

## STRESZCZENIE

Większość patogenów wnika do organizmu poprzez powierzchnie błon śluzowych człowieka np. nosa czy jelit. Odpowiedź immunologiczna błony śluzowej pełni istotną rolę w skutecznym usunięciu zasiedlających patogenów. Niestety, większość szczepionek, które są podawane głównie domięśniowo nie indukuje odpowiedniej ochronnej odpowiedzi immunologicznej na błonach śluzowych. Przykładowo, po iniekcji domięśniowej poziom wydzielniczych przeciwciał klasy IgA jest niski i często niewystarczający aby skutecznie zneutralizować patogen. Natomiast odporność wzbudzana na błonie śluzowej wywołuje długotrwały efekt w postaci lokalnej oraz ogólnoustrojowej odpowiedzi na patogen. Co więcej, podanie szczepionki dośluzówkowo nie generuje szkodliwych odpadów medycznych a ich zastosowanie nie wymaga obecności wykwalifikowanego personelu medycznego. Trwają intensywne badania nad szczepionkami podawanymi drogą dośluzówkową. Trudnością w rozwoju szczepionek śluzówkowych są naturalne mechanizmy obronne śluzówki, których przewyciężenie wymaga zastosowania wyspecjalizowanych adiuwantów. Obecnie na rynku brak jest takich formułacji.

## IMMUNOLOGIA ŚLUZÓWKI

Błona śluzowa (śluzówka) to wyściółka przewodu pokarmowego, oddechowego, moczowo-płciowego oraz rogówki oka, która ochrania organizm przed patogenami. Jednocześnie, umożliwia bytowanie mikroorganizmów tworzących naturalną mikroflorę człowieka. Śluzówka składa się z dwóch warstw: nabłonka i znajdującej się pod nim tkanki łącznej, zwanej też blaszką właściwą, zawierającą naczynia krwionośne, limfatyczne, nerwy, gruczoły i mięśnie gładkie. Śluzówka to pierwsze miejsce kontaktu z czynnikami zewnętrznymi, takimi jak: alergeny, pożywienie i różnego rodzaju drobnoustroje. Śluzówka uczestniczy w rozpoznaniu czynników zewnętrznych kontaktujących się z błoną śluzową – wskazuje, które z nich są potencjalnie niebezpieczne, a które nieszkodliwe. Poznanie mechanizmów utrzymujących homeostazę ma kluczowe znaczenie w procesie projektowania szczepionki dośluzówkowej.

U zdrowego człowieka śluzówka zawiera 80% wszystkich komórek układu odpornościowego, a komórek produkujących przeciwciała jest tu więcej niż we wszystkich pozostałych organach biorących udział w odpowiedzi immunologicznej [1]. Jest to bardzo złożony system, a jego funkcja zależy od odpowiedniej aktywacji limfocytów wchodzących w skład tkanki limfatycznej powiązanej z błonami śluzowymi MALT (ang. *Mucosal-Associated Lymphoid Tissue*). MALT, ze względu na lokalizację i pełnione zadania, dzieli się na tkankę limfatyczną powiązaną z błonami śluzowymi nosa i płuc NALT (ang. *Nasal-Associated Lymphoid Tissue*), układu pokarmowego GALT (ang. *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) i układu moczowo-płciowego. Każda z tych tkanek jest unikalna i działa niezależnie od pozostałych. Każda z nich jest również związana z systemowym układem limfatycznym, przez co odpowiedź odpornościowa indukowana na śluzówce może wywoływać odpowiedź odpornościową całego organizmu. Co istotne, indukcja odpowiedzi odpornościowej w NALT może wpływać na odpowiedź w GALT. Fenomen ten nazywany jest wspólnym układem odpornościowym błon śluzowych [2].

Organizm dysponuje szeregiem mechanizmów broniących śluzówkę przed patogenami (Ryc. 1). Szczepionka dośluzówkowa, aby była efektywna, musi przedostać się przez te same „linie obrony” gospodarza co patogen. Do wrodzonych mechanizmów obronnych zalicza się nabłonek, działający jako fizyczna bariera chroniąca przed dostępem do wnętrza organizmu i pokrywające go wydzieliny gruczołów, bogate w mucynę oraz białka o działaniu przeciwbakteryjnym. Komórki Gobleta (komórki kubkowe) znajdujące się w nabłonkach produkują bardzo duże ilości glikoproteiny, która tworzy grubą, naładowaną elektrostatycznie warstwę śluzu. Śluz i silne połączenia międzykomórkowe łączące ko-

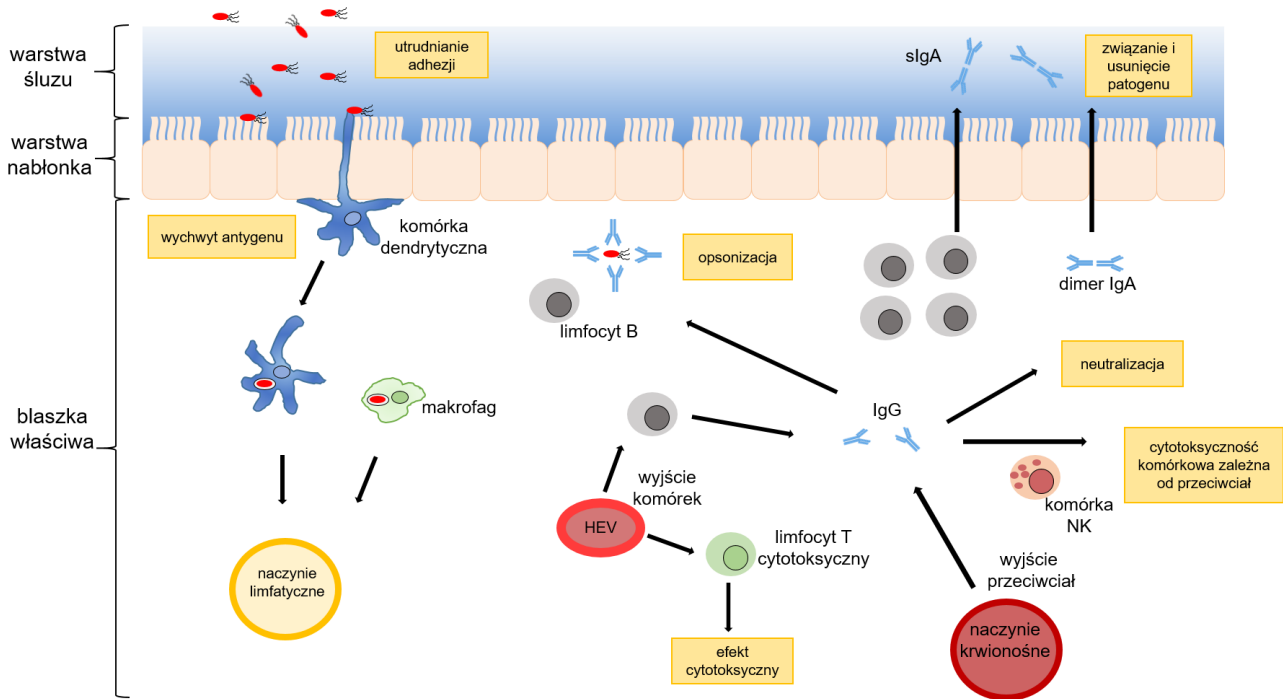
Dr Agnieszka Razim<sup>1</sup>✉,  
dr inż. Sabina Górska<sup>1</sup>,  
prof. dr hab. Andrzej Myc<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, Wrocław  
<sup>2</sup>Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN, Wrocław  
<sup>3</sup>MNIMBS, Department of Internal Medicine, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_439](https://doi.org/10.18388/pb.2021_439)

✉autor korespondujący: agnieszka.razim@hirszfeld.pl

Słowa kluczowe: śluzówka, szczepienie donosowe, adiuwant, antygen



**Rycina 1.** Mechanizmy obronne śluzówki. Czerwone owale reprezentują patogeny. Użyte skróty: HEV – żyłki o wysokim śródbłonku, NK – naturalni zabójcy (ang. natural killers), slgA – wydzielnicze przeciwciała klasy A, IgG – przeciwciała klasy G.

mórki nabłonka są głównymi barierami broniącymi przed dostępem patogenów do wnętrza organizmu. Antygeny, które dostają się do organizmu, na przykład wziewnie, zostają zawieszane w śluzie, a następnie są usuwane z jamy nosowej poprzez ruchy urzęsionych komórek nabłonka nosa przesuujących śluz w stronę układu pokarmowego. Ciągły transport śluzu i zawieszonych w nim patogenów zapobiega ich przywieraniu do komórek nabłonka oraz skraca czas przebywania antygeny na śluzówce. W śluzie zawieszane są enzymy trawienne, takie jak: hydrolazy (proteazy, lipazy, nukleazy), laktoferyna i peroksydazy, które szybko doprowadzają do zniszczenia wnikaających antygenów. Dodatkowo, w obrębie błon śluzowych jelita cienkiego występują komórki Panetha, które produkują lizozym, fosfolipazę A2 typu II i  $\alpha$ -defensyny [3]. W śluzie znajdują się również komórki układu odpornościowego, aktywnie zwalczające drobnoustroje, takie jak: monocyty, makrofagi, neutrofile i eozynofile. Te komórki, dzięki receptorom Fc obecnym na ich powierzchni, rozpoznają „naznaczone” w wyniku opsonizacji cząsteczki do zniszczenia. Dodatkowo, uwalniają duże ilości cytokin działających jak sygnały alarmowe, które powodują napływ innych komórek układu odpornościowego. Wprowadzane do organizmu szczepionki również powinny pobudzać te komórki do działania przez indukcję sygnałów niebezpieczeństwa (ang. *danger signals*). Komórki nabłonka rozpoznają niebezpieczne składniki mikroorganizmów poprzez receptory rozpoznające wzorce, np. przez błonowe receptory *toll*-podobne (TLR, ang. *toll-like receptor*). Receptory *toll*-podobne w odpowiedzi na elementy patogenu wysyłają sygnały w postaci chemokin i cytokin do niżej położonych komórek śluzówkowego układu odpornościowego, takich jak komórki dendrytyczne czy makrofagi celem uruchomienia dalszej odpowiedzi nieswoistej oraz zainicjowania odpowiedzi swoistej [4].

Indukcja odpowiedzi śluzówkowej przeciwko obcym antygenom, zachodzi w obecności zorganizowanej tkanki limfatycznej w śluzówce lub w węzłach chłonnych, w miejscach najbardziej prawdopodobnego kontaktu z patogenem (migdałki podniebienne, migdałki językowe) oraz w miejscach nagromadzenia bakterii (dolna część układu pokarmowego). U ludzi zorganizowane grudki limfatyczne tworzą kępki Peyera, które zlokalizowane są w błonie śluzowej i podśluzowej jelita krętego oraz liczne samodzielne grudki chłonne w jelicie i odbycie. Nad miejscami, w których zlokalizowane są te struktury, tkanka nabłonkowa tworzy wyspecjalizowaną strukturę zwaną nabłonkiem towarzyszącym grudkom, w którym znajdują się komórki M [5]. Komórki M charakteryzuje wysoka zdolność do endocytozy i transportu przez błonę nienaruszonych antygenów. Komórki M tworzą kieszonki, do których migrują limfocyty B i T oraz czasami komórki dendrytyczne. W tych kieszonkach dochodzi do przekazania antygeny limfocytom i komórkom dendrytycznym, a następnie jego dalsze przetwarzanie. Antygeny pobrane przez komórki M zostają przekazane niedojrzałym komórkom dendrytycznym, które następnie migrują do regionów kępki Peyera bogatych w niedojrzałe limfocyty T, gdzie w procesie dojrzewania ekspresji ulegają antygeny powierzchniowe, takie jak CD40 czy cząsteczki MHC [6]. Niektóre z nich wędrują do węzłów chłonnych, gdzie dochodzi do kontaktu z komórkami systemowego układu immunologicznego. Komórki dendrytyczne, które pobrały antygen mogą oddziaływać z limfocytami celem indukcji pamięci, immunologicznej lub tolerancji, mogą również opuścić śluzówkę przez naczynia limfatyczne i migrować, przykładowo do węzłów chłonnych, gdzie prezentują antygen naiwnym limfocytom T [7].

Pośrednikami swoistej śluzówkowej odpowiedzi immunologicznej są wydzielnicze przeciwciała typu A (slgA), któ-

**Tabela 1.** Porównanie dróg podania szczepionki.

Droga podania	Miejsce indukcji przeciwciał IgA	Indukcja limfocytów T cytotoksycznych	Odpowiedź systemowa	Uwagi	Ref.
Parenteralna	rzadko: gruczoł sutkowy, ślinianki, układ pokarmowy	tak	tak		[17]
Donosowa	ślinianki, górne i dolne drogi oddechowe, układ rozrodczy, jelito cienkie i grube	tak	tak	możliwe interakcje z układem nerwowym	[18,19]
Doustna	układ pokarmowy, ślinianki, gruczoły sutkowe	tak	tak	silny mechanizm tolerancji, degradujące środowisko	[20]
Podjęzykowa	górne i dolne drogi oddechowe, układ pokarmowy, układ rozrodczy	tak	tak		[21]
Przezsłonna	górne i dolne drogi oddechowe, słaba odpowiedź w układzie pokarmowym	tak	tak	konieczność zastosowania mikroigieł	[22]
Doodbytnicza	jelito grube, odbył, układ rozrodczy	tak	słaba		[22]
Dopochwowa	układ rozrodczy	brak danych	słaba	immunizacja zależna od fazy cyklu	[18, 22]

re zapobiegają kolonizacji śluzówki przez patogeny. Dzięki temu, uniemożliwiają dotarcie patogenów do głębszych warstw nabłonka i tym samym zatrzymują rozwój choroby [4]. sIgA, poprzez związanie patogenu, doprowadzają do jego „uwięzienia” w śluzie, zapobiegając bezpośredniemu kontaktowi z nabłonkiem. Następnie, specyficzne przeciwciała sIgA blokują receptory powierzchniowe patogenów, uniemożliwiając im wiązanie się do nabłonka. sIgA, które znajdują się pod powierzchnią nabłonka, mogą transportować opłaszczony patogen do światła jelita lub doprowadzać do śmierci już zakażonych komórek [8]. Oprócz przeciwciał klasy IgA również przeciwciała klasy IgG mogą być produkowane lokalnie, na śluzówce, po pojawieniu się antygeny [4].

W odpowiedzi immunologicznej śluzówki istotną rolę odgrywa odpowiedź komórkowa. Odpowiedź wrodzona oraz działanie wydzielniczych IgA bardzo dobrze się uzupełniają. Przykładowo, cytotoksyczne limfocyty T rozpoznają peptydy np. białek rdzeniowych wirusów grypy. Białka te zwykle są wytwarzane i prezentowane znacznie wcześniej niż białka rozpoznawane przez przeciwciała neutralizujące, takie jak hemaglutynina czy neuraminidaza. Zatem odpowiedź komórkowa następuje znacznie wcześniej niż indukcja przeciwciał i tworzy jedną z pierwszych linii obrony. Komórki cytotoksyczne mogą być klasyfikowane na te działające niespecyficznie i specyficznie względem antygeny. Do pierwszej grupy należą komórki NK, które działają na bardzo wczesnym etapie zakażenia (dzień 1-3). Komórki drugiej grupy zaczynają działać później (dzień 3-5) [9]. Komórki obu grup reagują na patogen poprzez produkcję cytokin, takich jak IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i chemokin, takich jak Rantes, MIP-1 $\alpha$  i MIP-1 $\beta$  [10]. Następnie komórki cytotoksyczne rozpoznają i niszczą zainfekowane komórki, przez co zapobiegają namnażaniu się wirusów.

Poza mechanizmami obronnymi opisanymi powyżej, istnieją również mechanizmy tolerancji śluzówkowej, które

istotnie wpływają na efektywność szczepionki. W przypadku naturalnej mikroflory, na przykład w jelicie, komórki nabłonkowe wraz z obecnymi pomiędzy nimi i pod nimi komórkami fagocytującymi mogą modulować i tłumić sygnały pochodzące od własnej mikrobioty. Procesy tolerancji śluzówkowej przeciwdziałają nadreaktywności systemu względem nieszkodliwych antygenów. To, czy dany antygen wywoła odpowiedź immunologiczną czy tolerancję zależy w głównej mierze od dawki i czasu trwania jego kontaktu ze śluzówką. Tolerancja może zostać wywołana na dwa sposoby – przy długotrwałym kontakcie antygeny podanego w niskich dawkach lub w przypadku podania wysokiej jednorazowej dawki antygeny, która doprowadza do swoistego przytłoczenia układu immunologicznego [11].

W układzie oddechowym, w przypadku wysokich dawek antygeny, dochodzi do indukcji tolerancji na drodze anergii [12], a gdy podawane są niskie dawki rozpuszczalnych antygenów, wtedy tolerancja jest wynikiem polaryzacji immunologicznej, czyli różnicowania limfocytów w stronę limfocytów Th1 [13]. Do anergii dochodzi w momencie, gdy limfocyty T rozpoznały antygen, ale nie otrzymały dodatkowego sygnału stymulującego. Te limfocyty, w odpowiedzi na antygen, nie namnażają się i nie produkują IL-2. Delecja klonalna prowadzi do apoptozy specyficznych względem antygeny limfocytów Th1 i Th2. Mechanizm, w którym biorą udział limfocyty T-regulatorowe, polega na blokowaniu przez nie proliferacji populacji limfocytów specyficznych względem antygeny [14]. Z powyższego opisu wynika, że odpowiedni dobór dawki antygeny jest kluczowy w procesie projektowania szczepionki dośluzówkowej.

Wprowadzona do organizmu szczepionka musi sprostać zarówno aparatom obronnym śluzówki jak i wzbudzać dostatecznie silną odpowiedź bez jednoczesnej indukcji tolerancji. W zależności od wybranej drogi podania szczepionki, repertuar tych mechanizmów jest inny i musi być brany pod uwagę w procesie projektowania szczepionki.



Co więcej, droga podania oraz typ zastosowanego nośnika również wpływają na efektywność i rodzaj wzbudzonej odpowiedzi.

## DROGI PODANIA SZCZEPIONEK I ICH SKŁADNIKI

Szczepionka jest to preparat biologiczny, którego stosowanie ma na celu wzbudzenie odporności względem specyficznego mikroorganizmu. Dostępne na rynku szczepionki dzieli się na cztery grupy: szczepionki atenuowane, czyli oparte na żywych, ale osłabionych mikroorganizmach; szczepionki oparte na zabitych mikroorganizmach; szczepionki podjednostkowe, czyli złożone z wyizolowanych z patogenów i oczyszczonych antygenów; oraz szczepionki, w których znajdują się toksyny produkowane przez mikroorganizmy. Obecnie odchodzi się od zastosowania w szczepionkach całych organizmów, ze względu na możliwość wywołania choroby u szczepionego pacjenta. Dodatkowo, szczepionki podjednostkowe mają wiele zalet m. in. obniżenie prawdopodobieństwa wystąpienia działań niepożądanych i możliwość stosowania preparatu o ściśle określonym składzie [15]. W nowoczesnych szczepionkach skojarzonych znajdują się składniki należące do wszystkich powyższych grup. Szczepionki mogą być stosowane w postaci zastrzyku lub dośluzówkowo czyli na przykład doustnie, donosowo, dopochwowo itd. (Tabela 1) [16].

Szczepionki podawane drogą parenteralną są zwykle słabymi induktorami odpowiedzi odpornościowej na śluzówce. Przewagą tych szczepionek jest dokładnie określona ilość podanego antygeny i łatwość oszacowania odpowiedzi organizmu na szczepienie poprzez zbadanie poziomu specyficznych przeciwciał krążących w krwi pacjenta. W przypadku szczepionek przeznaczonych do podania dośluzówkowego, jest to znacznie utrudnione. Niewiele tego typu szczepionek zostało dopuszczonych do zastosowania u ludzi. Niemniej jednak, szczepionki śluzówkowe mają bardzo duży potencjał praktyczny wynikający z ułatwionego podania i produkcji, braku pozostałości po szczepieniu groźnych odpadów medycznych oraz mniejszych obostrzeń prawnych przy wprowadzaniu na rynek. Dodatkowo, takie szczepionki mogą zostać podane przez osobę bez przeszkolenia medycznego, co może ułatwić, np. walkę z pandemią grypy, masowe szczepienia w krajach najuboższych lub też immunizację w wypadku biologicznego ataku terrorystycznego.

Idealna szczepionka powodowałaby, że podanie jedną drogą indukowałoby zarówno odpowiedź komórkową jak i humoralną i to nie tylko na śluzówce, ale w całym organizmie. Pod tym kątem podanie donosowe i podjęzykowe zdają się być najbardziej obiecujące (Tabela 1).

Szczepionki wyzwalające zarówno odpowiedź śluzówkową jak i systemową to te podawane doustnie, donosowo, podjęzykowo i przezskórnym. Szczepionki doustne stanowią największe wyzwanie dla ich twórców, ze względu na działanie enzymów trawiennych. Co więcej, takie szczepionki muszą przedostać się przez barierę śluzówki w odpowiednio dużym stężeniu, celem wywołania odpowiedzi immunologicznej bez jednoczesnego wzbudzenia mechanizmu tolerancji. Dostępne jest bogate piśmiennictwo na temat

szczepionek testowanych doustnie u zwierząt, jednak wyniki badań klinicznych rozczarowują. Co prawda istnieją efektywne szczepionki doustne, takie jak te przeciwko rotawirusom lub cholercie, ale nadal brakuje wiedzy na temat tego, dlaczego jedne szczepionki doustne działają, a inne nie. Niestety, szczepionki doustne mogą mieć słabsze działanie u osób z krajów rozwijających się ze względu na ich niedożywienie, zaburzoną mikroflorę jelitową i schorzenia towarzyszące [23].

Odpowiedź immunologiczna przy podaniu podjęzykowym szczepionki jest podobna do tej w przypadku podania donosowego. Takie szczepienie rozpuszczalnymi, jak i cząsteczkowymi antygenami, indukuje odpowiedź humoralną w postaci śluzówkowych IgA i systemowych IgG oraz cytotoksycznych limfocytów T [21]. Immunizacja podjęzykowa przeciwko wirusowi brodawczaka i *Chlamydia muridarum* zapobiegała infekcji tymi patogenami. Ten sam sposób podania był również efektywny w przypadku immunizacji przeciwko *Helicobacter pylori* czy *Vibrio cholerae*. Warto podkreślić, że w tym przypadku, dawka antygeny jest mniejsza niż przy podaniu doustnym [24]. Obecnie trwają badania kliniczne nad szczepionkami podawanymi podjęzykowo.

Podanie przezskórne szczepionki prowadzi do wytworzenia silnej odpowiedzi immunologicznej w górnych i dolnych drogach oddechowych, słabej w układzie pokarmowym czy układzie systemowym [22]. Dużym utrudnieniem w szczepieniu przezskórnym jest konieczność zastosowania wyrafinowanych systemów aplikacji, które umożliwiłyby penetrację wierzchnich, martwych warstw naskórka. Do takich systemów należą mikroigły, zastosowanie sonoforezy, czy jonoforezy. Wszystkie powyższe znacznie zwiększają koszty szczepienia oraz utrudniają sam proces aplikacji szczepionki.

Podanie donosowe indukuje odpowiedź immunologiczną w NALT, śluzówce układu pokarmowego, układzie oddechowym i rozrodczym, a także odpowiedź systemową [25]. Szczepionka przeciwko grypie (FluMist, MedImmune), zawierająca atenuowanego wirusa, podawana donosowo okazała się bardzo efektywna [26]. Podobnie zakończyły się próby podania donosowego szczepionki przeciwko *Shigella flexneri*, patogenu atakującego układ pokarmowy [27]. Donosowo stosuje się mniejsze porcje antygeny i adiuwantu w porównaniu do na przykład podania doustnego.

Szczepionki podane dośluzówkowo natrafiają na te same mechanizmy obronne, co atakujące organizm patogeny, czyli: zostają rozcieńczone i unieruchomione w śluzie, są atakowane przez proteazy i nukleazy, zostają oddzielone od wnętrza organizmu szczelną barierą nabłonka. Ze względu na powyższe, potrzeba dużej dawki szczepionki, aby immunizacja była efektywna. Co więcej, niemożliwym jest określenie jak duża jej część trafia do komórek układu odpornościowego. Rozpuszczalne, nieadherentne antygeny są pobierane w bardzo małym stopniu i często wzbudzają tolerancję zamiast odpowiedzi [28]. Opisane utrudnienia mogą zostać przezwyciężone dzięki zastosowaniu odpowiednich adiuwantów. Najlepiej takich, które wiązałyby się do powierzchni śluzówki, a najlepiej do komórek M, sty-

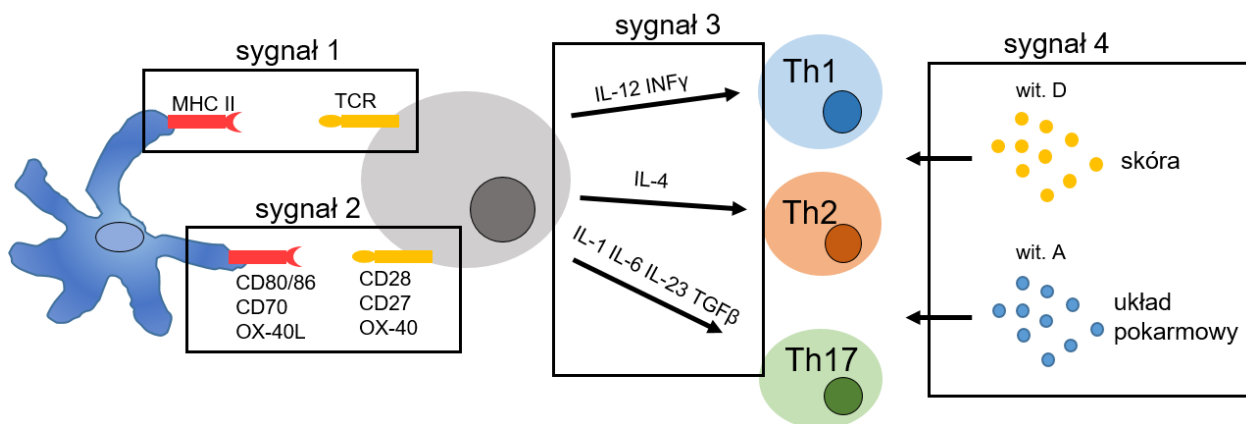
mulowały mechanizmy wrodzonej odporności i wzbudzały odpowiedź nabytą, specyficzną względem patogenu.

Adiuwant to składnik szczepionki, który wzmacnia odpowiedź humoralną i komórkową organizmu na antygen. Ma szczególne znaczenie w przypadku szczepionek podjednostkowych, gdyż te same w sobie nie są wystarczająco immunogenne. Adiuwant powinien być stabilny aż do momentu jego zastosowania, a jednocześnie ulegający szybkiej biodegradacji w organizmie po zakończeniu procesu indukcji odpowiedzi immunologicznej na antygen. Ponadto, powinien być obojętny immunologicznie, tani w produkcji, a w połączeniu z antygenem powinien indukować odpowiedni rodzaj odpowiedzi odpornościowej. Wyróżniamy co najmniej kilka opisanych mechanizmów działania adiuwantów. Adiuwant może działać poprzez: tzw. efekt *dépôt*, czyli akumulację antygeny w miejscu podania i jego powolne uwalnianie; ułatwianie transportu antygeny i jego prezentacji komórkom immunokompetentnym; umożliwianie, w połączeniu z antygenem, aktywację/modulację odpowiedzi immunologicznej i indukcję limfocytów T-cytotoksycznych [29].

W ciągu ostatniego stulecia zaproponowano wiele adiuwantów, ale tylko nieliczne zostały przetestowane w badaniach klinicznych. Z tego tylko pięć adiuwantów zostało dopuszczonych do użycia u człowieka przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków, a są to: związki glinu, AS03, MF59<sup>TM</sup>, wirosomy i AS04 [30]. Wszystkie z nich służą do podania parenteralnego. Związki glinu są najpowszechniej używanymi adiuwantami w szczepionkach przeznaczonych do stosowania u ludzi. AS04, MF59<sup>TM</sup> i wirosomy są stosowane w szczepionkach przeciwko grypie. AS04 znajduje się w szczepionkach przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B oraz przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego [31]. Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za powstanie odpowiedzi odpornościowej w rejonie immunizacji pozwala na zaprojektowanie odpowiedniego adiuwantu dla konkretnego rodzaju szczepionki.

Komórki dendrytyczne są wyspecjalizowane w prezentacji antygeny, regulują siłę i rodzaj odpowiedzi oraz pamięć immunologiczną. Komórki dendrytyczne rozpoznają obce antygeny, tworzą z nich krótkie peptydy, które prezentują za pomocą cząsteczek MHC receptorom limfocytów T. Na-

stępnie, przy udziale dodatkowych cząsteczek kostymulujących, aktywują naiwne limfocyty T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>. Komórki CD4<sup>+</sup> wspomagają limfocyty B w produkcji określonej klasy przeciwciał i powstanie długo żyjących komórek plazmatycznych produkujących specyficzne względem antygeny przeciwciała [32]. Komórki dendrytyczne mogą zostać aktywowane przez patogeny na dwa sposoby. Po pierwsze, komórki dendrytyczne mogą rozpoznawać intruza za pomocą receptorów rozpoznających wzorce patogenów, takie jak endotoksyny, czy peptydoglikan poprzez receptory TLR. Po drugie, może się to odbywać pośrednio poprzez kontakt z wzorcami molekularnymi związanymi z uszkodzeniem tkanek przez atakujące patogeny, takie jak: kwas moczowy, adenozyno-5-trifosforan lub białkami związanymi z chromatyną [33]. Następnie, komórki dendrytyczne aktywują komórki T poprzez dostarczenie im maksymalnie czterech sygnałów aktywacji (Ryc. 2). Co najmniej dwa sygnały są niezbędne do aktywacji naiwnych limfocytów T i komórek pamięci. Pierwszy z nich jest wynikiem oddziaływania receptora TCR na powierzchni limfocytów T z cząsteczką MHC z komórki dendrytycznej, na której znajduje się peptyd pochodzący od antygeny, np. białka patogenu. W ten sposób limfocyt T jest pobudzany, ale do jego pełnej aktywacji brakuje sygnału drugiego, czyli kontaktu dodatkowych receptorów z limfocytu T (np. CD28, OX-40, CD27) z receptorami na powierzchni komórki dendrytycznej (np. CD80, CD86, OX-40L, CD70). W wyniku tych oddziaływań dochodzi do namnażania aktywowanych limfocytów T CD4<sup>+</sup> oraz CD8<sup>+</sup> [34]. Zadziałanie jedynie sygnału pierwszego, bez dodatkowej stymulacji, prowadzi do powstania wcześniej wspomnianej tolerancji. Po zadziałaniu dwóch sygnałów, limfocyty T CD4<sup>+</sup> są aktywowane, ale nadal nie mają określonej polaryzacji, więc opisuje się je jako CD4<sup>+</sup> Th0. Do ich polaryzacji niezbędny jest sygnał trzeci otrzymany od dojrzałych komórek dendrytycznych (dodatkowo stymulowanych przez eozynofile i komórki tuczne) poprzez cytokiny i inne cząsteczki obecne na powierzchni tych komórek [35]. Efektem tego jest polaryzacja komórek Th0 w stronę komórek efektorowych typu Th1, Th2, Th9, Th17 lub Th22, których działanie jest specyficzne względem konkretnych antygenów. Sygnał trzeci jest również niezbędny do powstania komórek cytotoksycznych CD8<sup>+</sup> [36]. Efektorowe komórki T potrzebują jeszcze sygnału czwartego, który pokieruje je do miejsca, w którym mają zadziałać. Takim sygnałem są produkowane przez komórki dendry-



Rycina 2. Sygnały aktywacji limfocytów T.

Tabela 2. Charakterystyka badanych adiuwantów słuźówkowych.

Adiuwant	Droga podania	Mechanizm działania	Rodzaj indukowanych przeciwciał*	Polaryzacja limfocytów	Produkcja cytokin i chemokin	Ref.
Inaktywowana enterotoksyna	doustna, donosowa, dopochwowa, doodbytnicza	wpływ na prezentację antygeny	IgG1, IgG2, IgA	Th1/Th2, CD8 <sup>+</sup>	IL-6, IL-8, IL-10, IL1-( $\alpha$ , $\beta$ )	[47,48]
Toksyna cholery	doustna, donosowa, dopochwowa, doodbytnicza	wpływ na prezentację antygeny	IgA, IgG1, IgE	Th2, CD8 <sup>+</sup>	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10	[47,48]
MPL	doustna, donosowa, dopochwowa, doodbytnicza	TLR4	IgG2 w surowicy, IgA	Th1/Th17	IL-1, IL-17, IFN- $\gamma$	[49]
CpG	doustna, donosowa, dopochwowa, doodbytnicza	TLR9	IgG2a, IgA	Th1/Th2, CD8 <sup>+</sup>	IL-6, IL-12, IL-8, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$	[47, 50]
Protollina (LPS)	Donosowa	TLR2, TLR4	IgA, IgG w surowicy	Th1/Th2	IFN- $\gamma$ , MIP-3 $\alpha$ , IL-18	[51]
Flagellina	Donosowa	TLR5, NLR4	IgA, IgG	Th1/Th2	TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MIP-2, IL-6	[49,52]
QS-21	doustna, donosowa	mechanizm niezny	IgG2a, IgG2b, IgG1, IgE	Th1, CD8 <sup>+</sup>	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10	[49,53]
Chitosan	doustna, donosowa	oddziaływanie elektrostacyjne	IgG, IgA w surowicy	odpowieź limfocytów zależna od antygeny	IL-1 $\beta$ , IL-18	[50]
PLGA	doustna, donosowa, dopochwowa	mechanizm niezny	klasa przeciwciała zależna od antygeny	odpowieź limfocytów zależna od antygeny	zależne od immunostymulatora	[54]
Nanoemulsja	doustna, donosowa	mechanizm niezny	klasa przeciwciała zależna od antygeny	Th1/Th2	zależne od immunostymulatora	[55]
Liposomy	doustna, donosowa	mechanizm zależny od miejsca aplikacji	IgA, IgG	odpowieź limfocytów zależna od antygeny	IL-2	[56]
ISCOM	doustna, donosowa, dopochwowa	kierowanie i prezentacja	IgG1, IgG2a	Th1/Th2, CD8 <sup>+</sup>	nie określono	[49]
Cząsteczki wiruso-podobne	doustna, donosowa, dopochwowa	wiele mechanizmów	IgA, IgG w surowicy	Th1/Th2	nie określono	[49,50]

\*O ile nie zaznaczono inaczej, kolumna pt. „rodzaj produkowanych przeciwciał” określa przeciwciała oznaczane na słuźówce.

tyczne witaminy, jak A i D. W odpowiedzi na te witaminy, limfocyty T efektorowe, włączają ekspresję receptorów dla cytokin chemotaktycznych CCR9 i CCR10 [37]. Pojawienie się tych związków w środowisku kieruje limfocyty T efektorowe w stronę jelit lub skóry.

Pomimo braku jednoznacznych dowodów uważa się, że do grupy adiuwantów wzmacniających sygnał 1 należą emulsje typu woda w oleju, mikroemulsje typu olej w wodzie, alum, sole wapnia, liposomy oraz szeroka grupa polimerów. Związki te wydłużają okres przebywania antygeny w miejscu podania, przez co przedłużają czas jego prezentacji. Sygnał 1 będą również wzmacniać adiuwanty, które zwiększają rekrutację komórek prezentujących antygen i promują prezentację, przetwarzanie i kierowanie antygeny do komórek prezentujących antygen. Induktorami sygnału drugiego będą z kolei związki, które stymulują re-

ceptory rozpoznające wzorce patogenów. Przykładowo są to lipoproteiny stymulujące receptory TLR2, LPS (lipopolisacharyd) i MPL (monofosforylowany lipid A), które są rozpoznawane przez receptor TLR4, czy flagellina działająca poprzez receptor TLR5 [38]. Do grupy adiuwantów wzmacniających sygnał trzeci należą związki immunomodulujące, takie jak alum, chitosan oraz biodegradowalne mikro- i nanocząstki [39]. Dotychczas nie opisano adiuwantu, który by efektywnie wspomagał sygnał czwarty.

Część z powyżej wymienionych to adiuwanty do słuźówkowe. Obecnie badane i stosowane adiuwanty do słuźówkowe zostały zebrane w Tabeli 2. Toksyna *E. coli* oraz toksyna cholery są adiuwantami do słuźówkowymi o najsilniejszym działaniu, ale są zbyt toksyczne, żeby je zastosować u ludzi. Z uwagi na powyższe, zaprojektowano zmodyfikowane toksyny ze zmniejszoną aktywnością enzymatyczną. Ich



połączenie z odpowiednimi antygenami działało ochronnie w eksperymentach, w których zwierzęta zakażano wirusem opryszczki pospolitej [40] i *Streptococcus pneumoniae* [41]. Mutanty toksyny *E. coli* zostały również użyte w formie adiuwantu w połączeniu z antygenem szczepionkowym HIV-1 p55 gag, formulację podano doustnie i donosowo myszom [42]. W powyższych przykładach właściwości ochronne wynikały z silnej indukcji cytotoksycznych limfocytów T. Prawdopodobny mechanizm działania polega na zwiększaniu przepuszczalności nabłonka, ułatwionym poborze antygeny przez komórki układu immunologicznego i ich ulepszonej prezentacji. Podanie doustne zmutowanych toksyn ułatwia dotarcie antygenów do komórek M [43].

Jedną z większych grup adiuwantów dośluzówkowych są agoniści receptorów TLR. Są one oparte o wzorce molekularne patogenów i często łączone z emulsjami. Przykładowo, adiuwant IC31 i inne formulacje zawierające CpG, które działają na receptor TLR9 okazały się efektywne w badaniach nad zwierzętami i badaniach klinicznych [44]. MPL, działający na receptor TLR4 i flagellina, która jest ligandem receptora TLR5 wykazywały pośrednią efektywność [45]. Liposomy dodatnio naładowane i pochodna saponiny QS21 są efektywne w immunizacji śluzówkowej, ale mechanizm ich działania jest bardzo słabo poznany [46].

Stworzenie uniwersalnego adiuwantu jest niezwykle trudne, a wręcz niemożliwe, ze względu na dużą zmienność genetyczną i epigenetyczną u ludzi. Co oznacza, że adiuwant, który u większości osób nie wywołuje żadnych skutków ubocznych, może być szkodliwy u pojedynczych pacjentów. Co więcej, działanie adiuwantu może być ograniczone jedynie do określonych antygenów.

Oprócz antygeny i adiuwantu w skład szczepionki wchodzi: konserwanty, stabilizatory oraz śladowe ilości związków pozostałych po procesie produkcji, takie jak: antybiotyki, formaldehyd, białka drożdży i jaja kurzego. Składniki te pojawiają się zarówno w szczepionkach parenteralnych jak i dośluzówkowych.

To, co odróżnia pod kątem składu szczepionki dośluzówkowe od parenteralnych, to obecność dodatkowych składników, jak na przykład nośniki polimerowe. Dodatki te mają wydłużać czas przebywania antygeny, przykładowo w jamie nosowej i dzięki temu zwiększać jego szanse na dotarcie do komórek immunokompetentnych. Działanie większości z nich polega na wykazywaniu mukoadhezji (bioadhezji). Przykładami takich dodatków pochodzenia biologicznego są mikrokapsuły zbudowane z alginianu, żelatyny czy skrobi. Bada się również w tym zakresie, biodegradowalne polimery pochodzenia chemicznego, takie jak: polimetakrylan, karbopol, polikaprolakton, czy polimetakrylan metylu. Przykłady powyższych polimerów zostaną opisane w kolejnym rozdziale.

## SZCZEPIONKI DONOSOWE

Jama nosowa jest dogodnym miejscem podania antygeny ze względu na to, że jest łatwo dostępna, a wyściełająca ją śluzówka cienka, dobrze ukrwiona i bogata w komórki dendrytyczne. Komórki nabłonka posiadają mikrokosmki, które

znacznie powiększają powierzchnię chłonną nabłonka jamy nosowej, a wprowadzane substancje trafiają bezpośrednio do układu krążenia. Dodatkowo, aktywność enzymatyczna w jamie nosowej jest stosunkowo słaba, w wyniku czego antygen nie ulega szybkiej degradacji. Jama nosowa jest pierwszym miejscem kontaktu z patogenami, takimi jak wirusy grypy czy inne mikroorganizmy powodujące choroby górnych dróg oddechowych, patogeny powodujące zapalenie opon mózgowych, odrę czy krztusiec. Obecność neutralizujących przeciwciał i odporność komórkowa w miejscu kontaktu organizmu z tymi patogenami pozwoli zapobiec rozwojowi powodowanych przez nie chorób. Co istotne, funkcjonowanie układu immunologicznego śluzówki nosa nie pogarsza się z wiekiem, jak w przypadku systemowego układu immunologicznego, przez co możliwa jest immunizacja osób starszych [57]. Małe, rozpuszczalne antygeny mogą przechodzić bezpośrednio przez nabłonek i oddziaływać z komórkami układu immunologicznego znajdującymi się w głębszych warstwach śluzówki. Natomiast antygen w postaci cząsteczkowej jest pobierany przez komórki M oraz przekazywany do szyjnych węzłów chłonnych. Tak pobrany antygen może wzbudzić odpowiedź zarówno lokalnie, jak i w odległych rejonach śluzówki [4].

Pomimo dużej przepuszczalności nabłonka pewne związki z trudem przedostają się do głębszych warstw śluzówki. Oddziaływanie między antygenem a śluzówką zależy od wielu czynników, a w szczególności od fizycznych właściwości antygeny, jego dawki i długości kontaktu [4]. Duże i hydrofilowe cząsteczki, jak na przykład białka, są bardzo słabo transportowane przez śluzówkę. Dodatkowo, ciągły ruch rzęsek obecnych na komórkach nabłonka szybko usuwa podawane substancje zawieszony w gęstym śluzie, utrudniając ich kontakt z głębszymi warstwami śluzówki.

Antygen szczepionkowy pokonuje szereg barier, aby ostatecznie dotrzeć do komórek tworzących NALT. Przede wszystkim warstwę śluzu, która nieustannie usuwa antygen z jamy nosowej uniemożliwiając bezpośredni kontakt z komórkami dendrytycznymi. Śluz to mieszanina złożona w 90–95% z wody, 1–5% mucyny, 1–2% lipidów, 1% soli, 1% innych białek, takich jak albumina, immunoglobuliny, lizozym, laktoferyna [58]. Każdego dnia w jamie nosowej produkowane jest od 1,5 do 2,0 litrów śluzu. Śluz obecny na powierzchni nabłonka ochrania go, utrzymuje odpowiednią wilgotność w jamie nosowej, zapobiega utracie ciepła, wyłapuje cząstki, które dostały się do wnętrza nosa i transportuje je w stronę układu pokarmowego. Antygeny podjednostkowe, które nie wykazują powinowactwa do komórek nabłonka, są usuwane z jamy nosowej z prędkością 6 mm/min. [59]. Proces ten może zostać przyspieszony w przypadku schorzeń, takich jak astma, katar, alergia czy choroby zatok i może mieć wpływ na czas pobytu szczepionki w jamie nosowej.

Celem zapobiegania szybkiemu usuwaniu leku/antygeny z jamy nosowej, stosuje się dodatki w postaci związków wykazujących mukoadhezję, czyli mających powinowactwo do mucyny, białka występującego w dużej ilości w śluzie oraz na powierzchni komórek nabłonkowych jamy nosowej. Jeśli ten sam związek oddziałuje również z antygenem, wtedy możliwe jest opóźnienie usunięcia antygeny z jamy nosowej. Mucyna występuje w śluzie w dwóch for-

mach: wolnej i związanej z powierzchnią nabłonka. Związki wykazujące mukoadhezję można podzielić na trzy grupy, w zależności od ich właściwości fizykochemicznych. Pierwszą grupę tworzą polimery hydrofilowe, które oddziałują ze śluzówką poprzez tworzenie wiązań wodorowych i do tej grupy należą: alginian sodu, karboksymetyloceluloza, hydroksypropyloceluloza oraz karbopol. Do drugiej grupy należą polimery naładowane dodatnio, jak na przykład pochodne chitosanu zawierające dodatnio naładowane grupy chemiczne czy emulsje zawierające detergenty kationowe. Do trzeciej grupy należą związki zawierające wolne grupy tiolowe zdolne do tworzenia mostków dwusiarczkowych z cysteiną obecną w sekwencji aminokwasowej mucyny [60].

Kolejnym rozwiązaniem, mającym na celu ułatwienie dostarczenia antygeny do układu immunologicznego śluzówki jest stosowanie związków ułatwiających pobór antygeny przez komórki M. Jest to szczególnie istotne w przypadku zabitych patogenów oraz dużych cząsteczek, których przenoszenie przez warstwę nabłonka, na przykład poprzez poluzowane połączenia międzykomórkowe, jest utrudnione. Błona komórkowa komórek M jest ujemnie naładowana, a zatem związki o dodatnim ładunku powinny być lepiej pochłaniane. Nie jest to jednak oddziaływanie specyficzne. Do specyficznych ligandów celujących w komórki M należą lektyny, które rozpoznają galaktozo- $\alpha$ -(1-3)-galaktozę i kwasy sialowe [61] oraz integryny. Gullberg i inni wykazali, że zastosowanie lateksowych kulek pokrytych ligandem  $\beta_1$ -integryny znacznie zwiększało ich pobór przez komórki M w eksperymencie przeprowadzonym *in vitro* [62].

Nośniki oparte na lipidach, np. ISCOMS, ułatwiają dostarczenie antygeny do komórek dendrytycznych dzięki wpływaniu na właściwości błony komórkowej, oraz indukują odpowiedź limfocytów T cytotoksycznych. Podobnie jak i wirosomy (otoczka wirusa bez jego zawartości, ale z białkami błonowymi), które aktywują odpowiedź limfocytów T cytotoksycznych, odpowiedź humoralną i komórek Th [63].

Jednym z przykładów takich nośników dostosowanych do podania donosowego, a pełniących jednocześnie funkcję adiuwantów, są emulsje. Jednym z rodzajów emulsji są nanoemulsje typu olej w wodzie (O/W), składają się z oleju sojowego, CPC, Tween80®, etanolu i wody. Powstają w wyniku użycia emulsyfikatora o dużej mocy, a wielkość kropelek nanoemulsji jest mniejsza niż 1  $\mu$ m. Nanoemulsje promują pobór antygeny w testach *in vitro* i *in vivo* [64], podawane donosowo wzbudzają odpowiedź typu Th1 i Th17 [65], w połączeniu z antygenem wirusa zapalenia wątroby typu B indukują miano przeciwciał porównywalne do alumu [66]. Nanoadiuwanty, kolejny rodzaj emulsji, wykazują podobne właściwości jak nanoemulsje ale oparte są o czysty i dobrze scharakteryzowany olej silikonowy [67].

## PODSUMOWANIE

W dobie pandemii istnieje ogromna potrzeba szczepionek, które można by podawać łatwo, w dużych ilościach i krótkim czasie. Wydaje się, że szczepionki donosowe są w stanie sprostać tym wymaganiom, jednakże istnieje potrzeba dalszych badań nad ich poszczególnymi składnikami. W trakcie tych prac należy brać szczególnie pod uwagę natu-

ralne mechanizmy obronne śluzówki nosa, które mogą być zarówno barierami jak i potencjalnymi sprzymierzeńcami na drodze do opracowania idealnej szczepionki donosowej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Pommerville JC (2012) *Alcama's Fundamentals of Microbiology: Body systems edition*, Jones & Bartlett Publishers
2. Mestecky J (1987) The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* 7: 265-276
3. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ (2000) Secretion of microbicidal  $\alpha$ -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 1: 113-118
4. Mestecky J, Strober W, Russell MW, Kelsall BL, Cheroutre H, Lambrecht BN (2005) *Mucosal Immunology*, Elsevier
5. Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl J-P (2001) Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2: 1004-1009
6. Joffre O, Nolte MA, Spörri R, Sousa CR (2009) Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227: 234-247
7. MacPherson GG, Liu LM (1999) Dendritic Cells and Langerhans Cells in the Uptake of Mucosal Antigens, W: Kraehenbuhl J-P, Neutra MR (red) *Defense of Mucosal Surfaces: Pathogenesis, Immunity and Vaccines*. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, str. 33-53
8. van Egmond M, Damen CA, van Spriell AB, Vidarsson G, van Garderen E, van de Winkel JGJ (2001) IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol* 22: 205-211
9. van Ginkel F (2000) Vaccines for Mucosal Immunity to Combat Emerging Infectious Diseases. *Emerg Infect Dis* 6: 123-132
10. Fehniger TA, Herbein G, Yu H, Para MI, Bernstein ZP, O'Brien WA, et al. (1998) Natural Killer Cells from HIV-1+ Patients Produce C-C Chemokines and Inhibit HIV-1 Infection. *J Immunol* 161: 6433-6438
11. Woodrow KA, Bennett KM, Lo DD (2012) Mucosal Vaccine Design and Delivery. *Annu Rev Biomed Eng* 14: 17-46
12. Hoyne GF, O'Hehir RE, Wraith DC, Thomas WR, Lamb JR (1993) Inhibition of T cell and antibody responses to house dust mite allergen by inhalation of the dominant T cell epitope in naive and sensitized mice. *J Exp Med* 178: 1783-1788
13. McMenamin C, Holt PG (1993) The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8+ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4+ T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression of immunoglobulin E production. *J Exp Med* 178: 889-899
14. Kraal G, Wolvers DA (2001) Regulation of immunological mucosal tolerance. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 49 Suppl 1: S1-6
15. Jarzab A, Skowicka M, Witkowska D (2013) Szczepionki podjednostkowe - antygeny, nośniki, metody koniugacji i rola adiuwantów. *Postępy Hig Med Doswiadczalnej* 67: 1128-1143
16. <http://szczepienia.pzh.gov.pl/wszystko-o-szczepieniach/>
17. Clements JD, Freytag LC (2016) Parenteral Vaccination Can Be an Effective Means of Inducing Protective Mucosal Responses. *Clin Vaccine Immunol* 23: 438-441
18. Kozłowski PA, Williams SB, Lynch RM, Flanigan TP, Patterson RR, Cu-Uvin S, et al. (2002) Differential Induction of Mucosal and Systemic Antibody Responses in Women After Nasal, Rectal, or Vaginal Immunization: Influence of the Menstrual Cycle. *J Immunol* 169: 566-574
19. Rudin A, Riise GC, Holmgren J (1999) Antibody Responses in the Lower Respiratory Tract and Male Urogenital Tract in Humans after Nasal and Oral Vaccination with Cholera Toxin B Subunit. *Infect Immunol* 67: 2884-2890
20. Lycke N (2012) Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol* 12: 592-605



21. Domm W, Brooks L, Chung HL, Feng C, Bowers WJ, Watson G, et al. (2011) Robust antigen-specific humoral immune responses to sublingually delivered adenoviral vectors encoding HIV-1 Env: Association with mucoadhesion and efficient penetration of the sublingual barrier. *Vaccine* 29: 7080–7089
22. Czerkinsky C, Holmgren J (2012) Mucosal Delivery Routes for Optimal Immunization: Targeting Immunity to the Right Tissues, W: Kozlowski PA (red) *Mucosal Vaccines*, Springer, Berlin Heidelberg, str. 1–18
23. Pasetti MF, Simon JK, Sztejn MB, Levine MM (2011) Immunology of gut mucosal vaccines. *Immunol Rev* 239: 125–148
24. Czerkinsky C, Çuburu N, Kweon M-N, Anjuere F, Holmgren J (2011) Sublingual vaccination. *Hum Vaccin* 7: 110–114
25. Jabbal-Gill I (2010) Nasal vaccine innovation. *J Drug Target* 18: 771–786
26. Carter NJ, Curran MP (2011) Live Attenuated Influenza Vaccine (Flu-Mist®; Fluenz™). *Drugs* 71: 1591–1622
27. Tribble D, Kaminski R, Cantrell J, Nelson M, Porter C, Baqar S, et al. (2010) Safety and immunogenicity of a Shigella flexneri 2a Invaplex 50 intranasal vaccine in adult volunteers. *Vaccine* 28: 6076–6085
28. Mayer L, Shao L (2004) Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat Rev Immunol* 4: 407–419
29. Cox JC, Coulter AR (1997) Adjuvants – a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15: 248–256
30. Lee S, Nguyen MT (2015) Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. *Immune Netw* 15: 51–57
31. Tritto E, Mosca F, De Gregorio E (2009) Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* 27: 3331–3334
32. Sornasse T, Flamand V, Becker GD, Bazin H, Tielemans F, Thielemans K, et al. (1992) Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo. *J Exp Med* 175: 15–21
33. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H (2009) Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol* 21: 23–29
34. Kober J, Leitner J, Klauser C, Woitek R, Majdic O, Stöckl J, et al. (2008) The capacity of the TNF family members 4-1BBL, OX40L, CD70, GITR, CD30L and LIGHT to costimulate human T cells. *Eur J Immunol* 38: 2678–2688
35. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM (2008) Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123: 326–338
36. Kratky W, Sousa CR e, Oxenius A, Spörri R (2011) Direct activation of antigen-presenting cells is required for CD8+ T-cell priming and tumor vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 17414–17419
37. Sigmundsdóttir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D, et al. (2007) DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to “program” T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol* 8: 285–293
38. Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2: 675–680
39. Mathew S, Lendlein A, Wischke C (2014) Characterization of protein-adjuvant coencapsulation in microparticles for vaccine delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 87: 403–407
40. Fraser CK, Diener KR, Brown MP, Hayball JD (2007) Improving vaccines by incorporating immunological coadjuvants. *Expert Rev Vaccines* 6: 559–578
41. Jakobsen H, Schulz D, Pizza M, Rappuoli R, Jónsdóttir I (1999) Intranasal Immunization with Pneumococcal Polysaccharide Conjugate Vaccines with Nontoxic Mutants of Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxins as Adjuvants Protects Mice against Invasive Pneumococcal Infections. *Infect Immun* 67: 5892–5897
42. Neidleman JA, Vajdy M, Ugozzoli M, Ott G, O’Hagan D (2000) Genetically detoxified mutants of heat-labile enterotoxin from Escherichia coli are effective adjuvants for induction of cytotoxic T-cell responses against HIV-1 gag-p55. *Immunology* 101: 154–160
43. Holmgren J, Czerkinsky C (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11: S45–S53
44. Blaas SH, Stieber G, Gunckel M, Falk W, Obermeier F, Rogler G (2009) CpG-oligodeoxynucleotides stimulate immunoglobulin A secretion in intestinal mucosal B cells. *Clin Exp Immunol* 155: 534–540
45. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang B-G, Jung Y-J, Nishiyama M, et al. (2008) Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 9: 769–776
46. Christensen D, Agger EM, Andreassen LV, Kirby D, Andersen P, Perrie Y (2009) Liposome-based cationic adjuvant formulations (CAF): Past, present, and future. *J Liposome Res* 19: 2–11
47. Holmgren J, Czerkinsky C, Eriksson K, Mharandi A (2003) Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* 21: S89–S95
48. Freytag LC, Clements JD (2005) Mucosal adjuvants. *Vaccine* 23: 1804–1813
49. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M (2009) New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 30: 23–32
50. Eriksson K, Holmgren J (2002) Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr Opin Immunol* 14: 666–672
51. Duthie MS, Windish HP, Fox CB, Reed SG (2011) Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. *Immunol Rev* 239: 178–196
52. Coffman RL, Sher A, Seder RA (2010) Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity* 33: 492–503
53. Boyaka PN, Marinaro M, Jackson RJ, Ginkel FW van, Cormet-Boyaka E, Kirk KL, et al. (2001) Oral QS-21 Requires Early IL-4 Help for Induction of Mucosal and Systemic Immunity. *J Immunol* 166: 2283–2290
54. Mallapragada SK, Narasimhan B (2008) Immunomodulatory biomaterials. *Int J Pharm* 364: 265–271
55. Chadwick S, Kriegl C, Amiji M (2010) Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Adv Drug Deliv Rev* 62: 394–407
56. Alving CR (1991) Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *J Immunol Methods* 140: 1–13
57. Szewczuk MR, Campbell RJ, Jung LK (1981) Lack of age-associated immune dysfunction in mucosal-associated lymph nodes. *J Immunol* 126: 2200–2204
58. Bansil R, Turner BS (2018) The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv Drug Deliv Rev* 124: 3–15
59. Proctor DF (1977) The Upper Airways. *Am Rev Respir Dis* 115: 97–129
60. Asane GS, Nirmal SA, Rasal KB, Naik AA, Mahadik MS, Rao YM (2008) Polymers for Mucoadhesive Drug Delivery System: A Current Status. *Drug Dev Ind Pharm* 34: 1246–1266
61. Giannasca PJ, Boden JA, Monath TP (1997) Targeted delivery of antigen to hamster nasal lymphoid tissue with M-cell-directed lectins. *Infect Immun* 65: 4288–4298
62. Gullberg E, Keita ÅV, Salim SY, Andersson M, Caldwell KD, Söderholm JD, et al. (2006) Identification of Cell Adhesion Molecules in the Human Follicle-Associated Epithelium That Improve Nanoparticle Uptake into the Peyer’s Patches. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 632–639
63. Daemen T, de Mare A, Bungener L, de Jonge J, Huckriede A, Wilschut J (2005) Virosomes for antigen and DNA delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 57: 451–463
64. Wong PT, Wang SH, Ciotti S, Makidon PE, Smith DM, Fan Y, et al. (2014) Formulation and Characterization of Nanoemulsion Intranasal Adjuvants: Effects of Surfactant Composition on Mucoadhesion and Immunogenicity. *Mol Pharm* 11: 531–544
65. Bielinska AU, Makidon PE, Janczak KW, Blanco LP, Swanson B, Smith DM, et al. (2014) Distinct Pathways of Humoral and Cellular Immunity Induced with the Mucosal Administration of a Nanoemulsion Adjuvant. *J Immunol* 192: 2722–2733
66. Makidon PE, Bielinska AU, Nigavekar SS, Janczak KW, Knowlton J, Scott AJ, et al. (2008) Pre-Clinical Evaluation of a Novel Nanoemulsion-Based Hepatitis B Mucosal Vaccine. *PLoS ONE* 3: e2954
67. Razim A, Pyclik M, Pacyga K, Górska S, Xu J, Olszewski MA, et al. (2021) Silicone Oil-Based Nanoadjuvants as Candidates for a New Formulation of Intranasal Vaccines. *Vaccines* 9: 234

# Effective mucosal vaccines – opportunities and challenges

Agnieszka Razim<sup>1✉</sup>, Sabina Górską<sup>1</sup>, Andrzej Myc<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunobiology of Microbiome, Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy PAS, Wrocław, Poland

<sup>2</sup>Laboratory of Medical Microbiology, Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy PAS, Wrocław, Poland

<sup>3</sup>MNIMBS, Department of Internal Medicine, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

✉corresponding author: agnieszka.razim@hirszfeld.pl

Key words: mucosa, intranasal vaccination, adjuvant, antigen

## SUMMARY

Most pathogens enter the body through the surfaces of the mucous membranes, e.g. the nose or the intestines. The mucosal immune response is essential for the effective elimination of invading pathogens. Unfortunately, most vaccines which are administered intramuscularly by injection do not induce an adequate protective immune response on mucous membranes. For example, after intramuscular injection, the level of secretory IgA antibodies is low and often insufficient to successfully combat the pathogen. On the other hand, mucosal-induced immunity produces a long-lasting effect in the form of a local and systemic response to the pathogen. Moreover, the administration of such vaccines does not generate hazardous medical waste and their application does not require the presence of qualified medical personnel. Therefore, intensive research into vaccines administered via the mucosal route is ongoing. An obstacle in the development of mucosal vaccines is the natural defense mechanisms of the mucosa, the overcoming of which requires the use of specialized adjuvants. Currently, there are no such formulations on the market.

