniająca na dur brzuszny, zawiera żywe atenuowane bakterie *Salmonella* ser. Typhi podawane doustnie w 3 dawkach w formie płynu lub kwasoodpornych kapsułek. Drugą dostępną szczepionką jest CVD 103-HgR immunizująca przeciw cholerze, która niesie atenuowane komórki *V. cholerae* podawane w płynnej formie w jednej dawce. Obecnie trwają testy kliniczne kilku innych szczepionek przeciw patogenom wewnątrzkomórkowym lub nowotworom. Warta uwagi jest szczepionka VPM1002 będąca w fazie II a badań klinicznych, która poprawia immunogenność szczepu BCG. Opiera się ona na szczepie BCG zmodyfikowanym poprzez wstawienie genu *hly* kodującego główny czynnik patogenyzy *L. monocytogenes*, listeriolizynę O oraz delecję genu *ureC* kodującego ureazę C (BCG Δ ureChly⁺). Listeriolizyna O (LLO) umożliwia ucieczkę z wakuoli do cytoplazmy

zainfekowanej komórki, natomiast delecja ureazy powoduje odpowiednie dla aktywności LLO zakwaszenie wakuoli komórki. Dzięki wprowadzonym zmianom szczep BCG efektywnie ucieka z fagosomu zainfekowanej komórki i przyczynia się do wzmożonej prezentacji antygenów [32]. Zakończyła się również druga faza badań klinicznych szczepionki terapeutycznej ADXS-HPV bazującej na bakterii *L. monocytogenes*, która ma na celu leczenie pacjentek chorujących na raka szyjki macicy wywołanego przez wirus HPV. Atenuowany szczep bakteryjny wydzielający jednocześnie fuzyjne białko kodujące antygen E7 w fuzji z niehemolityczną częścią LLO i adiuwant okazał się mieć skuteczność porównywalną do chemioterapii [50].

W toku licznych badań opracowywane są metody trwałej atenuacji, która w jak najmniejszym stopniu wpływa na immunogenność szczepów bakteryjnych. Ten proces w wielu przypadkach jest jednak bardzo trudny, długotrwały i żmudny, a największe wyzwanie stanowi zachowanie równowagi między minimalną patogennością szczepu a maksymalną zdolnością do indukcji odpowiedzi immunologicznej. Podczas opracowywania nowych wektorów dużą uwagę należy zwracać na fakt, że w zależności od typu modyfikacji można uzyskać zróżnicowaną reakcję odpornościową, np. doustne podanie mutantu PhoP *Salmonella* skutkuje indukcją mechanizmów odporności wrodzonej, podczas gdy mutanty *aroA* wzmacniają odpowiedź limfocytów Th1 [84]. Co więcej, atenuowane szczepy nie są odpowiednimi wektorami szczepionkowymi dla osób o niskiej lub upośledzonej odporności takich jak dzieci, ludzie starsi czy zakażeni wirusem HIV czy dla pacjentów skłonnych do chorób autoimmunizacyjnych.

11. Bakterie niepatogenne jako wektory szczepionkowe

W związku z licznymi zagrożeniami związanymi z wykorzystaniem patogennych bakterii do konstrukcji szczepionek, uwaga badaczy zwróciła się ku wykorzystaniu niewirulentnych gatunków. W przeciwieństwie do atenuowanych, zazwyczaj Gram-ujemnych patogennych szczepów bakterii takich jak *Shigella* czy *Salmonella*, Gram-dodatnie niewirulentne gatunki są bezpieczne, ponieważ stanowią naturalny składnik flory bakteryjnej człowieka lub są powszechnie wykorzystywane przez człowieka w przemyśle. W opracowaniu wektorów z ich użyciem często wykorzystywana jest unikalna cecha bakterii Gram-dodatnich, jaką jest zdolność do tworzenia endospor. Obecnie najczęściej podejmowane są próby konstrukcji niewirulentnych wektorów bakteryjnych z wykorzystaniem wegetywnych bakterii kwasu mlekowego (LAB), m.in. *Lactococcus lactis* [66, 91], *Lactobacillus plantarum* [31],

Lactobacillus casei [45] czy *Streptococcus gordonii* [12], a także spor modelowej bakterii Gram-dodatniej, *B. subtilis* [37, 57, 58].

Główną wadą systemów wykorzystujących niewirulentne gatunki jest brak inwazyjności, co sprawia, że dostarczanie antygenów może być mniej efektywne niż w przypadku wykorzystania patogennych bakterii. Sposobem na rozwiązanie tego problemu może być ekspresja determinantów patogenyzy wirulentnych szczepów w gatunkach niepatogennych. Wśród białek, których aktywność prowadzi do проникnięcia do komórki eukariotycznej oraz ucieczki z fagosomu do cytoplazmy są czynniki wirulencji wewnątrzkomórkowego patogenu *L. monocytogenes*. Guimaraes i wsp. [34] opracowali szczep *L. lactis* produkujący zakotwiczoną w ścianie komórkowej internalinę A *L. monocytogenes*, który był zdolny do inwazji do komórek eukariotycznych *in vitro* i *in vivo*. Samo проникnięcie wektora do komórki gospodarza nie wystarcza jednak do tego, aby antygen był prezentowany w kompleksie z MHC klasy I i by w konsekwencji wzbudzona została odpowiedź limfocytów CD8⁺. Jednym ze sposobów na dostarczenie antygenów do cytoplazmy APC jest również ekspresja listeriolizyny O, głównego czynnika patogenyzy *L. monocytogenes*, który umożliwia translokację komórki bakteryjnej z wakuoli komórki gospodarza do jej cytoplazmy. Za początek badań w tym obszarze uznaje się odkrycie prof. Bieleckiego i wsp. [14], którzy dowiedli, że *B. subtilis* wytwarzający LLO jest zdolny do проникnięcia do nefagocytujących i fagocytujących komórek eukariotycznych, ucieczki z ich wakuoli do cytoplazmy komórki gospodarza i przetrwania w jej wnętrzu. Toksyna swoje właściwości zawdzięcza specyficznej strukturze. Białko o masie 58 kDa ulega sekrecji poza komórkę bakteryjną w postaci rozpuszczalnych w wodzie monomerów, które mogą wiązać się do błon biologicznych zawierających cholesterol i oligomeryzować do struktury β-baryłki, tworząc w błonie pory. LLO jest aktywna jedynie w kwaśnym pH, co ogranicza zakres jej działalności do wakuoli komórki gospodarza i w ten sposób chroni ją przed śmiercią [77]. W trakcie infekcji *L. monocytogenes* odpowiedź limfocytów Th i Tc jest skierowana przeciwko LLO [27]. Permeabilizująca aktywność toksyny umożliwia dostęp heterologicznych antygenów do cytozolu i ich wejście na egzogenną TAP-zależną ścieżkę prezentacji białka. Prezentowany w kontekście MHC klasy I antygen jest rozpoznawany przez limfocyty CD4⁺ i CD8⁺, co prowadzi do kompleksowej odpowiedzi komórkowej. Koekspresja LLO z innymi antygenami jest intensywnie wykorzystywana w badaniach nad konstrukcją żywych szczepionek. Bahey-el-Din i wsp. [11] w badaniach z wykorzystaniem zakażonych myszy wykazali, że jednoczesna ekspresja LLO z białkiem p60 w *L. lactis* skutecznie wywołuje odpowiedź limfocytów Tc, a także zapewnia

odporność na infekcje *L. monocytogenes*. Trwają także zaawansowane badania kliniczne nad modyfikowaną szczepionką przeciwgruźliczą BCG Δ ureChly⁺, w której toksyna dzięki swej aktywności wzmacnia prezentację antygenów *M. tuberculosis* i generowaną dzięki niej pamięć immunologiczną [32]. Aktywność LLO wykorzystywana jest również przy opracowywaniu szczepionek przeciwnowotworowych – Radford i wsp. [63, 64] wykazali, że komórki *Escherichia coli* produkujące LLO oraz owoalbuminę jaja kurzego (OVA) są zdolne do usunięcia komórek czerniaka linii B16-OVA oraz skutecznie zapobiegają wzrostowi nowotworu.

Bardzo interesującą cechą listeriolizyny O jest fakt, że jednocześnie stanowi ona główny czynnik patogenyzy oraz główny immunogen, co sprawia, że jest ona idealnym kandydatem na adiuwant szczepionkowy. Poddanie APC działaniu nanomolarnych, niemających cytotoksycznego efektu, stężeń cytolizyny powodowało aktywację limfocytów CD8⁺, podczas gdy pikomolarnie stężenia wystarczały do zaobserwowania aktywacji komórek CD4⁺ [15]. Co więcej, zainfekowane komórki i rozpoznające je limfocyty T w obecności LLO produkują szerokie spektrum cytokin i chemokin takich jak IL-1, IL-6, IL-12, CCL2, IFN- β czy TNF- α , które aktywują APC i wzmacniają odporność wrodzoną oraz odpowiedź limfocytów Th1 [60]. Huang i wsp. [39] w badaniach z wykorzystaniem spor *B. subtilis* koeksprymujących LLO z antygenem protekcyjnym PA *Bacillus anthracis* potwierdzili wpływ LLO na poprawę odpowiedzi odpornościowej. Zaobserwowali, że spory powodowały wzrost poziomu przeciwciał IgG2a PA swoistych oraz poziomu IFN- γ i IL-12 przy jednocześnie zmniejszonym stężeniu IL-4 w surowicy myszy, co świadczy o wzmożonej odpowiedzi typu Th1. Brak związku między cytotoksycznością a immunogennością czyni ponadto z LLO wyjątkowe białko w immunoterapii nowotworów. Aktywność cytotoksyczna może posłużyć do bezpośredniego zabijania komórek rakowych, natomiast ze względu na swoją immunogenność LLO może mieć również aktywność adiuwantową wykorzystaną przy konstrukcji szczepionek zawierających antygeny nowotworowe, które indukują usuwanie komórek ulegających transformacji nowotworowej. Obie te cechy z powodzeniem mogą być wykorzystane jednocześnie. Stachowiak i wsp. [74] w swoich badaniach analizowali aktywność LLO względem komórek białaczkowych komórek T Jurkat, dowodząc ograniczonej selektywności toksyczności, która z powodzeniem może być zastosowana do niszczenia nowotworów przy zawężeniu obszaru działania do miejsc zawierających zmienione chorobowo komórki.

Drugim sposobem umożliwiającym dostarczenie antygenów do cytoplazmy jest wykorzystanie systemu sekrecji typu 3 (T3SS). T3SS jest skomplikowanym aparatem, który umożliwia wielu Gram-ujemnym bak-

teriom, takim jak: *S. enterica*, *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *E. coli* czy *Pseudomonas aeruginosa* dostarczanie białek efektorowych do cytoplazmy komórki gospodarza. Stworzenie minimalnego, funkcjonalnego systemu wymaga ekspresji ponad 20 genów. Pomimo to, z powodzeniem są one klonowane w niepatogennych bakteriach takich jak *E. coli* K12 [2] czy *P. putida* [89], stając się narzędziem do dostarczania antygenów i indukcji odpowiedzi limfocytów Tc.

12. Podsumowanie

Początek XXI wieku przyniósł wiele nowych odkryć w dziedzinie wakcynologii, które dały początek wdrożeniu nowych preparatów szczepionkowych lub ich doprowadzeniem do zaawansowanych testów klinicznych. Dzięki zastosowaniu odwrotnej wakcynologii i znacznemu poszerzeniu wiedzy immunologicznej z zakresu prezentacji antygeny i indukcji trwałej pamięci immunologicznej testowane są obecnie liczne skierowane przeciw patogenom tj. HIV, malaria, *M. tuberculosis* czy *S. aureus* szczepionki, w opracowaniu których do tej pory zawodziły konwencjonalne metody. Nowatorskie wektory oraz adiuwanty mogą w znacznej mierze prowadzić do opracowania preparatów terapeutycznych do stosowania w leczeniu chorób nowotworowych, przewlekłych infekcji czy chorób autoimmunizacyjnych. Nowoczesne strategie mogą więc nie tyle wzmacniać, ile modulować odpowiedź immunologiczną, prowadząc do osiągnięcia z góry zamierzonego efektu. Prowadzone obecnie testy kliniczne pokazują, że ważna jest nie tylko siła zachodzącej odpowiedzi i miejsce jej indukcji, ale również czas jej trwania oraz trwałość generowanej pamięci. Głównym wyzwaniem jest więc opracowanie skutecznych metod określania immunogenności patogennych i nowotworowych białek, która będzie miała przełożenie na skuteczną immunizację.

Podziękowania

Praca finansowana z grantów Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (nr N R13 0046 06) oraz Narodowego Centrum Nauki (2013/09/N/NZ1/00182).

Piśmiennictwo

1. Aguilar J.C., Rodriguez E.G.: Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, 25, 3752–3762 (2007)
2. Akeda Y., Kimura T., Yamasaki A., Kodama T., Iida T., Honda T., Oishi K.: Functional cloning of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1 in *Escherichia coli* K-12 strain as a molecular syringe. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427, 242–247 (2012)
3. Al-Mariri A., Tibor A., Lestrade P., Mertens P., De Bolle X., Letesson J.J.: *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA

- vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or P39 antigen. *Infect. Immun.* **70**, 1915–1923 (2002)
4. Ansel K.M., Lee D.U., Rao A.: An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat. Immunol.* **4**, 616–623 (2003)
 5. Araki K., Turner A.P., Shaffer V.O., Gangappa S., Keller S.A., Bachmann M.F., Larsen C.P., Ahmed R.: mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*, **460**, 108–112 (2009)
 6. Arbues A., Aguilo J.I., Gonzalo-Asensio J., Marinova D., Uranga S., Puentes E., Fernandez C., Parra A., Cardona P.J., Vilaplana C. *et al.*: Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine*, **31**, 4867–4873 (2013)
 7. Ashtekar A.R., Katz J., Xu Q., Michalek S.M.: A mucosal subunit vaccine protects against lethal respiratory infection with *Francisella tularensis* LVS. *PLoS One*, **7**, e50460 (2012)
 8. Auranen K., Rinta-Kokko H., Halloran M.E.: Estimating strain-specific and overall efficacy of polyvalent vaccines against recurrent pathogens from a cross-sectional study. *Biometrics*, **69**, 235–244 (2013)
 9. Bachmann M.F., Zinkernagel R.M., Oxenius A.: Immune responses in the absence of costimulation: viruses know the trick. *J. Immunol.* **161**, 5791–5794 (1998)
 10. Bagarazzi M.L., Yan J., Morrow M.P., Shen X., Parker R.L., Lee J.C., Giffear M., Pankhong P., Khan A.S., Broderick K.E. *et al.*: Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. *Sci. Transl. Med.* **4**, 155ra138 (2012)
 11. Bahey-El-Din M., Casey P.G., Griffin B.T., Gahan C.G.: Expression of two *Listeria monocytogenes* antigens (P60 and LLO) in *Lactococcus lactis* and examination for use as live vaccine vectors. *J. Med. Microbiol.* **59**, 904–912 (2010)
 12. Beninati C., Oggioni M.R., Boccanera M., Spinosa M.R., Maggi T., Conti S., Magliani W., De Bernardis F., Teti G., Cassone A. *et al.*: Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1060–1064 (2000)
 13. Berche P.: Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. *Clin. Microbiol. Infect.* **18 Suppl. 5**, 1–6 (2012)
 14. Bielecki J., Youngman P., Connelly P., Portnoy D.A.: *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature*, **345**, 175–176 (1990)
 15. Carrero J.A., Vivanco-Cid H., Unanue E.R.: Listeriolysin O is strongly immunogenic independently of its cytotoxic activity. *PLoS One*, **7**, e32310 (2012)
 16. Casadevall A., Pirofski L.A.: A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Adv. Immunol.* **91**, 1–44 (2006)
 17. Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N., McGrady G., Wahl S.M.: Conversion of peripheral CD4+CD25-naïve T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* **198**, 1875–1886 (2003)
 18. Chirmule N., Propert K., Magosin S., Qian Y., Qian R., Wilson J.: Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* **6**, 1574–1583 (1999)
 19. Darji A., Guzman C.A., Gerstel B., Wachholz P., Timmis K.N., Wehland J., Chakraborty T., Weiss S.: Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell*, **91**, 765–775 (1997)
 20. Delany I., Rappuoli R., De Gregorio E.: Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol. Med.* **6**, 708–720 (2014)
 21. Dietrich G., Griot-Wenk M., Metcalfe I.C., Lang A.B., Viret J.F.: Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine*, **21**, 678–683 (2003)
 22. Dong C.: TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 337–348 (2008)
 23. Duhon T., Geiger R., Jarrossay D., Lanzavecchia A., Sallusto F.: Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* **10**, 857–863 (2009)
 24. Flingai S., Czerwonko M., Goodman J., Kudchodkar S.B., Muthumani K., Weiner D.B.: Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants. *Front. Immunol.* **4**, 354 (2013)
 25. Foged C., Hansen J., Agger E.M.: License to kill: Formulation requirements for optimal priming of CD8(+) CTL responses with particulate vaccine delivery systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* **45**, 482–491 (2012)
 26. Garver K.A., LaPatra S.E., Kurath G.: Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in *Chinook Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon. *Dis. Aquat. Organ.* **64**, 13–22 (2005)
 27. Geginat G., Schenk S., Skoberne M., Goebel W., Hof H.: A novel approach of direct *ex vivo* epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **166**, 1877–1884 (2001)
 28. Gerlach C., van Heijst J.W., Swart E., Sie D., Armstrong N., Kerkhoven R.M., Zehn D., Bevan M.J., Schepers K., Schumacher N.: One naïve T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *J. Exp. Med.* **207**, 1235–1246 (2010)
 29. Giannini S.L., Wettendorff M.A. *et al.*: Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*, **24**, 5937–5949 (2006)
 30. Giuliani M.M., Adu-Bobie J., Comanducci M., Arico B., Savino S., Santini L., Brunelli B., Bambini S., Biolchi A., Capecchi B. *et al.*: A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10834–10839 (2006)
 31. Grangette C., Muller-Alouf H., Goudercourt D., Geoffroy M.C., Turner M., Mercenier A.: Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect. Immun.* **69**, 1547–1553 (2001)
 32. Grode L., Ganoza C.A., Brohm C., Weiner J., Eisele B., Kaufmann S.H.: Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open-label randomized clinical trial. *Vaccine*, **31**, 1340–1348 (2013)
 33. Grosenbaugh D.A., Wolchok J.D. *et al.*: Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. *Am. J. Vet. Res.* **72**, 1631–1638 (2011)
 34. Guimaraes V.D., Gabriel J.E., Lefevre F., Cabanes D., Gruss A., Cossart P., Azevedo V., Langella P.: Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes. Infect.* **7**, 836–844 (2005)
 35. Haribhai D., Williams C.B. *et al.*: A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity*, **35**, 109–122 (2011)
 36. Harrington L.E., Hatton R.D., Mangan P.R., Turner H., Murphy T.L., Murphy K.M., Weaver C.T.: Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123–1132 (2005)
 37. Hinc K., Stasilojc M., Piatek I., Peszynska-Sularz G., Isticato R., Ricca E., Obuchowski M., Iwanicki A.: Mucosal adjuvant activity of IL-2 presenting spores of *Bacillus subtilis* in a murine

- model of *Helicobacter pylori* vaccination. *PLoS One*, **9**, e95187 (2014)
38. Hoft D.F., Sadoff J. i wsp.: A recombinant adenovirus expressing immunodominant TB antigens can significantly enhance BCG-induced human immunity. *Vaccine*, **30**, 2098–2108 (2012)
 39. Huang J.M., La Ragione R.M., Cooley W.A., Todryk S., Cutting S.M.: Cytoplasmic delivery of antigens, by *Bacillus subtilis* enhances Th1 responses. *Vaccine*, **26**, 6043–6052 (2008)
 40. Kanampalliar A.M., Soni R., Girdhar A., Tiwari A.: Reverse vaccinology: basics and applications. *J. Vaccines Vaccin.* **4**, 194–198 (2013)
 41. Kanno Y., Vahedi G., Hirahara K., Singleton K., O'Shea J.J.: Transcriptional and epigenetic control of T helper cell specification: molecular mechanisms underlying commitment and plasticity. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 707–731 (2012)
 42. Kaur T., Sobti R.C., Kaur S.: Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* **33**, 95–103 (2011)
 43. Khader S.A., Cooper A.M. i wsp.: IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat. Immunol.* **8**, 369–377 (2007)
 44. Le D.T., Laheru D.A. i wsp.: A live-attenuated Listeria vaccine (ANZ-100) and a live-attenuated Listeria vaccine expressing mesothelin (CRS-207) for advanced cancers: phase I studies of safety and immune induction. *Clin. Cancer Res.* **18**, 858–868 (2012)
 45. Lee J.S., Poo H., Han D.P., Hong S.P., Kim K., Cho M.W., Kim E., Sung M.H., Kim C.J.: Mucosal immunization with surface-displayed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein on *Lactobacillus casei* induces neutralizing antibodies in mice. *J. Virol.* **80**, 4079–4087 (2006)
 46. Lin P.L., Andersen P. i wsp.: The multistage vaccine H56 boosts the effects of BCG to protect cynomolgus macaques against active tuberculosis and reactivation of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Clin. Invest.* **122**, 303–314 (2012)
 47. Lopez A.L., Gonzales M.L., Aldaba J.G., Nair G.B.: Killed oral cholera vaccines: history, development and implementation challenges. *Ther. Adv. Vaccines*, **2**, 123–136 (2014)
 48. Luksza M., Lassig M.: A predictive fitness model for influenza. *Nature*, **507**, 57–61 (2014)
 49. Lundegaard C., Lund O., Nielsen M.: Predictions versus high-throughput experiments in T-cell epitope discovery: competition or synergy? *Expert Rev. Vaccines*, **11**, 43–54 (2012)
 50. Maciag P.C., Radulovic S., Rothman J.: The first clinical use of a live-attenuated *Listeria monocytogenes* vaccine: a Phase I safety study of Lm-LLO-E7 in patients with advanced carcinoma of the cervix. *Vaccine*, **27**, 3975–3983 (2009)
 51. Marrack P., McKee A.S., Munks M.W.: Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 287–293 (2009)
 52. Mescher M.F., Curtsinger J.M., Agarwal P., Casey K.A., Gerner M., Hammerbeck C.D., Popescu F., Xiao Z.: Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* **211**, 81–92 (2006)
 53. Mohan T., Verma P., Rao D.N.: Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *Indian J. Med. Res.* **138**, 779–795 (2013)
 54. Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **136**, 2348–2357 (1986)
 55. Murphy C.A., Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W., McClanahan T., Kastelein R.A., Sedgwick J.D., Cua D.J.: Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **198**, 1951–1957 (2003)
 56. Neeffes J., Jongsma M.L., Paul P., Bakke O.: Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 823–836 (2011)
 57. Negri A., Potocki W., Iwanicki A., Obuchowski M., Hinc K.: Expression and display of *Clostridium difficile* protein FliD on the surface of *Bacillus subtilis* spores. *J. Med. Microbiol.* **62**, 1379–1385 (2013)
 58. Ning D., Leng X., Li Q., Xu W.: Surface-displayed VP28 on *Bacillus subtilis* spores induce protection against white spot syndrome virus in crayfish by oral administration. *J. Appl. Microbiol.* **111**, 1327–1336 (2011)
 59. Ota M.O., McShane H. i wsp.: Immunogenicity of the tuberculosis vaccine MVA85A is reduced by coadministration with EPI vaccines in a randomized controlled trial in Gambian infants. *Sci. Transl. Med.* **3**, 88ra56 (2011)
 60. Pamer E.G.: Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 812–823 (2004)
 61. Park H., Li Z., Yang X.O., Chang S.H., Nurieva R., Wang Y.H., Wang Y., Hood L., Zhu Z., Tian Q. et al.: A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* **6**, 1133–1141 (2005)
 62. Pratama A., Vinuesa C.G.: Control of TFH cell numbers: why and how? *Immunol. Cell. Biol.* **92**, 40–48 (2014)
 63. Radford K.J., Higgins D.E., Pasquini S., Cheadle E.J., Carta L., Jackson A.M., Lemoine N.R., Vassaux G.: A recombinant *E. coli* vaccine to promote MHC class I-dependent antigen presentation: application to cancer immunotherapy. *Gene Ther.* **9**, 1455–1463 (2002)
 64. Radford K.J., Jackson A.M., Wang J.H., Vassaux G., Lemoine N.R.: Recombinant *E. coli* efficiently delivers antigen and maturation signals to human dendritic cells: presentation of MART1 to CD8+ T cells. *Int. J. Cancer*, **105**, 811–819 (2003)
 65. Roberts M., Chatfield S., Pickard D., Li J., Bacon A.: Comparison of abilities of *Salmonella enterica* serovar typhimurium aroA aroD and aroA htrA mutants to act as live vectors. *Infect. Immun.* **68**, 6041–6043 (2000)
 66. Robinson K., Chamberlain L.M., Schofield K.M., Wells J.M., Le Page R.W.: Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat. Biotechnol.* **15**, 653–657 (1997)
 67. Rock K.L., Shen L.: Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol. Rev.* **207**, 166–183 (2005)
 68. Rote N.S.: Adaptive immunity (w) Pathophysiology: The biological basis for disease in adults and children, red. K. McCance, S. Huether, Elsevier Mosby, St. Louis, 2014, s. 224–261
 69. Sallusto F., Lanzavecchia A., Araki K., Ahmed R.: From vaccines to memory and back. *Immunity*, **33**, 451–463 (2010)
 70. Seder R.A., Hill A.V.: Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature*, **406**, 793–798 (2000)
 71. Sivakumar S.M., Safhi M.M., Kannadasan M., Sukumaran N.: Vaccine adjuvants – Current status and prospects on controlled release adjuvancity. *Saudi Pharm. J.* **19**, 197–206 (2011)
 72. Smaill F., Xing Z. i wsp.: A human type 5 adenovirus-based tuberculosis vaccine induces robust T cell responses in humans despite preexisting anti-adenovirus immunity. *Sci. Transl. Med.* **5**, 205ra134 (2013)
 73. Smith K.A.: Smallpox: can we still learn from the journey to eradication? *Indian J. Med. Res.* **137**, 895–899 (2013)
 74. Stachowiak R., Lyzniak M., Grabowska M., Roeske K., Jagielski T., Bielecki J., Budziszewska B.K., Hoser G., Kawiak J.: Cytotoxicity of purified listeriolysin O on mouse and human leukocytes and leukaemia cells. *BMC Biotechnol.* **14**, 77 (2014)
 75. Sun H.X., Xie Y., Ye Y.P.: ISCOMs and ISCOMATRIX. *Vaccine*, **27**, 4388–4401 (2009)

76. Sun J.C., Williams M.A., Bevan M.J.: CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat. Immunol.* **5**, 927–933 (2004)
77. Sun R., Liu Y.: Listeriolysin O as a strong immunogenic molecule for the development of new anti-tumor vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* **9**, 1058–1068 (2013)
78. Surh C.D., Sprent J.: Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity*, **29**, 848–862 (2008)
79. Tameris M.D., McShane H. i wsp.: Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*, **381**, 1021–1028 (2013)
80. Thomas C.E., Ehrhardt A., Kay M.A.: Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 346–358 (2003)
81. Tifrea D.F., Pal S., Toussi D.N., Massari P., de la Maza L.M.: Vaccination with major outer membrane protein proteosomes elicits protection in mice against a *Chlamydia* respiratory challenge. *Microbes Infect.* **15**, 920–927 (2013)
82. Titball R.W.: Vaccines against intracellular bacterial pathogens. *Drug Discov. Today*, **13**, 596–600 (2008)
83. Torrado E., Fountain J.J., Robinson R.T., Martino C.A., Pearl J.E., Rangel-Moreno J., Tighe M., Dunn R., Cooper A.M.: Differential and site specific impact of B cells in the protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in the mouse. *PLoS One*, **8**, e61681 (2013)
84. VanCott J.L., Chatfield S.N., Roberts M., Hone D.M., Hohmann E.L., Pascual D.W., Yamamoto M., Kiyono H., McGhee J.R.: Regulation of host immune responses by modification of *Salmonella* virulence genes. *Nat. Med.* **4**, 1247–1252 (1998)
85. Veldhoen M., Uyttenhove C., van Snick J., Helmby H., Westendorp A., Buer J., Martin B., Wilhelm C., Stockinger B.: Transforming growth factor-beta ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* **9**, 1341–1346 (2008)
86. Weiner J., Kaufmann S.H.: Recent advances towards tuberculosis control: vaccines and biomarkers. *J. Intern. Med.* **275**, 467–480 (2014)
87. Whitmire J.K., Eam B., Whitton J.L.: Tentative T cells: memory cells are quick to respond, but slow to divide. *PLoS Pathog.* **4**, e1000041 (2008)
88. Wiesel M., Oxenius A.: From crucial to negligible: functional CD8(+) T-cell responses and their dependence on CD4(+) T-cell help. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1080–1088 (2012)
89. Wilson J.W., Nickerson C.A.: Cloning of a functional *Salmonella* SPI-1 type III secretion system and development of a method to create mutations and epitope fusions in the cloned genes. *J. Biotechnol.* **122**, 147–160 (2006)
90. Xu F., Hong M., Ulmer J.B.: Immunogenicity of an HIV-1 gag DNA vaccine carried by attenuated *Shigella*. *Vaccine*, **21**, 644–648 (2003)
91. Zhang Z.H., Jiang P.H., Li N.J., Shi M., Huang W.: Oral vaccination of mice against rodent malaria with recombinant *Lactococcus lactis* expressing MSP-1(19). *World J. Gastroenterol.* **11**, 6975–6980 (2005)
92. Zheng J.P., Zhang Z.S., Li S.Q., Liu X.X., Yuan S.L., Wang P., Zhan D.W., Wang L.C., Huang C.F.: Construction of a novel *Shigella* live-vector strain co-expressing CS3 and LTb/STm of enterotoxigenic *E. coli*. *World J. Gastroenterol.* **11**, 3411–3418 (2005)
93. Zhu J., Yamane H., Paul W.E.: Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–489 (2010)