

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Šárka Bednářová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Adjuvans jako součást klasických a slizničních vakcín

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Šárka Bednářová**
Osobní číslo: **C18201**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Adjuvans jako součást klasických a slizničních vakcín**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

V dostupné odborné literatuře mladší 10 let se seznamte s adjuvans jako součástí různých typů vakcín. Zpracujte rešerši na téma adjuvans v aktuálním přehledu typů vakcín, např. subkutánních, slizničních aj. Vysvětlete účel použití adjuvans v očkování. Popište jeho interakci s imunitním systémem. Uveďte příklady nově vyvíjených adjuvans.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Adjuvans jako součást klasických a slizničních vakcín jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 6. 2021

Šárka Bednářová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za odborné vedení, ochotný přístup, trpělivost, cenné rady a připomínky v průběhu celé práce. Zároveň bych ráda poděkovala své rodině, která mě v průběhu studia podporovala.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá adjuvans používanými ve vakcínách. V první části jsou definovány základní pojmy týkající se imunitního systému a jeho mechanismy. Druhá část se zabývá imunizací. Ve třetí části jsou shrnuta používaná a nově vyvíjená adjuvans v klasických i slizničních vakcínách.

KLÍČOVÁ SLOVA

imunitní systém, adjuvans, vakcinace, protilátky, imunitní paměť

TITLE

Adjuvant as part of conventional and mucosal vaccines

ANNOTATION

The bachelor work deals with the adjuvants used in vaccines. The first part defines the basic concepts related to the immune system and its mechanisms. The second part deals with vaccination. The third part summarizes the used and newly developed adjuvants in conventional and mucosal vaccines.

KEYWORDS

immune system, adjuvant, vaccination, antibody, immune memory

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	10
ÚVOD	12
1. ÚLOHA ADJUVANS VE VAKCÍNĚ	13
2. IMUNIZACE	16
3. KLASIFIKACE ADJUVANS	18
4. VAKCÍNY BEZ ADJUVANS	20
5. VAKCINACE	22
5.1. Parenterální podání vakcíny	22
5.1.1. Používaná adjuvans	23
5.1.2. Princip působení vybraných adjuvans	26
5.1.3. Soli hliníku	28
5.1.4. MF59	29
5.1.5. AS01	29
5.1.6. AS03	30
5.1.7. AS04	30
5.1.8. Virozomy	31
5.1.9. Adenoviry	31
5.1.10. Výhody a nevýhody použití adjuvans	32
5.1.11. Nově vyvíjená adjuvans	34
5.2. Imunizace prostřednictvím slizničních povrchů	35
5.2.1. Slizniční imunita	36
5.2.2. Způsoby podání vakcíny	38
5.2.2.1. Perorální podání	38
5.2.2.2. Sublingvální a bukální podání	38
5.2.2.3. Intranazální podání	39
5.2.2.4. Další způsoby podání	40
5.2.3. Používaná adjuvans	40
5.2.4. Princip působení slizničních adjuvans	42
5.2.5. Výhody a nevýhody	45
5.2.6. Výzkum nových slizničních adjuvans a vakcín	45
6. ZÁVĚR	49

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 Srovnání účinnosti vakcíny bez adjuvans a vakcíny obsahující adjuvans. Převzato z [7].	14
Obrázek 2 Primární a sekundární odpověď organismu po podání antigenu. Převzato z [11].	222
Obrázek 3 Přehled vývoje adjuvans. Převzato z [1].	266
Obrázek 4 Princip působení AS03. Převzato z [54].	30
Tabulka 1 Rozdělení adjuvans. Převzato a upraveno z [1].	188
Tabulka 2 Příklady používaných adjuvans. Převzato a upraveno z [2].	27
Tabulka 3 Výhody a nevýhody adjuvans používaných ve vakcínách proti chřipce. Převzato a upraveno z [5].	332
Tabulka 4 Slizniční adjuvans. Převzato a upraveno z [59].	411

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

Ag	Antigen
IgG	Imunoglobulin třídy G
IgM	Imunoglobulin třídy M
IgA	Imunoglobulin třídy A
IL	Interleukin
TNF	Tumor necrosis factor
APC	Antigen prezentující buňky
DC	dendritické buňky
TLR	Toll-like receptory
PPR	Patogen pattern receptors
PAMP	Pathogen-associated molecular patters, tzv. nebezpečné vzory
DAMP	Damage-associated molecular patters, tzv. vzory spojené s poškozením molekul
NK	Natural killers
CD4+	Pomocné T lymfocyty, T _H
CD8+	Cytotoxické T lymfocyty, T _C
ADCC	Antibody dependent cell cytotoxicity
LC	Langerhansovy buňky
MALT	Lymfoidní tkáň spojená se sliznicemi
NALT	Lymfoidní tkáň spojená se sliznicemi nosu
GALT	Lymfoidní tkáň spojená se sliznicemi trávicí soustavy
BLAT	Lymfoidní tkáň spojená se sliznicemi plic
HBV	Hepatitida B
HCV	Hepatitida C
HPV	Lidský papilomavirus
TBC	Tuberkulóza
MPL	Monofosforylový lipid
CT	Cholera toxin
LT	Termolabilní enterotoxin
PT	Petrusový toxin
ADS	Adenovirus
CFA	Inkompletní Freundovo adjuvans

IFA	Inkompletní Freundovo adjuvans
LPS	Lipopolysacharid
CTB	Podjednotka B cholera toxinu
CpG	Cytosin-fosfát-guanosin
Poly(I:C)	Polyinosinko-polycytilová kyselina
cGAMP	2',3'-cyklický guanosin monofosfát-adenosinmonofosfát
HA	Hemaglutinin
NA	Neuraminidáza
CNS	Centrální nervová soustava

ÚVOD

Objev vakcín je považován za důležitý milník historie medicíny. Dnes vakcinace představuje jednu z nejúčinnějších a nejdůležitějších strategií prevence [1]. Od doby, kdy Edward Jenner vyvinul první vakcínu proti pravým neštovicím, uběhlo mnoho let, bylo provedeno mnoho výzkumů a studií, které nám pomohly lépe pochopit funkci imunitního systému a tím i mechanismus působení vakcín [2]. Účinných látek, které jsou používány ve vakcínách pro aktivní imunizaci, je velmi široká škála. Používají se živé oslabené nebo inaktivované bakterie a viry. Jejich virulentní vlastnosti jsou sice oslabeny, ale i tak mají dostatečně vysokou účinnost a imunogennost, díky které dokážou v těle vyvolat dostatečně kvalitní imunitní odpověď. Jejich používání je ale doprovázeno bezpečnostními obavami, hlavně pro pacienty trpící imunodeficiencí [3]. V současné době se společnosti snaží vyrábět co nejbezpečnější vakcíny a minimalizovat jejich vedlejší účinky. Stále častěji se proto používají virové částice, bílkoviny (př. toxoidy), polysacharidy nebo rekombinantní proteiny. Komplikací je, že většina takto upravených mikrobiálních antigenů nevede k vytvoření dostatečně silné odpovědi imunitního systému a vytvoření imunologické paměti. Proto jsou do vakcín přidávána adjuvans (pochází z lat. slova *adjuvare* a znamená pomáhat) [4], která tyto problémy minimalizují. Ačkoli jsou dnes stále více používána, jejich vývoj je poměrně pomalý a pro klinické účely je v dnešní době schváleno jen poměrně malý počet [2-3,5-9].

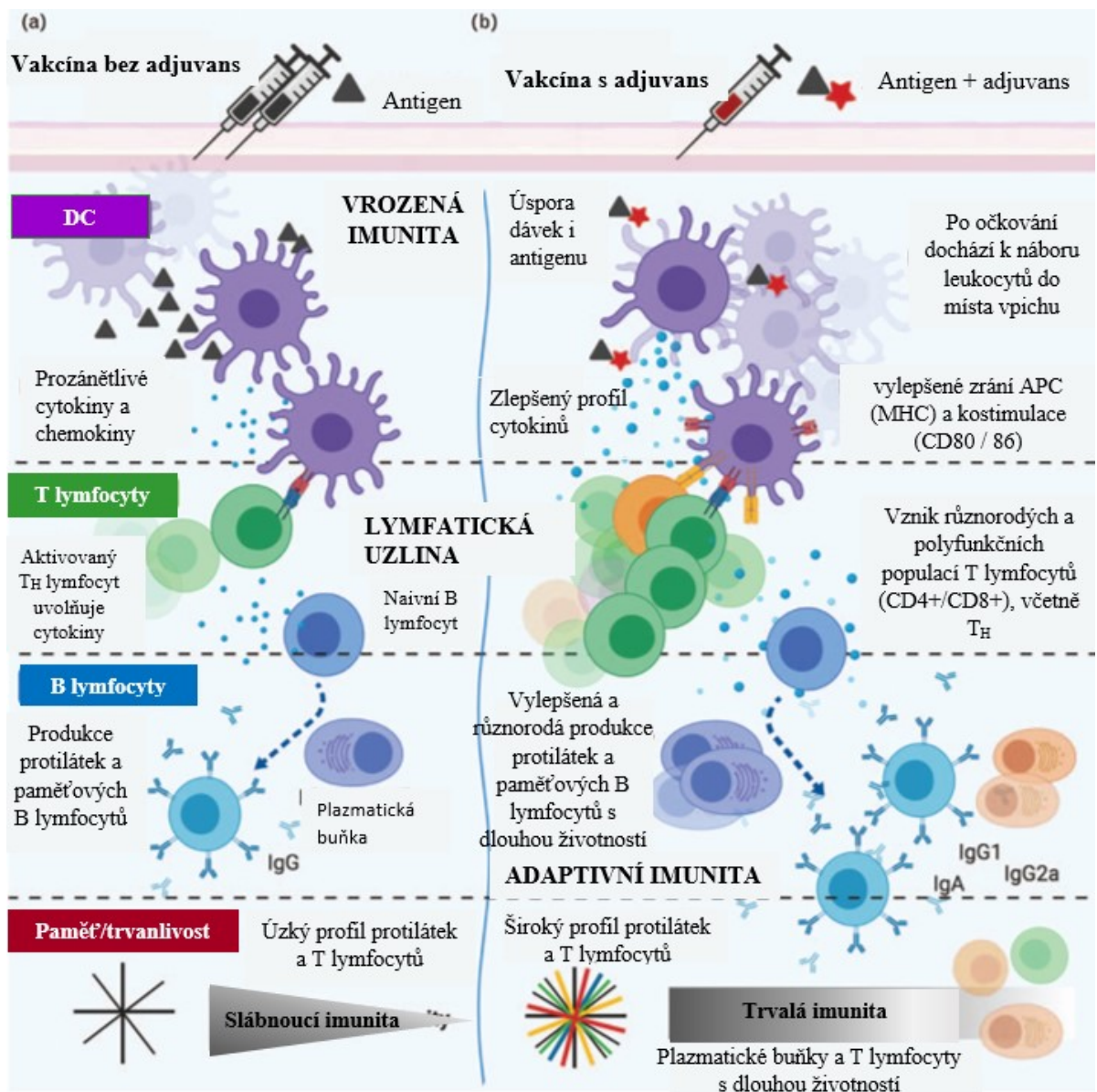
Většina dnes používaných adjuvans (například Alum nebo MF59) je součástí vakcín aplikovaných injekčně do svalu nebo pod kůži. Vakcíny ale nemusejí být aplikovány pouze injekčně. V posledních letech se intenzivně zkoumá jejich podání přes sliznice. K tomu je ale třeba zvolit správná slizniční adjuvans, která jsou přizpůsobena podmínkám sliznic. Klasická adjuvans ve slizničních vakcínách nefungují tak, jak by měly. Navíc mohou způsobit závažné komplikace. Výběr správného adjuvans je tedy důležitý nejen z hlediska indukované imunitní odpovědi, ale hlavně z hlediska bezpečnosti vakcín.

Cílem této práce je zpracovat přehled adjuvans, která jsou dnes používána jak v klasických vakcínách, tak ve slizničních. Popsat mechanismus jejich působení a čím se od sebe liší. Jsou zmíněna také nově vyvíjená adjuvans, která by v budoucnu mohla představovat průlom ve vakcinaci.

1. ÚLOHA ADJUVANS VE VAKCÍNĚ

Adjuvans ve vakcíně posiluje reakci imunitního systému několika způsoby [1; 3]. Zvyšuje imunogenicitu antigenu, takže je možné ve vakcínách používat i méně imunogenní antigeny, například rekombinantní proteiny. Funguje jako doručovací systém antigenu do organismu. Prodlužuje dobu, po kterou je antigen přítomný v krvi, takže se vytvoří větší množství protilátek. Napomáhá pohlcení antigenu a aktivuje makrofágy a lymfocyty. Dále také stimuluje produkci imunoregulačních cytokinů [1; 3; 10]. Možná je také určitá imunomodulace, kdy se podle použití různých adjuvans mohou měnit uvolněné cytokiny a chemokiny [10]. To znamená, že použité antigeny i adjuvans ovlivní, které imunokompetentní buňky se imunitní reakce zúčastní a jestli dojde k vytvoření imunologické paměti [11].

Adjuvans urychluje reakci organismu na vakcínu. U některých vakcín je potřeba aplikace několika dávek, aby bylo dosaženo optimální hladiny protilátek. Vakcíny s adjuvans mohou zvýšit odpověď organismu a dosáhnout tak vyššího titru protilátek již po první aplikaci vakcíny. I když nemusí dojít k vytvoření dostatečné imunologické paměti, může to vést k lepší ochraně jedinců během pandemií. Srovnání účinnosti vakcín viz obrázek 1.



Obrázek 1 Srovnání účinnosti vakcíny bez adjuvans a vakcíny obsahující adjuvans. Převzato z [7].

Dalším důvodem, proč se adjuvans ve vakcínách používá, je snížení množství podávaného antigenu, a tím i šetření dávek vakcín, protože výroba antigenů je poměrně nákladná [1; 10].

Výhodou je i vyšší účinnost očkování u lidí s nedostatečnou imunitní odpovědí, u velmi mladých, velmi starých pacientů nebo například u pacientů, kteří jsou imunosupresivní. Může to být vyvoláno infekcí některých patogenů (hlavně HIV) [10; 12].

Adjuvans je také nepostradatelnou složkou slizničních vakcín. Povrch sliznice má několik druhů bariér – mechanické, chemické i biochemické. Proto je poměrně složité podávat vakcíny přes slizniční povrchy [12]. Adjuvans tedy v tomto případě slouží jako ochrana antigenu v tomto prostředí, takže může dojít k vyvolání lokální imunitní odpovědi. K tomuto účelu

se hodí jen některá adjuvans, příkladem může být tepelně labilní enterotoxin (LT) *E. coli* [10; 13].

Aktuálním příkladem použití různých adjuvans a antigenů mohou být vakcíny proti onemocnění COVID-19. Vektorová vakcína od americké firmy Johnson & Johnson (označení JNJ-78436735 nebo Ad26.COV2.S) používá adenovirový obal, ve kterém je změněna původní genetická informace adenoviru, takže se vir nemůže replikovat. Do něj je vložena genetická informace kódující klíčovou část viru SARS-CoV-2 (tzv. spike protein). Adenovirus tady slouží jen jako dodavatel a nemůže se množit. Je ale využita jeho adjuvantní vlastnost, protože samotnou genetickou informaci nelze ve vakcínách použít. Na podobném principu je založena i vakcína společnosti AstraZeneca a vakcína Sputnik V. Také jde o vektorovou vakcínu používající adenovirový obal, ve kterém je uložena genetická informace.

Od ostatních vakcín (od firem Pfizer/BioNTech, Moderna) se liší použitou genetickou informací a použitým adjuvans [14]. Firmy Pfizer/ BioNTech a Moderna použily mRNA, která je chráněna lipidovými nanočásticemi. Genetická informace v buňkách zůstává jen krátkou dobu a je rychle rozložena. Proto s těmito vakcínami musí být zacházeno opatrně. Vektorová vakcína (Johnson & Johnson, AstraZeneca, Sputnik V) používá dsDNA, která je stabilnější [15]. Při aplikaci dochází k pohlcení adenoviru buňkami, dsDNA se dostává do jádra, kde si buňka informaci přečte a vytvoří podle ní RNA, podle které se syntetizují spike proteiny. Ty jsou vystaveny na povrchu buňky a mohou být představeny dalším buňkám. Adenovirus způsobí, že buňka, která ho pohltila vysílá do okolí signály, které aktivují další buňky imunitního systému (APC) [15]. Informaci přebírají i T_H lymfocyty, které dále aktivují B lymfocyty. Ty se přeměňují na plazmatické buňky a začínají produkovat specifické protilátky proti struktuře spike proteinu. Takže při dalším setkání s virem bude tělo připraveno a virus rozpozná. Kromě T_H lymfocytů mohou APC aktivovat i NK buňky, které rozpoznávají buňky infikované virem a likvidují je [15]. Výhodou vektorové vakcíny Ad26.COV2.S je navození imunitní paměti již po jedné dávce, na rozdíl od dalších dostupných mRNA vakcín BNT162b2 (Pfizer/ BioNTech), mRNA-1273 (Moderna) či vektorových vakcín ChAdOx1 (AstraZeneca) a Sputnik V, které je třeba aplikovat ve dvou dávkách. Zatím ale není jasné, jak dlouho bude ochrana vakcíny trvat. Dle zatím dostupných údajů chrání tato vakcína i po jedné dávce před těžším průběhem nemoci [14].

2. IMUNIZACE

Imunizace může být rozdělena na dvě skupiny, pasivní a aktivní imunizaci. Aktivní imunizace je postup, jehož cílem je vytvoření specifické imunity vůči konkrétnímu antigenu [11]. Přirozená imunita rozpozná nebezpečné vzory (PAMP) a zároveň aktivuje specifickou imunitu. Další cesta aktivace imunitního systému je pomocí DAMP. Jsou to vzory spojené s poškozením molekulárních struktur, jsou opět rozpoznávány nespecifickou imunitou, která následně aktivuje i specifickou [3]. Rozpoznávány jsou pomocí PPR molekul, což jsou receptory na povrchu fagocytů, popřípadě mohou být ve formě molekul sekretovány do okolí a vázat se na mikroby [3; 11].

Aktivní imunizace je představována očkováním, kdy je do organismu vpravena očkovací látka obsahující antigen. Organismus si poté sám vytváří obranné protilátky proti tomuto antigenu. Očkování zajišťuje jedinci individuální ochranu, při dostatečné proočkovanosti populace je také zajištěna kolektivní ochrana [11]. To pomáhá předcházet velkým epidemiím. K vytvoření kolektivní imunity je třeba udržet proočkovanost populace kolem 75-95 %, závisí ale na každém onemocnění [16].

Imunizace může být i pasivní. Při pasivní imunizaci jsou do organismu vpraveny již hotové protilátky, které mohou být lidského nebo zvířecího původu [3].

Imunizací člověka se rozumí tvorba specifické imunitní odpovědi zprostředkované buňkami (hlavně T lymfocyty) a tvorba protilátek po setkání s antigenem [16]. Kromě specifické imunitní odpovědi jsou T lymfocyty důležité i pro regulaci imunitní odpovědi [11]. Protilátky jsou produkty plazmatických buněk, které se vyvíjejí z B lymfocytů. Jsou to imunoglobuliny (glykoproteiny) s různou strukturou – mohou to být monomery, dimery nebo pentamery. Protilátky produkované v organismu jsou polyklonální, jsou namířeny proti více epitopům jednoho antigenu nebo proti směsi antigenů. Součástí jejich molekuly je paratop, který se váže na epitop na povrchu antigenu [3]. Protilátky mají několik funkcí. Chrání slizniční povrchy před kolonizací různými patogeny. Mohou neutralizovat infekční agens jako viry, bakterie, toxiny. Dále mohou působit jako opsoniny a usnadňovat rozpoznávání patogenů a jejich likvidaci. Protilátkami označené terčové buňky mohou být rozpoznány a zlikvidovány NK buňkami (systém ADCC) nebo mastocyty. Jsou také důležité pro aktivaci nespecifické humorální imunity. Protilátky třídy IgM a IgG jsou aktivátory komplementového systému. [3].

Antigeny jsou částice o dostatečné velikosti, schopné vyvolat odpověď organismu. Nejčastěji jsou to proteiny, glykoproteiny, nukleové kyseliny [1; 3; 10; 17]. Mezi jejich vlastnosti patří antigenicita a imunogenicita. Antigenicita je širší pojem než imunogenicita, je to

schopnost antigenu reagovat s protilátkou. Pokud má molekula schopnost antigenicity, nemusí to znamenat, že má i schopnost být imunogenní. Imunogenicita je schopnost molekuly vyvolat imunitní odpověď, která je zprostředkována lymfocyty, dochází k rozpoznání antigenu specifickými protilátkami nebo lymfocyty (humorální, buněčná imunita) [18; 19]. Podmínkami imunogenicity jsou dostatečná velikost, stabilita molekuly a odlišnost od struktur, které jsou brány jako vlastní a tolerovány imunitním systémem. V případě očkování je imunogenicita antigenu velmi důležitá. Čím vyšší je, tím menší množství antigenu je potřebné k vyvolání imunitní odpovědi. Vyvolaná reakce je silnější a afinita k epitopu vyšší. Pokud má ale antigen nízkou imunogenicitu, lze ji zvýšit jinými faktory, například pomocí adjuvans. V některých případech může být vysoká imunogenicita spíše na škodu, a to hlavně v situacích, kdy je potřeba tolerovat cizí antigen. To platí u transplantací tkání a orgánů. V těchto případech je možné imunogenicitu snížit [19].

Rozsah i kvalita specifické imunity je v poměrně velké míře ovlivněna vrozenou imunitou. Ta je představována velkým množstvím buněk (NK buňky, fagocyty) a molekul (cytokiny a komplementový systém), které jsou v těle přítomné a likvidují širokou škálu infekčních agens [11].

Aby u člověka proběhla aktivní imunizace, je nutné, aby se organismus setkal s imunogenem. Může se s ním setkat během svého života, přirozeně anebo uměle, kdy je antigen podán očkováním. Pokud vakcíny obsahují mikrobiální antigen, lidský organismus si proti němu vytvoří specifické protilátky. V těle dochází k vytvoření imunologické paměti. Organismus je poté schopen rychleji zareagovat na případný patogen v těle a včas proti němu spustit reakci, která je zajištěna kooperací celého systému, zejména ale adaptivní složkou imunitního systému (B a T lymfocyty) [11; 19]. Díky tomu je průběh nemoci u daného člověka mírnější anebo u něj nemoc vůbec nepropukne.

V některých případech mohou být jedinci podané již hotové specifické protilátky. K tomu dochází hlavně v případech, pokud došlo k uštknutí pacienta hadem a je třeba rychlé dodání protilátek. Také se podávají pacientům, kteří si v důsledku porušené imunity nejsou schopni vytvořit protilátky sami. Tento postup se nazývá pasivní imunizace, jejíž nevýhodou je její dočasný účinek. Protilátky se většinou získávají z plazmy imunizovaných zvířat, ale není to jediná možnost. Specifické protilátky se mohou získávat i z plazmy dárců, kteří již danou chorobu prodělali a z jejichž plazmy byl daný přípravek vyroben [20].

3. KLASIFIKACE ADJUVANS

Adjuvans je rozmanitá skupina látek, které se od sebe vzájemně liší. Mohou být rozděleny do několika kategorií, a to podle původu, mechanismu účinku, použití nebo fyzikálně – chemických vlastností (tabulka 1).

Tabulka 1 Rozdělení adjuvans. Převzato a upraveno z [1]

Typ doručovacího systému	
Minerální soli	Soli hliníku, neúplné Freundovo adjuvans, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Lipidové částice	Částice podobné virům, kochleáty, MF59
Mikročástice	PLA (polylaktická kyselina), virozomy
Imunitní potenciátory	Flagelin, muramyl dipeptid (MDP), saponin
Slizniční adjuvans (imunitní potenciátory)	Choleratoxin (CT), tepelně labilní enterotoxin (LT), chitosan

Dle použití by se adjuvans dala rozdělit na slizniční adjuvans a ta, která se používají v parenterálních vakcínách. Většinou je nejde zaměňovat, protože mají rozdílný mechanismus účinků, indukují jiné imunitní odpovědi a v organismu jsou vystaveny odlišným podmínkám. Slizniční adjuvans jsou po aplikaci vystavena poměrně tvrdým podmínkám, musí být odolná proti působení slin, žaludečních šťáv. Mají ale velkou výhodu, kterou je indukce systémové i slizniční imunity [13]. Při parenterálním podání nejsou očkovací látky takto tvrdým podmínkám vystaveny.

Slizniční i klasická adjuvans se dají rozdělit na dvě základní skupiny – imunitní potenciátory a doručovací systémy. Doručovací systémy fungují jako nosiče antigenu, patří sem různé lipidové částice, mikročástice a minerální soli. Imunitní potenciátory cílí především na PPR molekuly a patří sem agonisté PPR, bakteriální enterotoxiny nebo různé částice podobné virům [13].

Molekuly PPR (Pathogen pattern receptors) jsou molekuly exprimované na povrchu buněk, které jsou schopny rozeznávat PAMP a DAMP. Agonisté PPR pomáhají aktivovat vrozenou imunitu prostřednictvím receptorů. Tyto receptory identifikují PAMP, váží se na ně a aktivují APC, a to hlavně dendritické buňky (DC) a makrofágy [1; 10; 20]. Patří sem Toll-like receptory, Rig-like receptory [3]. Mezi imunitní poteciátory patří také cholera toxin a tepelně labilní

enterotoxin *E. coli*, které se přidávají do slizničních vakcín. Součástí parenterálních vakcín mohou být například flagelin, muramyl dipeptid nebo saponin [1].

Lipidové částice, mikročástice i virové vektory fungují jako doručovací systémy. Tato adjuvans se používají například v DNA a RNA vakcínách, kde obalí genetickou informaci a doručí ji do těla. V těle jsou pohlceny fagocyty a genetická informace je vystavena na povrchu fagocytující buňky [1].

Pro správnou funkci vakcíny je důležité vybrat adjuvans se správným mechanismem.

4. VAKCÍNY BEZ ADJUVANS

Adjuvans není potřeba přidávat do všech vakcín. Některé vakcíny vykazují dostatečnou účinnost a imunogenicitu i bez jeho přidání. Obvykle nejsou potřebná pro živé oslabené vakcíny, protože jsou schopné samy zvýšit imunitní odpověď. Tyto vakcíny obsahují patogeny, které byly oslabeny, nebo byl vybrán méně virulentní kmen. Vyrábějí se spíše z virů, než z bakterií [16].

Po aplikaci živé oslabené vakcíny dochází v těle k podobným dějům, jako při přirozeném setkání s patogenem. Dojde k vyvolání srovnatelné buněčné i humorální imunitní odpovědi a k vytvoření imunologické paměti často po jedné nebo dvou dávkách [3; 16].

Nevýhodou těchto vakcín je, že se po očkování u pacienta může rozvinout onemocnění, ale jeho průběh by měl být mnohem mírnější. U vnímavých jedinců k těmto vedlejším účinkům dochází minimálně. Problém tyto vakcíny představují pro jedince s oslabenou imunitou. Také by se neměly aplikovat těhotným ženám. Ve velmi vzácných případech by mohlo dojít k opětovnému navrácení oslabené formy viru do infekční [16].

Tento typ vakcín byl používán hlavně v minulosti u mnoha prvních vyrobených vakcín, například proti neštovicím, tuberkulóze, vzteklině, žluté zimnici [16]. Dnes se řada farmaceutických společností snaží jít bezpečnější cestou, a proto nahrazují živé oslabené vakcíny jinými antigeny. I když některé stále používané vakcíny obsahují živý oslabený mikroorganismus. Výhodou podání živého oslabeného viru je navození reakce organismu podobné té, která by nastala při přirozené infekci bez nebezpečí množení viru, nebo produkce toxinů [21].

Příkladem mohou být vakcíny proti chřipce podávané intranazální cestou [21]. Obsahují živý oslabený virus chřipky. Tyto vakcíny indukují systémovou i slizniční imunitní odpověď, silnější, než při použití inaktivované vakcíny podávané intramuskulárně [13; 21]. Při laboratorních testech bylo zjištěno, že indukuje produkci specifických protilátek IgG i slizničních protilátek IgA, které chrání sliznici před vstupem a pomnožením viru již po jedné dávce. Takže dochází ke stimulaci slizniční i systémové imunity [16; 13]. Slizniční vakcíny jsou slibnou strategií v boji proti mikroorganismům, které se do těla dostávají přes sliznice [22]. Tento typ vakcín se nedoporučuje starším lidem, dětem do dvou let a imunosupresivním osobám [21]. Používá se tetravalentní vakcína Fluenz (od firmy AstraZeneca), která obsahuje živý oslabený virus [10]. Jiné vakcíny (např. Intanza, Humenza a jiné) obsahují rozštěpený virion [10]. Problém představují mutace chřipkového viru, které snižují jeho imunogennost a tím celkovou účinnost vakcíny. V takovém případě je možné použít adjuvans [5].

Perorálně podávaná vakcína proti dětské obrně je také vyrobena ze živého oslabeného mikroorganismu, podává se kapkami a navozuje střevní a slizniční imunitu [16]. Vzhledem ke své schopnosti mutovat do patogenní formy je vakcína postupně nahrazována inaktivovanou formou.

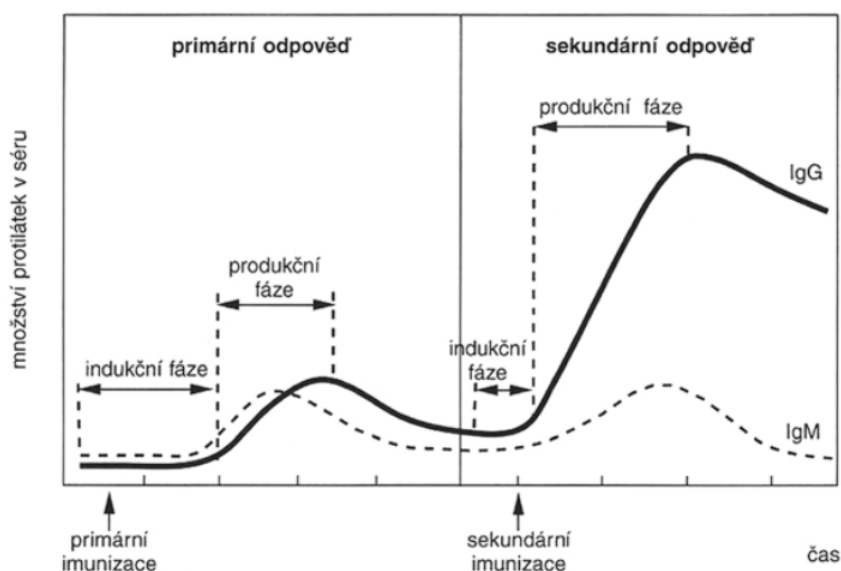
Některé vakcíny proti rotaviru (Rotarix, GlaxoSmithKline a RotaTeq) také neobsahují adjuvans, je dostatečně imunogenní a obsahuje živý oslabený virus [23]. Vakcína byla registrována roku 2006, od té doby se běžně používá a je doporučována světovou zdravotnickou organizací. Je podávána kojencům perorálně. Předpokládá se, že tento způsob podání je nejvíce podobný přirozené infekci a poskytuje ochranu jako po prodělání nemoci. Bylo ale zjištěno, že tato forma podávání velmi snižuje její imunogenicitu. Proto se uvažuje její podávání alternativními formami jako jsou mikroehlové transdermální náplasti [23].

Dalším příkladem je BCG vakcína proti TBC (obsahuje oslabený kmen *Mycobacterium bovis*) [7; 24]. Vakcína Priorix proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám také obsahuje živé atenuované viry a neobsahuje adjuvans [25].

5. VAKCINACE

Při aktivní imunizaci se tělo setkává s antigenem a samo si proti němu vytváří protilátky. Může jít o aktivní umělou nebo aktivní přirozenou imunizaci. Při aktivní přirozené imunizaci se jedinec setkává s antigenem přirozeně a musí nemoc prodělat, aby došlo k vytvoření protilátek. U aktivní umělé imunizace (též očkování, vakcinace) to neplatí. Po umělém vpravení očkovací látky, která obsahuje specifický antigen, dochází k vytvoření protilátek, které chrání organismus proti patogenním mikroorganismům, takže pacient nemusí nemoc prodělat. Při opětovném setkání s infekčním agens je tělo schopné se bránit, díky imunologické paměti. Po primární imunizaci vznikly z naivních buněk hlavně buňky efektorové, ale v menším množství i buňky paměťové. Po sekundární imunizaci vznikají z paměťových buněk efektorové i další paměťové buňky mnohem rychleji. Tím je zabezpečena velmi rychlá sekundární odpověď organismu a tvorba vysokých titrů specifických protilátek (obrázek 2) [11]. Titr protilátek třídy IgM, které vznikají při imunizaci jako první, je po primární i sekundární imunizaci srovnatelný. Titr protilátek IgG je po sekundární imunizaci několikanásobně vyšší.

Díky vakcinaci lze velkému množství nemocí předcházet a zároveň je postupem času eradikovat. Příkladem jsou právě neštovice, u kterých se díky vakcinaci podařilo předcházet velkým epidemiím, a nakonec došlo k eradikaci nákazy [3].



Obrázek 2 Primární a sekundární odpověď organismu po podání antigenu. Převzato z [11].

5.1. Parenterální podání vakcíny

Každá vakcína má optimální místo pro aplikaci, které vychází z klinických testů. Výběr tohoto místa závisí na mnoha faktorech, především ale na množství přítomných APC, které

vpravený antigen dále zpracovávají [26]. Kromě místa aplikace se vakcíny liší také způsobem podání.

Parenterální podání léku, popřípadě výživy, znamená mimostřevní podání. Využívá se například, pokud není možný perorální způsob podání. U vakcín jde o nejpoužívanější podání. Aplikace se provádí nejčastěji injekčně, a to buď intramuskulárně do svalu, intravenosně do žíly nebo subkutánně do podkoží. Jsou možné i jiné způsoby aplikace, ty se ale používají vzácně [27].

Intramuskulární aplikace je jedním z nejčastějších typů aplikací vakcíny. Ta je aplikována injekčně do místa s dostatečně velkou svalovou vrstvou. Nejčastěji do stehna (oblast *musculus quadriceps femoris*). U intramuskulárního způsobu aplikace vakcíny je nástup účinků rychlejší [28].

U subkutánního podání vakcíny je látka injekčně aplikována do podkoží (ne do svalu). Toto podání je méně časté, ale také velmi významné. V podkoží se nachází velké množství krevních a lymfatických kapilár, které umožní vstřebávání. Při aplikaci lékař vytvoří přehnutím kůže záhyb, nejčastěji na rameni (oblast *musculus biceps brachii*), břichu (*musculus rectus abdominis*) nebo stehnu (oblast *musculus quadriceps femoris*) a aplikuje látku. Jehla by neměla proniknout hluboko, jen na výšku záhybu. Při subkutánním podání vede častěji k lokálním nežádoucím účinkům. Pro některé pacienty (s trombocytopenií nebo hemoragií) je ovšem toto podání lepší [28]. Subkutánně se podávají například živé vakcíny proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám nebo proti žluté zimnici [26].

Nevýhodami intramuskulárního a subkutánního podání je bolestivá aplikace. Dále potom potřeba proškoleného personálu pro aplikaci injekce.

5.1.1. Používaná adjuvans

První objevená a dodnes celosvětově nejpoužívanější adjuvans jsou ta na bázi hliníku. Jsou to hlavně hydroxid hlinitý, fosfát hlinitý a kamenec. Jsou součástí celé řady vakcín, například proti tetanu a záškrtu, kde jsou na hydroxid hlinitý navázány inaktivované toxiny, které jsou produkovány bakteriemi *Clostridium tetanii* nebo *Corynebacterium diphtheriae*. Toxiny jsou inaktivovány teplem nebo chemikáliemi a jsou označovány jako toxoidy [16]. Dále jsou tato adjuvans součástí vakcín proti černému kašli (Dtap), HBV, HCV [29; 30]. I když jsou tato adjuvans používaná nejvíce, stále není zcela přesně objasněn mechanismus jejich účinku, nejspíše mají depozitní efekt, aktivují komplement a stimulují makrofágy (podrobněji viz. kap. 5.1.2. Princip působení). Jejich hlavní nevýhodou je nedostatečná aktivace

T buněčných odpovědí. To je jedna z příčin, proč se hledají nová adjuvans, která by tento nedostatek řešila [8].

Další adjuvans, které se dnes používá v klinické praxi, je emulze oleje ve vodě. Patří sem adjuvans AS01, AS02, AS03, AS04 a MF59. Liší se jak funkcí, tak mechanismem působení.

AS01 je součástí zatím jediné vakcíny proti malárii. Je známá pod názvem RTS, S/AS01 [31]. Bylo zjištěno, že vakcína dokáže snížit u dětí pravděpodobnost těžkého průběhu malárie. Vakcína je zatím používána v Ghaně, Keni a Malawi, kde je velké riziko přenosu malárie. I když WHO uznala potenciál vakcíny, stále není doporučena pro rozsáhlé používání [31]. Je také součástí již licencované vakcíny proti herpes-zoster, která je známá jako Shingrix [32]. AS01 je adjuvans na bázi liposomů, je složeno ze dvou látek, 3-O-desacyl-4'-monofosforyl lipidu A a ze saponinu QS-21 [33]. Tyto dvě látky byly vybrány, protože v době vývoje byly známy jejich imunostimulační vlastnosti [33].

Adjuvans AS02 obsahuje monofosforylový lipid (MPL) a saponin QS-21. Je součástí vakcín proti malárii, hepatitidě typu B nebo respiračnímu syncytiálnímu viru, který je hlavní příčinou onemocnění dolních cest dýchacích [34]. Kombinovaná vakcína proti malárii je známá pod názvem RTS, S + TRAP/AS02. Roku 2015 prováděly studie, které potvrdily jejich bezpečnost, zatím ale vakcína není používána [35]. Další studie provedla srovnání účinnosti vakcín proti respiračnímu viru, obsahující kromě AS02 i adjuvans AS03 a MF59. Vakcína s AS02 vykazovala nejlepší stimulaci imunitní odpovědi, bylo dosaženo nejvyššího titru protilátek a dlouhotrvající ochrany (studie z roku 2020) [34].

MF59 bylo schváleno poměrně nedávno a zajišťuje dobrou imunogenicitu i pro čištěné (purifikované) antigenové vakcíny. Při použití tohoto adjuvans lze ušetřit dávku vakcíny. Pro použití u lidí je bezpečné a je dobře snášeno. V době jeho vývoje bylo nejvíce používáno adjuvans obsahující hlinité soli, problémem ovšem byla jeho nedostatečná účinnost v nových rekombinantních vakcínách. Je navrženo na principech Freundova neúplného adjuvans. Jde o emulzi oleje ve vodě. Obsahuje přírodní látku squalen, která se běžně vyskytuje v lidských tkáních. Získává se z jater žraloků. Kvůli obavám o bezpečnost byl zkoumán vliv MF59 na vznik autoimunitních chorob. Hlavním důvodem těchto obav byl squalen, protože pokud by došlo k vytvoření protilátek proti této struktuře, mohlo by to vést ke vzniku autoimunitních chorob. Studie ovšem prokázaly, že toto riziko nehrozí a MF59 je bezpečné [5; 10; 29]. Běžně se používá například ve vakcínách proti chřipce a je nejčastěji používaným adjuvans v těchto vakcínách. Příkladem používaných vakcín proti pandemické chřipce

(obsahují H1N1) jsou Focetria a Celtura (od firmy Novartis Vaccines), registrovaných v roce 2009 [36]. Je možné ho použít i ve slizničních vakcínách [37].

AS03 je součástí vakcín proti pandemické chřipce. Jde o emulzi oleje ve vodě, která je složena ze squalenu, polysorbátu 80 a vitamínu E (α -tokoferol) [36].

AS04 spojuje vlastnosti hlinitých solí a agonistů TLR. V klinické praxi je součástí vakcín proti HPV a HBV [38].

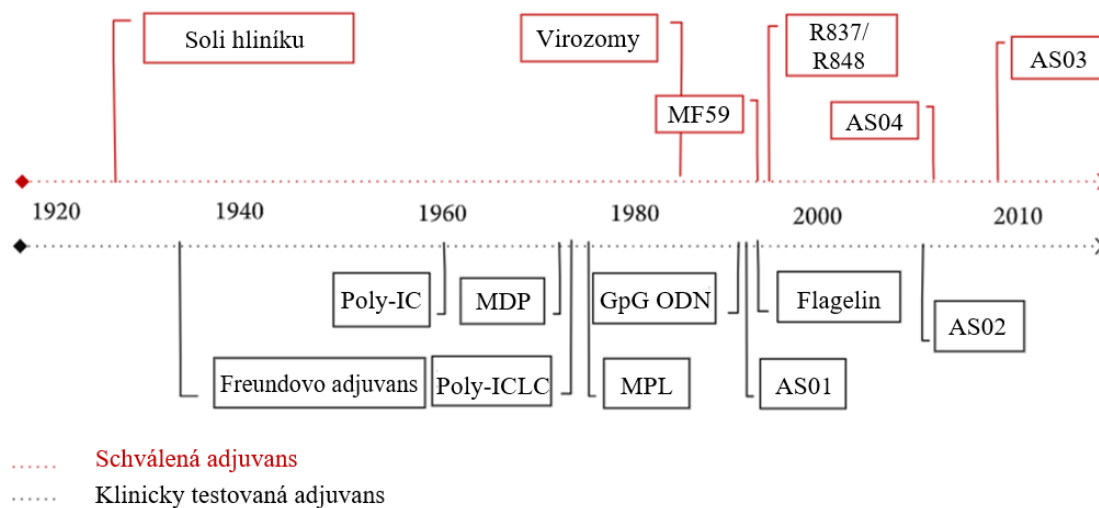
Dalším typem adjuvans, jsou virozomy. Jedná se o virové částice, které obsahují lipidové vezikuly s virovými proteiny a peptidy. Obsahují přesně definované virové antigeny, hemagglutinin vázaný na membránu a neuramidinázu, která se získává z chřipkového viru [39]. Vyrábí se z obalu chřipkových virů, ale pro pacienty nepředstavují riziko, protože virus je inaktivovaný a neobsahuje genetický materiál a nereplikuje se. Velkou výhodou virozomů je jejich univerzálnost a plasticita. Jejich složení a přípravu lze zvolit dle požadovaných vlastností. V současnosti je nejpoužívanějším systémem virozom chřipky (IRIV), který obsahuje proteiny hemagglutininu (HA) a neuramidinázy zachycené v lipidové membráně. Je součástí licencovaných vakcín proti chřipce (Nasalflu, Inflexal, Inviac) nebo hepatitidě A (Epaxal) [1; 5; 7; 40].

Mezi virozomy patří také adenovirové obaly, které se v současné době používají například ve vakcínách proti viru Covid-19 nebo viru Ebola. Původně byly zkoumány jako nástroje pro substituční léčbu, ale osvědčilo se jejich použití ve vakcínách [41]. Při použití samotné DNA nevykazovala vakcína potřebnou účinnost [42]. Adenoviry slouží jako vektory pro dodávku antigenu vakcíny [43] a neovlivňují genetickou informaci, kterou doručují. Vakcíny s adenovirem stimulují odpověď T lymfocytů i dostatečnou produkci protilátek [44]. Adenoviry (ADS) jsou neobalené DNA viry. Pro potřeby vakcín jsou upraveny tak, aby bylo zamezeno jejich množení v organismu a minimalizovalo se tak riziko vedlejších účinků [45]. Při výzkumech bylo studováno několik lidských sérotypů viru, avšak bylo zjištěno, že proti některým z nich, například proti lidskému adenoviru sérotypu 5 (AdHu5), má větší množství lidí v těle přítomné významné titry neutralizačních protilátek. I když studie zpočátku vykazovala slibné výsledky, vysoká prevalence AdHu5 by snižovala účinnost vakcín [41; 45]. Aby se obešla již existující imunita proti vektorům, zaměřil se výzkum nových adenovirů na ty, které mají u lidské populace nízkou séroprevalenci a jsou schopny vyvolat dostatečně kvalitní imunitní odpověď [45]. Šimpanzí adenovirus (ADC) představuje možné řešení tohoto problému. Má podobné vlastnosti jako lidské adenoviry, v těle vyvolává podobnou reakci B a T lymfocytů. Jeho výhodou je, že v populaci má velmi nízkou séroprevalenci a je možné je snadno kultivovat v lidských buněčných liniích [41]. Dle dosavadní studie je možné použití

adenoviru i v intranazálních vakcínách [46]. Šimpanzí adenovirus (ChAdOx1) je součástí vektorové vakcíny proti onemocnění COVID-19 od firmy AstraZeneca [47]. V této vakcíně je do adenoviru vložena pouze ta část genetické informace viru, která kóduje S-protein, díky kterému se může coronavirus dostat do těla. Genetická informace je zde uložena ve formě dsDNA. Na podobném principu jsou založeny i vakcíny proti viru ZIKA nebo HIV, které jsou zatím v klinických zkouškách [47].

Freundovo adjuvans je historicky jedním z nejdůležitějších adjuvans. V klinické praxi se však nepoužívá kvůli své vysoké reaktivitě a tvorbě cyst v místě vpichu. Při jeho použití v testech nebyla zajištěna ani dostatečná stabilita antigenu. Nebyl u něj zcela znám jeho mechanismus působení. Používá se ale hojně při experimentech, při imunizaci zvířat a výrobě protilátek. Z jeho složení vychází jiná, dnes zcela běžná adjuvans [48; 49]. Inkompletní Freundovo adjuvans (IFA) obsahovalo jen emulzi vody v oleji. Kompletní Freundovo adjuvans (CFA) obsahovalo kromě emulze minerálního oleje i mrtvé mykobakterie (*Mycobacterium tuberculosis*), které mají schopnost nespecificky stimulovat odpověď T lymfocytů [39].

Časová osa na obrázku 3 zobrazuje historii vývoje adjuvans. AS02 je v dnešní době již součástí některých vakcín schválených pro klinickou praxi, například vakcín proti malárii.



Obrázek 3 Přehled vývoje adjuvans. Převzato z [1]

5.1.2. Princip působení vybraných adjuvans

Protože jde o velmi rozmanitou skupinu látek s různými mechanismy účinku, liší se i použití jednotlivých adjuvans (tabulka 2). Některá působí jako imunitní potenciátory, jiná jako doručovací systémy. Některá adjuvans jsou vytvořena kombinací jiných adjuvans, ve snaze

zajistit co nejsilnější imunitní odpověď a dostatečnou imunologickou paměť. Příkladem je AS04.

Většinou platí, že ta adjuvans, která se běžně používají v subkutánní a intramuskulární vakcinaci, většinou nelze použít ve vakcínách aplikovaných přes sliznici a naopak. Je to z důvodů rozdílných podmínek v místě aplikace vakcíny. Například soli hliníku (Alum) nemůže být použito v intranazálních vakcínách kvůli velikosti svých částic. Ta se pohybuje kolem 1 μm a představovala by problém při přechodu přes sliznice [13].

Tabulka 2 Příklady používaných adjuvans. Převzato a upraveno z [2]

označení Adjuvans	Popis	Mechanismus působení	Klinická aplikace
Soli hliníku	Hydroxid hlinitý, fosfát hlinitý	indukuje odpověď T_H2	HBV, HPV, záškrt a tetanus
AS01	Liposom	stimuluje produkci cytokinů a kostimulačních molekul	Malárie
AS02	Emulze oleje ve vodě (obsahuje monofosforylový lipid (MPL) a QS-21)	Indukuje odpověď CD8 a CD4 T buněk i protilátek	Malárie
AS03	Emulze oleje ve vodě (obsahuje squalen, polysorbát a tokoferol)	tvorba cytokinů a chemokinů ve svalech, vyvolává migraci monocytů	Pandemická chřipka
AS04	MPL přichycen na hlinitou sůl	Aktivuje TLR4, stimuluje produkci cytokinů a T lymfocytů	HBV, HPV
MF59	Emulze oleje ve vodě	regulace zánětlivých cytokinů a chemokinů, nábor APC	Sezónní a pandemická chřipka
virozomy	Lipidový vesikul obsahující inaktivované virové proteiny	zvyšuje titer protilátek	Chřipka, hepatitida A

5.1.3. Soli hliníku

Soli hliníku (Alum) jsou nejstarší a dodnes jedny z nejpoužívanějších adjuvans díky své širokospektrální schopnosti posílit imunitní systém. Zahrnují síran draselno-hlinitý, fosfát hlinitý a hydroxid hlinitý. Poměrně dlouhou dobu nebyl přesně znám jejich mechanismus účinku. Původně se mělo za to, že pouze zadržují antigen a vytvářejí jeho depo kolem místa vpichu. Tato myšlenka ale byla vyvrácena několika laboratorními pokusy, kdy bylo místo vpichu krátce po injekci odstraněno a výsledek imunizace byl podobný [3; 7]. Dnes se má všeobecně za to, že efekt úložiště, díky kterému si antigeny udržují fyzikální a chemické vlastnosti, má svůj význam, ale není to hlavní mechanismus působení. Dalšími vlastnostmi adjuvans tohoto typu jsou pro-fagocytární, zánětlivé účinky a také přispívá k tvorbě protilátek. Tento druh adjuvans nepoužívá TLR receptory k aktivaci vrozené imunity [1; 7; 10; 50].

Po aplikaci dochází k lokální zánětlivé aktivaci neutrofilů prostřednictvím chemokinů a makrofágů. Makrofágy jsou na přítomnost adjuvans v organismu velmi citlivé, dochází k aktivaci těchto buněk (pro-fagocytární účinek) a to vede k lepší imunologické odpovědi. Spuštění zánětlivých procesů podporuje produkci prozánětlivých faktorů, hlavně cytokinů IL-1 β a IL-18 [3; 10; 50]. Dalším důležitým faktorem je podpora diferenciac dendritických buněk. Ty jsou nejdůležitější částí buněk prezentujících antigen (APC) a důležitou složkou imunity [50].

V těle také dochází k adsorpci a agregaci antigenů na povrchu, ale i uvnitř částic adjuvans. Tyto částice poté nabízejí antigen buňkám imunitního systému, a to primárně APC, které antigen vyhodnotí jako cizorodou látku, fagocytují ji a na svém povrchu pomocí molekul MHC II vystaví její antigeny. Tato adjuvans dále podporují interakci buněk imunity s APC a větší imunitní odpověď [50]. Na APC se může vázat T lymfocyt, který se dále může diferencovat v T_H lymfocyt (CD4⁺) nebo T_C lymfocyt CD8⁺) [3]. Diferenciace probíhá spíše ve prospěch T_H2 [6; 10]. Vyvolání robustní tvorby protilátek je zajištěno indukci T_H2 buněk, které vznikají v důsledku uvolňování IL-4 nahromaděnými eozinofily. Buňky T_H2 zprostředkovávají diferenciaci B lymfocytů na plazmatické a paměťové buňky a tím je zajištěna tvorba protilátek třídy IgM, IgG1, popřípadě i IgE [51]. U slizničních systémů se tvoří i protilátky třídy IgA [3].

Tento typ adjuvans může aktivovat i komplementový systém, není ale zatím přesně známo, jakým způsobem. Stále probíhají studie s cílem objasnit přesný mechanismus účinku tohoto adjuvans [10].

Hliníkové soli jsou také používány při vývoji nových adjuvans, například AS04, kde fungují jako nosiče pro agonista TLR. Pokud se používají jako adjuvans, je dosaženo zvýšené antigenově specifické, dlouhotrvající humorální imunitní reakce [5; 8; 52].

5.1.4. MF59

Princip působení tohoto adjuvans je dnes znám dobře. Antigen může s adjuvans tvořit komplexy, které jsou z místa vpichu odstraněny poměrně rychle. Dochází ke komplexní odpovědi imunitního systému. V místě imunizace se tvoří lokální zánět, dochází k indukci cytokinů (hlavně IL-5) a chemokinů (MCP-1) [10]. Interleukin 5 je důležitý zejména pro proliferaci a diferenciaci eozinofilů a T lymfocytů. Do místa vpichu se díky tomu dostávají neutrofilů, eozinofilů i monocytů. Dále dochází k diferenciaci monocytů na dendritické buňky a k transportu antigenu do lymfatických uzlin. Při experimentu došlo k odstranění antigenu i adjuvans z místa vpichu během několika hodin. To znamená, že se zde nevytváří depo antigenu. MF59 tedy podporuje aktivaci a migraci T lymfocytů a APC (hlavně monocytů a makrofágů). Aktivace CD4 T lymfocytů vede ke zvýšené odpovědi B lymfocytů a k tvorbě specifických protilátek hlavně třídy IgG [6]. Odpověď imunitního systému je vyváženější, antigen je buňkami lépe přijat. Aby bylo dosaženo tohoto účinku, je třeba, aby adjuvans bylo kompletní, protože jednotlivé složky adjuvantní účinek nemají. Ve srovnání s jinými adjuvans používanými ve vakcínách proti chřipce bylo dosaženo vyšší tvorby specifických protilátek [29; 36].

5.1.5. AS01

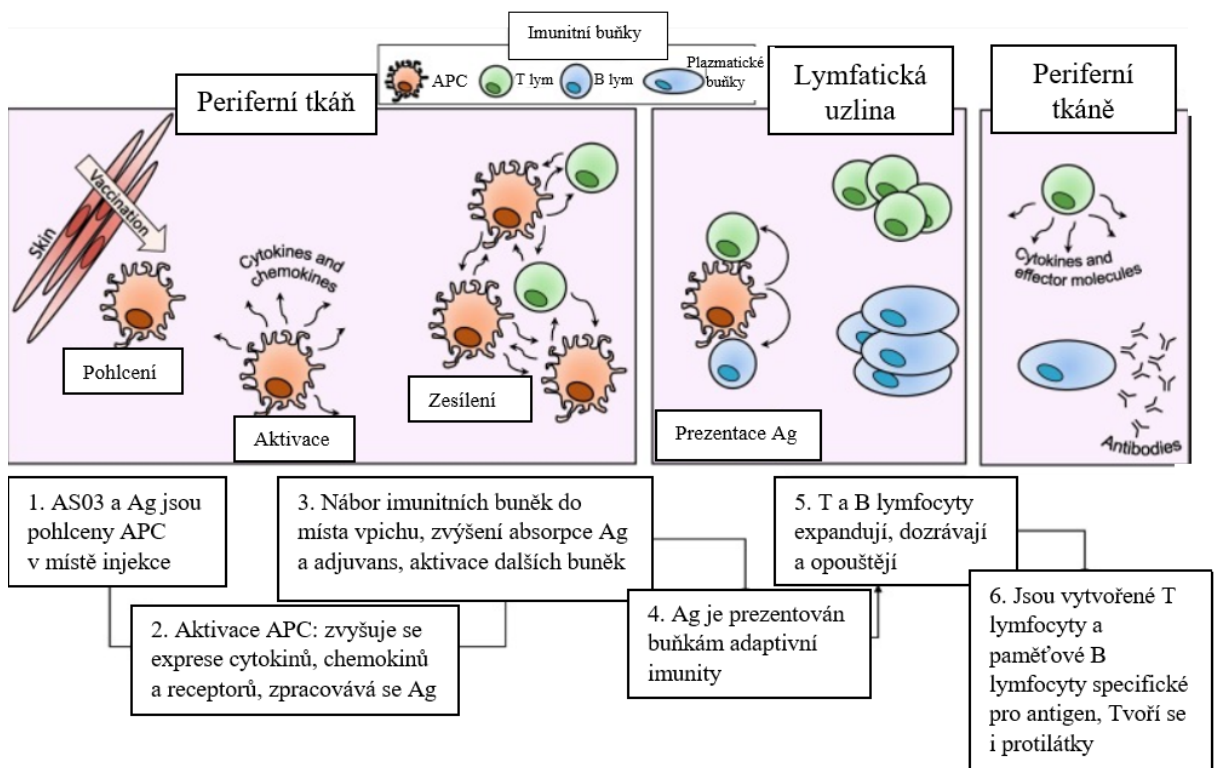
AS01 obsahuje dvě látky, které slouží jako potenciátory imunitního systému. Celý mechanismus je založen na synergickém působení obou látek. Díky tomuto adjuvans dochází k výraznější indukci buněčné imunity [53]. MPL je lipopolysacharid gram negativních bakterií, který se získává ze *Salmonella Minnesota*, je to agonista TLR4. Jde o netoxický LPS. V dnešní době se díky svým vlastnostem často využívá jako adjuvans [32]. Aktivuje APC (hlavně dendritické buňky), produkci cytokinů, hlavně INF- γ , IL-18, IL-12 a dalších kostimulačních molekul. Interleukiny podporují vyžívání T_H1 lymfocytů. Také může aktivovat dráhu NF- κ B [33; 53].

Saponin je přírodní látka. Dle zatím známých hodnocení by měl mít schopnost podporovat protilátkové odpovědi a odpovědi CD8⁺ (T_C lymfocytů).

Adjuvans tedy spouští zánětlivou reakci, odvod buněk s antigenem do lymfatických uzlin (antigen není zadržován v místě, adjuvans nemá efekt úložiště). Mechanismus ale stále není zcela pochopen [32].

5.1.6. AS03

Složení i mechanismus působení je podobný jako u MF59. Po aplikaci vakcíny dochází v místě vpichu k zánětu, aktivaci vrozené imunity a po sérii reakcí i k aktivaci adaptivní imunity. Umožňuje dostatečně silnou odpověď T lymfocytů i pro virové proteiny s nízkou imunogenicitou [54]. Mechanismus je shrnut na obrázku 4.



Obrázek 4 Princip působení AS03. Převzato z [54].

5.1.7. AS04

Tento typ adjuvans je kombinací mezi imunitními potenciátory a doručovacími systémy. Je složen z agonisty TLR, přesněji z TLR 4. Ten je přichycen na hlinitou sůl, která slouží jako nosič a doručovatel. Díky použití agonistů TLR je zajištěna vysoká antigeně specifická buněčná i humorální imunita. Po aplikaci vakcíny s tímto adjuvans dochází k lokální aktivaci dráhy NFκB, k produkci cytokinů (IL-6) a aktivaci vrozené imunity. Interleukin 6 je zodpovědný za systémovou zánětlivou odpověď a za rozvoj T i B lymfocytů. Cytokiny jsou

zodpovědné za zrání APC. Do místa se shromažďují monocyty, dendritické buňky, pohlcují antigen a shromažďují ho v lymfatické uzlině. Také dochází k aktivaci T lymfocytů (T_H1 i T_H2). Hlinitá sůl zajišťuje prodloužení cytokinové reakce [5; 38].

5.1.8. Virozomy

Virozomy jsou založeny na lipidových kapénkách. Ve vodném prostředí tvoří lipidové dvouvrstvy. Ty mohou následně tvořit micely, které uvnitř uzavírají vodný roztok a na jejich povrch se naváže antigen. Virozomy takto napodobují viry a reakce imunitního systému je podobná přirozenému setkání s virovými agens. Interagují s APC, vyvolávají endocytózu. Celý proces vede k aktivaci CD8 a CD4 T buněk a tím k produkci cytokinů [10; 3].

5.1.9. Adenoviry

Adenoviry jsou virové částice velmi podobné virozomům. Jsou vysoce imunogenní, stimulují vrozenou i adaptivní imunitní odpověď. Používají se jako dopravní systémy antigenu ve vektorových vakcínách, které mají zároveň výborné adjuvantní vlastnosti. Po aplikaci vakcíny dochází k aktivaci systému prostřednictvím PAMP. Dochází k produkci prozánětlivých cytokinů IL-6, IL-12 a TNF- α . Dále dochází k pohlcení adenovirů APC (hlavně dendritickými buňkami a makrofágy), tím se dostane dsDNA, obsažena v adenoviru, do jádra buňky, kde je vytvořena RNA a podle ní S-proteiny, které jsou vystaveny na povrchu buňky. Buňky takto informují organismus o struktuře antigenu. APC se dostávají do lymfatické uzliny, kde dochází k aktivaci T_H lymfocytů (CD4+) ale také T_C lymfocytů (CD8+ lymfocytů), které jsou zodpovědné za specifickou buněčnou imunitu. Ve svých granulech T_C buňky obsahují perforiny a granzymy. Perforiny poškodí membránu buňky, vytvoří se v ní otvory a poté dojde k její likvidaci. Také produkují IFN γ [41; 43; 44]. Jde o prozánětlivý interferon, který je důležitý pro aktivaci makrofágů. Dále dochází k aktivaci B lymfocytů, jejich přeměně na plazmatické buňky a produkci specifických protilátek třídy IgG [46]. V případě vektorové vakcíny proti viru COVID-19 od firmy AstraZeneca jsou to specifické protilátky proti spike proteinu.

Nízká prevalence šimpanzího adenoviru v lidské populaci bude platit jen při první aplikaci vakcíny. To znamená, že pokud se šimpanzí adenovirus použije ve vakcínách proti covid-19, už nebude možné jeho použití v jiných vakcínách, protože na něj bude mít lidský organismus připravené protilátky. Proto je třeba hledat a vyvíjet stále nové adenoviry.

5.1.10. Výhody a nevýhody použití adjuvans

Mezi hlavní výhody adjuvans patří snížení nákladů na výrobu vakcíny. Výroba antigenů může být poměrně nákladná. Při použití adjuvans je možné snížit množství antigenu ve vakcíně při zachování její imunogenity. Adjuvans, hlavně ta na bázi solí hliníku, mají oproti antigenům relativně nízké náklady na přípravu a snadnou dostupnost.

Vzhledem k tomu, že adjuvans mají různé mechanismy působení a každé aktivuje buňky imunitního systému jinak, indukují vznik různých cytokinů. Je tedy možná určitá modulace imunitní odpovědi [10].

Určitý problém může představovat složení některých adjuvans. Jejich vliv na lidský organismus je pečlivě sledován, a i když je známo poměrně velké množství látek s adjuvantními účinky, pro klinickou praxi je schváleno jen malé množství. Tato adjuvans prošla přísnými klinickými testy a jejich používání ve vakcínách nevykazuje závažné vedlejší účinky. Přesto jsou adjuvans obsahující hliníkové soli poměrně dost diskutována a jejich používání ve vakcínách má řadu odpůrců [50]. Řeší se primárně cytotoxicita hydroxidu hlinitého. Hliníkové částice jsou schopné překonávat hematoencefalitickou bariéru a dostat se do mozku. Způsobují tak zánětlivé reakce. Hliník je také jednou z možných příčin Parkinsonovy choroby, roztroušené sklerózy, Alzheimerovy nemoci nebo neurologických poruch u dětí [39]. Limit pro množství hliníku v adjuvans je stanoven na nejnižší možnou hladinu, která již zaručuje adjuvantní účinky a pro pacienta je bezpečná a nezpůsobuje cytotoxicitu. Vakcíny obsahující tyto soli vykazují dostatečnou bezpečnost. I když v ojedinělých případech může docházet k nežádoucím účinkům [50]. Problémem je, že hliník zůstává v těle 8-11 let po vakcinaci a v kombinaci s hliníkem, který bývá přítomen v potravě, může dojít k rozvinutí chronického zánětu a některých chorob [39]. Výhody i nevýhody jednotlivých adjuvans používaných ve vakcínách proti chřipce jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3 Výhody a nevýhody adjuvans používaných ve vakcínách proti chřipce. Převzato a upraveno z [5]

Adjuvans	výhody	nevýhody
Hliníkové soli	menší toxicita, zlepšený příjem antigenu, zvýšení imunitní odpovědi	nevyvolává odpověď T _H 1 buněk, neúčinné se slabými Ag
Emulze oleje ve vodě	vyvolání silnější imunitní odpovědi (humorální i buněčné), efektivní i s méně imunogenními Ag	vysoce lokální reaktivita, může vyvolat autoimunitní choroby
Virozomy	vhodné pro široké věkové skupiny, bezpečný, dlouhodobé protilátkové odpovědi	problém s výrobou, konzervací, v krvi nejsou dostatečně stabilní

Kromě již zmíněného může být další nevýhodou i injekční podání vakcín obsahujících tato adjuvans. Aplikace je složitější než například při perorálním podání. Pro aplikaci je třeba proškolený personál. Místo vpichu je třeba dezinfikovat, aplikovat látku sterilní jehlou a použité jehly poté náležitě zlikvidovat. To v některých zemích může představovat problém, protože by mohlo dojít ke kontaminaci jehly a následnému nakažení pacienta, popřípadě zdravotnického personálu. Dále je aplikace spojena s bolestí v místě vpichu [12]. Výhodnější je proto použití vakcín aplikovaných neinvazivní cestou přes sliznici, hlavně perorálně a intranazálně.

Také je třeba hlídat teplotu při skladování vakcín. Většina injekčně aplikovaných vakcín vyžaduje uložení při teplotách 4-8 °C, některé vyžadují teploty až několik stupňů pod nulou. Tyto teploty je třeba hlídat, protože jakékoli jejich výkyvy by mohly vakcíny poškodit [12]. Příkladem mohou být vakcíny obsahující adjuvans na bázi hydroxidu hlinitého, které nemohou být skladovány zmrazené, protože by došlo k poškození struktury antigenů (teplota při skladování by proto neměla klesat pod 2 °C). Nebo v současné době používaná RNA vakcína proti onemocnění COVID-19, která musí být dlouhodobě skladována při teplotě -70°C. Toto představuje problém při transportu vakcín, kdy dochází k teplotním výkyvům nejnáze. Náklady na přepravu jsou hlavně z těchto důvodů vyšší a tím se zvyšuje i cena za dávku vakcíny.

Z výše uvedených důvodů by bylo snazší a bezpečnější použití intranazálních a perorálních vakcín, zejména v rozvojových zemích.

5.1.11. Nově vyvíjená adjuvans

Díky porozumění funkcím vrozené imunity mohla být zkoumána nová adjuvans. Hlavním důvodem zkoumání nových adjuvans je odstranění nedostatků adjuvans na bázi hydroxidu hlinitého a emulze oleje ve vodě. Tato adjuvans jsou sice schopna stimulovat vývoj buněk T_H2 a vyvolat dostatečně silnou protilátkovou odpověď, ale obvykle vyvolávají jen slabou odezvu T_H1 a buněčnou odpověď [55]. Cílem studií je hlavně zlepšení složení, jejich modifikace. Zkoumanými látkami jsou např. nanočástice na bázi kyseliny nebo kompozitní adjuvans. Dále také cytosolové nukleové kyseliny, cytokiny a chemokiny [5; 50].

Kromě nových adjuvans je snahou najít i jejich optimální směs, která by se dala použít například ve vakcínách proti rakovině. V tomto případě by ideální adjuvans kombinovalo schopnost stimulovat křížovou prezentaci antigenu DC a optimální odpověď CD8 T lymfocytů (cytotoxických lymfocytů). Zároveň by mělo být schopné prodloužit expozici antigenu imunitnímu systému. Poslední studie naznačují, že kombinace TLR ligandů se saponiny by mohla být dostatečně účinná a bezpečná pro použití v klinické praxi [2].

Saponiny jsou látky přírodního původu, byly vyextrahovány z kůry jihoafrického stromu [2; 33]. Jde o rostlinné glykosidy odvozené od terpenů (jsou to triterpenové glykosidy). Dle dosavadních studií stimulují velmi silnou vrozenou i adaptivní buněčnou imunitu i humorální imunitu s tvorbou dostatečného množství IgG. Výhodou je stimulace vyvážené odpovědi buněk T_H1 i T_H2 . Nejspíš má schopnost aktivovat produkci IL-18 a INF- γ [32].

Studie funkce saponinu ukázala, že má schopnost indukce silné odpovědi T_C lymfocytů (CD8+ buněk). Po aplikaci totiž dochází ke zkřížené prezentaci antigenu na povrchu dendritických buněk. Exogenní antigeny jsou tak prezentovány na MHC I. třídy (za běžných okolností jsou exogenní antigeny prezentovány na MHC II. třídy). Tento mechanismus vede k odpovědi T_C lymfocytů [55]. Jak přesně stimuluje saponin zkříženou prezentaci není jasné.

Doposud byly používány hlavně ve veterinární praxi, ale díky svým dobrým adjuvantním vlastnostem a zdravotní nezávadnosti začalo být studováno jejich použití i v klinické praxi [55]. Saponiny jsou například součástí adjuvans AS01, AS02.

5.2. Imunizace prostřednictvím slizničních povrchů

Slizniční povrchy jsou několikanásobně větší než povrch kůže, jejich plocha je více než 400 m² [56]. Spadají sem slizniční povrchy dýchacích cest, střev, spojivky oka, močových cest a genitálního traktu [12]. Přes sliznice se tak do těla může dostat velké množství patogenů, proto se velká část buněk imunitního systému nachází pod slizničními povrchy a vytváří zde specifický systém tzv. MALT. Tento slizniční imunitní systém představuje největší část imunitního systému. Organismus chrání mechanismy specifické i nespecifické imunity. MALT lze rozdělit na další systémy. Systém GALT – slizniční systém spojený s trávicí soustavou, jehož součástí jsou lymfatické uzliny a Peyeroovy pláty, systém NALT – slizniční systém spojený s lymfoidní částí nosu a systém BALT spojený se sliznicemi dýchacích cest (průduškami) [12; 56; 57]. Přestože se od sebe jednotlivé slizniční imunitní systémy odlišují jsou brány a označovány dohromady jako jednotný slizniční imunitní systém. Systémy jsou propojené nejen mezi sebou navzájem ale i se systémovou imunitou [3].

Prostřednictvím sliznic lze tedy modulovat nejen slizniční, ale i systémovou imunitu. Na rozdíl od vakcín, které se podávají parenterálně. Ty sice vyvolávají silnou systémovou imunitní odpověď, ale ve většině případů nevyvolávají dostatečnou slizniční imunitní odpověď [13]. Při porovnání parenterální a intranazální aplikace inaktivované vakcíny proti chřipce A (H5N1) bylo zjištěno, že po parenterální aplikaci se pouze malé množství protilátek třídy IgG usadí na sliznici a nestačí k jejich ochraně [58]. Zatímco po intranazální aplikaci byly sliznice chráněny přítomností protilátek IgA, v séru byly přítomny i protilátky IgG. Vakcíny tak snižují riziko těžkého průběhu onemocnění, ale nestačí na dostatečnou ochranu před infekcí virem [58]. Vakcinace prostřednictvím slizničních povrchů je navíc bezpečnější než parenterální podání. Také její podání je mnohem jednodušší a vhodnější pro podání velkému množství pacientů při pandemických situacích [13]. Vždy je ale třeba zvážit výhody vakcinace a její potenciální rizika [57].

Slizniční vakcíny jsou dodány přímo na slizniční povrch a jsou velmi rychle zpracovány přítomnými buňkami [12]. Rozumí se tím hlavně nazální, perorální, sublingvální a vaginální podání. Některé vakcíny mohou být podány i prostřednictvím očních kapek, například vakcína proti *Mycoplasma gallisepticum*, tato forma podání je dokonce účinnější než intranazální nebo perorální podání [59]. Vakcíny by měly způsobit vhodnou odpověď imunitního systému, nemělo by docházet k alergické reakci, zánětu či poškození tkáně. Imunizace touto cestou má velké množství výhod a účinek je podobný jako u parenterálního podání vakcíny [3; 23]. Nespornou výhodou je indukce imunitní odpovědi na slizničním povrchu i systémové imunity. Injekčně aplikované vakcíny indukují pouze systémovou imunitu. Při subkutánní aplikaci

vakcíny proti chřipce nebylo zabráněno samotné infekci [59]. Sliznice nejsou dostatečně chráněny před vstupem patogenu a představují možné místo vstupu. Díky slizničním vakcínám jsou sliznice na vstup patogenu připraveny a chráněny, hlavně před viry jako jsou chřipkové viry a rotaviry [59].

I když tyto vakcíny mají velké množství výhod a v posledních letech se jim věnovalo mnoho pozornosti, v klinické praxi se jich používá jen velmi málo [60]. V současné době existuje pouze sedm slizničních vakcín [61]. Jedním z důvodů je potřeba adjuvans, která jsou vhodná pro specifické slizniční prostředí. Dalším důvodem je slizniční tolerance, rychlá neutralizace a odstranění vakcíny ze sliznice tělesnými tekutinami (slinami, trávicími šťávami aj.) [13]. Například vakcíny podávané perorálně musí být schopny odolávat podmínkám v žaludku a trávicím traktu a neztratit svoji funkci [62].

Dnes běžně používané, licencované perorální a intranazální vakcíny, obsahují živý oslabený virus nebo celý, usmrcený virus a adjuvans. Jsou to vakcíny proti choleře, tyfu, chřipce, rotaviru a poliomyelitidě [63] V budoucnu by se měly, z důvodu vyšší bezpečnosti, používat spíše přečištěné antigeny [62].

5.2.1. Slizniční imunita

Sliznice představuje v těle důležité místo pro výměnu plynů a příjem látek z potravy. Je ale také vystavena působení škodlivin z potravy i vzduchu a je také hlavním místem pro vstup infekce [3; 56]. Proto je slizniční imunitní systém důležitou částí imunitního systému. Slizniční imunitní systém se vyvíjí během života jedince. Nejdůležitějším obdobím pro vývoj je ale období intrauterinního vývoje, a také kojenecké období, ve kterém se organismus setkává s množstvím patogenů a dochází k vytvoření individuální slizniční imunity [3].

Jednou ze složek obrany jsou epiteliální buňky, které představují přirozenou bariéru pro pronikání patogenů. Při poškození jsou schopny velmi rychlé obnovy z kmenových buněk. Buňky epitelu jsou také schopné podílet se na obranyschopnosti organismu. Po aktivaci jsou schopny buňky produkovat antimikrobiální peptidy – denziny α a β , dále společně s buňkami imunity tvořit interferony I. a III. třídy, a proto jsou významnou složkou protivirové ochrany [3]. Epiteliální buňky kromě produkce hlenu se mohou na obraně podílet i pohybem řasinek. Imunitní systém by měl fungovat tak, aby bylo zamezeno vstupu patogenů do epiteliálních buněk nebo do vrstvy pod sliznicí, kde by došlo k jejich namnožení a následnému šíření organismem [23; 56]. Kromě epiteliálních buněk jsou do obrany zapojeny i složky nespecifické imunity, které brání adhezi patogenů na jejich povrch. Patří sem muciny, které jsou produkovány pohárkovými buňkami [3].

Velmi důležitou vlastností slizniční imunity je schopnost rozlišit patogenní organismy od ostatních struktur, jako jsou složky potravy nebo od vlastních organismů, které jsou fyziologicky přítomné, například střevní mikroflóra. Pokud slizniční imunitní systém neumí rozlišit patogeny od složek potravy, vede to k potravinovým alergiím [3].

MALT se skládá z organizovaného lymfatického systému (o-MALT), který vytváří lymfoidní folikuly v epitelové vrstvě i pod ní a slouží k indukci imunitní reakce. Druhou složkou je difuzní lymfatický systém (d-MALT), který je tvořen imunokompetentními buňkami rozprostřenými v lamina propria [3].

Organizovaná část je tvořena APC přítomnými na povrchu epitelových buněk i pod nimi. Jsou zde hlavně dendritické buňky a makrofágy. Antigen se k nim dostává prostřednictvím M-buněk (membránové epitelové buňky), které jsou typické pro sliznici tenkého střeva. Tyto buňky jsou schopny antigen aktivně transportovat z lumen střev do lamina propria, do oblasti Peyerových plátů. Zde se nachází velké množství buněk imunity [3]. Antigen je buňkami pohlčen a předán APC (hlavně dendritickým buňkám a makrofágům), které ho zpracují, předloží T_H1 a tyto lymfocyty indukují vznik cytokinů, aktivují komplement a zánětlivou reakci. Antigen je také předkládán T_H2 buňkám a dochází k aktivaci B lymfocytů i T lymfocytů, jejich migraci do lymfatických uzlin, odkud poté migrují na ostatní povrchy sliznic [64]. Diferenciace B lymfocytů je také podpořena makrofágy, které produkují cytokiny TGF- β , IL-10 a IL-4 [12].

Dochází k přeměně B lymfocytů na plazmatické buňky a produkci protilátek [3]. Slizniční protilátky jsou hlavně typu IgA (IgA1 a IgA2), v menší míře jsou přítomny protilátky třídy IgG dále i IgM (ve větší míře jsou tyto protilátky tvořeny v tonsilách) [23; 12; 56]. Protilátky IgA jsou vylučovány na bazolaterální straně epitelových buněk a poté jsou transportovány na slizniční povrch do lumen transcytozou [12]. Mají schopnost neutralizovat přítomné viry a bakterie, popřípadě inhibovat aktivitu některých bakteriálních enzymů [23; 56].

Migrační aktivita lymfocytů závisí na místě indukce a jejich pohyb do cílového místa je zajištěn specifickými chemokiny. Pokud dojde k indukci a aktivaci ve sliznici nosu, dutiny ústní nebo v oblasti bronchů, migrují do slinných a slzných žláz a do bronchů. Při aktivaci v Peyerových plátech migrují do sliznice tenkého střeva. Při indukci v oblasti apendixu migrují B lymfocyty do sliznic tlustého střeva a u žen i do sliznice pohlavních orgánů. U kojících žen migrují B lymfocyty z oblasti dýchací a trávicí soustavy do prsní žlázy. Při kojení se tak do těla dítěte dostanou důležité specifické protilátky IgA, růstové faktory a cytokiny, které jsou obsaženy v mateřském mléce [3].

Slizniční imunita představuje velmi důležitý obranný mechanismus a spolu se systémovou imunitou tvoří komplexní systém. Obě složky se od sebe ale mírně liší. Hlavními odlišnostmi slizniční imunity od systémové imunity je přítomnost protilátek třídy IgA, osidlování sliznic B a T lymfocyty a tolerance střevní mikroflóry [56; 64].

5.2.2. Způsoby podání vakcíny

Imunizace prostřednictvím sliznic představuje velmi efektivní a neinvazivní cestu očkování. Výhodou může být způsob podání, ke kterému není třeba injekční jehly. Perorální podání vakcín je rychlé a jejich způsob podávání je velmi snadný, takže by při epidemiích mohly představovat určitou výhodu [23]. Očkovací látky se vyrábí ve formě sprejů, kapek, nápojů, tabletek nebo čípků.

5.2.2.1. Perorální podání

Nejčastěji se očkovací látka podává perorálně (ústí) a do těla se dostává přes sliznice trávicí soustavy – hlavně v tenkém střevě. Perorálně podávané vakcíny byly zavedeny před více jak 65 lety [57]. Cílovými buňkami jsou M-buňky (Peyerovy pláty). Většinou je látka podávána ve formě kapek, popřípadě tablet nebo perorálních fólií [13]. Takto se podávají živé oslabené vakcíny proti rotavirům, poliovirům, *Salmonella typhi*, a inaktivovaná vakcína proti *Vibrio cholerae*.

5.2.2.2. Sublingvální a bukální podání

Další způsob podání může být rozdělen ještě na sublingvální (podjazykové) a bukální. Bukální vakcíny se vstřebávají přes sliznici dásní, tváří a vnitřních rtů [13]. Tyto oblasti jsou tvořeny nerohovějícím dlaždicovým epitelem a jsou vhodné pro podávání vakcíny. Epitel je složen ze tří vrstev – bazální vrstvy, mezivrstvy a povrchové vrstvy. Důležitá je mezivrstva, která obsahuje Langerhansovy buňky (LC). Tyto buňky patří mezi APC a jsou důležité pro indukci imunitní reakce. Další důležité APC jsou myeloidní dendritické buňky (mDC) a plazmocytoidní dendritické buňky (PDC). V případě tohoto podání vakcína cílí na LC buňky [13]. Výhodou tohoto podání je, že nedochází k degradaci vakcíny žaludečními šťávami a enzymy. Je ale třeba vzít v úvahu vliv slin (hlavně pH) [13].

Při sublingválním podání je vakcína dávkována ve formě kapek nebo sprejů pod jazyk. Bývají takto aplikovány i některé léky, například nitroglycerin při bolestech na hrudi a podezření na anginu pectoris. Tato cesta je také využívána při specifické alergenové terapii,

kdy se alergikům podávají alergeny s cílem vytvoření tolerance vůči alergenům [65]. Při vakcinaci je vakcína vstřebávána sliznicí na dolní straně jazyka a sliznicí dutiny ústní pod jazykem. Tato oblast je velmi dobře prokrvena, nachází se zde Langerhansovy buňky, které jsou schopny antigen přemístit do lymfatických uzlin [65]. Proto je sublingvální oblast vhodná pro podání vakcíny. Látky aplikované touto cestou mají většinou velkou viskozitu, která zajišťuje větší retenci látky pod jazykem [13]. Aplikovat se mohou ve formě gelů, sprejů, tablet nebo tenkých filmů. Používané tablety se mohou skládat z více vrstev, každá může mít jinou funkci a je zajištěno postupné uvolňování očkovací látky [13].

Sliznice úst představuje vhodné místo pro imunizaci. Výhodou je neinvazivní cesta podání a silná imunologická odpověď. Aplikace je bezpečnější než u intranazálního podání, protože antigen není směřován do CNS [63].

5.2.2.3. Intranazální podání

Další možností je nazální podání vakcíny ve formě spreje prostřednictvím sliznice nosu. V posledních letech bylo zkoumány i látky ve formě prášku [61]. Při intranazálním podání je dosaženo vyvážené a silné odezvy imunitního systému [12]. Pod respiračním epitelem nosní dutiny se nacházejí místní lymfatické uzliny. Cílovými buňkami při podání jsou M-buňky v NALT které transportují antigeny [13]. Antigeny se dostávají do APC jako jsou DC, makrofágy a také do B lymfocytů. DC poté aktivují T a B lymfocyty, které migrují do krevního oběhu a aktivují systémovou imunitu. B lymfocyty produkují slizniční protilátky IgA a systémové IgG [12]. Výhodou tohoto podání je nižší potřebná dávka pro imunizaci, dále absence trávicích enzymů a také zde není nízké pH. Vakcíny aplikované touto cestou nejsou vystaveny tak extrémním podmínkám jako vakcíny aplikované perorálně [12]. U některých antigenů je tato cesta úspěšnější. Aplikují se hlavně protivirové vakcíny. [3] Vakcíny jsou většinou ve formě aerosolu.

Intranazální cestou jsou podávány vakcíny obsahující oslabený chřipkový virus, které byly vyvinuty již v roce 2001. Jednou z nich byla vakcína Nasalflu, která obsahovala hemagglutiny ze tří kmenů chřipkového viru a LT jako adjuvans [12]. Při klinických studiích se ale po podání vakcíny objevily vedlejší účinky. Tím závažnějším byl rozvoj Bellovy obrny, která vznikla nejspíš v důsledku absorpce antigenu nebo adjuvans nervovými zakončeními ve tváři, to může vést k poškození neuronu. Následkem toho dochází k paralýze tvářových svalů. Bellova obrna je většinou dočasná a sama odeznívá do několika týdnů [66]. Po intranazální aplikaci vektorové vakcíny tvořené adenovirem a částí chřipkového viru

(hemagglutinin) nebylo pozorováno přenášení části viru nebo adenoviru do nervových zakončení a nebyl pozorován rozvoj Bellovy obrny [63].

V dnešní době existuje několik schválených intranazálních vakcín a další vakcíny jsou součástí klinických testů. Licencovaná je vakcína proti sezónní chřipce FluMist obsahující živý oslabený virus (schválen v roce 2003) [12; 61]. Další schválenou vakcínou proti chřipce je Nasovac-S (schválena roku 2010) [61]. Klinickým hodnocením zatím procházejí vakcíny MEDI-534, která kombinuje živý oslabený respirační syncytiální virus a virus parainfluenza. Další vakcínou je živá oslabená vakcína proti pertusi známá pod názvem BPZE1, a ještě vakcína Norwalk proti noroviru. Klinické studie těchto vakcín zatím ukázaly slibné výsledky [12].

Silná imunitní odpověď v nose velmi závisí na zvoleném adjuvans. Používají se interleukiny nebo bakteriální toxiny [57]. Při tomto způsobu imunizace lze pozorovat propojenost slizničního systému, protože po intranazálním podání vakcíny dochází k produkci protilátek IgA a IgG i na sliznici pochvy. Není ovšem znám mechanismus této migrace, a ani důvod, proč nevznikají protilátky v trávicím traktu [57].

I když představuje intranazální cesta výhodné místo pro aktivaci vakcíny, stále je zde mnoho otázek, které je třeba vyřešit. Pořád nebylo objasněno, které buňky přebírají antigen po aplikaci vakcíny, zda to jsou buňky NALT nebo specializované buňky v epitelu (DC) [57]. Zároveň se vyskytují obavy o bezpečnosti vakcín podaných intranazálně cestou. Důvodem je jejich podávání blízkosti mozku [12].

5.2.2.4. Další způsoby podání

Je možné podání vakcíny i prostřednictvím dýchacích cest. Sliznice plic mají ze všech sliznic největší povrch, na kterém může dojít ke vstřebání vakcíny. V tomto případě by byly indukčním místem M-buňky v BALT [13].

5.2.3. Používaná adjuvans

Tím, že jsou slizniční mechanismy schopny určité tolerance k některým antigenům, je možné, že by po podání vakcíny nebyla spuštěna odpověď imunitního systému. Proto jsou důležitou součástí většiny slizničních vakcín adjuvans, která zajišťují rozvoj lokální imunitní odpovědi [13]. Slizniční adjuvans musí odolávat vlivům z prostředí organismu, různým tekutinám (sliny, trávicí šťávy), pH. Musí být stabilní i v nepříznivých podmínkách.

Látek, které by mohly fungovat jako slizniční adjuvans, je velké množství. Pro klinické účely se jich zatím používá jen několik. Jedním z důvodů může být jejich toxicita nebo nedostatečné znalosti o jejich vlastnostech [67]. Většina těchto látek je předmětem studií.

I slizniční adjuvans mohou být rozdělena podobně jako adjuvans v parenterálních vakcínách na imunitní potenciátory (př. bakteriální toxiny) a doručovací systémy (viz tabulka 4). Mezi imunitní potenciátory patří agonisté PPR, které cílí většinou na TLR. Ukázali se jako možné perspektivy ve vývoji nových adjuvans [59].

Tabulka 4 Slizniční adjuvans. Převzato a upraveno z [59]

Klasifikace adjuvans	Složení	Cíl
Bakteriální adjuvans	Cholera toxin (CT)	Buněčné receptory
	Termolabilní toxin <i>E.coli</i> (LT)	Buněčné receptory
	<i>Bacillus antracie</i> toxin (EdTx)	Buněčné receptory
	Monofosforyl lipid A (MPLA)	TLR-4
	Petrusový toxin (PT)	Neznámý
Nukleové kyseliny	Oligodeoxynukleotid	TLR-9
	Kyselina polynosinová-kyselina polyeytidylová, polyI:C	TLR-3
Cytokiny	IL-1, IL-2, IL-4, IL-12, IL-18	Různé
	INF- α a INF- γ	Různé
Částice	Chitosan	
	Kyselina polyakrylová (PAA)	Neznámý
	Virové částice (VIP)	Neznámý

Nejsilnější a nejlépe prozkoumaná slizniční adjuvans jsou dva bakteriální enterotoxiny cholera toxin (CT) a termolabilní toxin *E. coli* (LT). Jsou součástí některých bukálních a sublingválních vakcín, většina vakcín ale nebyla schválena a provádějí se u nich preklinické studie. Zatím se ale jeví jako příliš toxický pro klinickou praxi (2019) [13; 63]. Cholera toxin je použit jako adjuvans ve vakcínách obsahujících antigeny chřipkového viru, HIV, proteiny různých druhů salmonel, popřípadě lyzát *Helicobacter pylori* nebo tetanový toxin [13]. V testech vykazovala tato adjuvans dobré výsledky a indukovaly diferenciaci T_H2 lymfocytů, silnou odpověď B lymfocytů a produkci vysokých titrů specifických protilátek IgG i IgA [59]. Velkým problémem a důvodem, proč tato adjuvans nejsou součástí slizničních vakcín

pro klinické použití je jejich toxicita. Mají schopnost způsobovat u lidí střevní potíže, popřípadě způsobit výskyt cholery [13; 59]. Tento problém se podařilo odstranit při použití geneticky modifikovaných enterotoxinů připravených laboratorně [13]. Jejich adjuvantní účinky byly zachovány, ale snížila se jejich toxicita a tím i riziko rozvoje vedlejších účinků. Používané, mutované enterotoxiny jsou mLT (jiným názvem R192G) a dmLT (R192G/L211A), tzv. dvojitý mutant. Adjuvans dmLT je například součástí bukální a sublingvální vakcíny obsahující pneumokokové buňky a při klinických testech vykazovala dobré výsledky. Je také součástí i další laboratorně testované vakcíny obsahující lyzát *Helicobacter pylori*. Vakcína vykazovala podobné účinky, jako vakcína obsahující cholera toxin, ovšem bez nepříjemných vedlejších účinků. Také byly zkoumány adjuvantní účinky B podjednotek cholera toxinu (CTB) i termolabilního toxinu (LTB). Tato podjednotka slouží bakteriím k přilnutí na povrch buněk. Toxiny mají ještě podjednotku A, která má enzymatickou úlohu [13]. Obě podjednotky jsou kovalentně spojeny [68].

Mezi imunitní potenciátory dále patří agonisté TLR. Mezi tato adjuvans patří monofosforyl lipid A (MPLA), FSL-1, Poly(I:C), Pam3CSK4, R848, cytosin-fosfát-guanosin (CpG), chitosan ve formě nanočástic.

Monofosforyl lipid A je složka endotoxinu bakteriálního lipopolysacharidu (LPS). Jeho výhodou je nižší toxicita a dostatečná stimulace imunitní odezvy.

Cytosin-fosfát-guanosin se používá hlavně při sublingvální a intranazální imunizaci. Je například součástí vakcíny obsahující proteiny salmonely (SPP).

Slizniční adjuvans (3',5') - cyklická kyselina diguanylová (c-di-GMP) se používá například v sublingvální vakcíně obsahující virozomy chřipky.

Polyinosinko-polycytidilová kyselina je synteticky vyráběná dsRNA, která představuje silný aktivátor imunitního systému [69].

R848 je poměrně nově zkoumaným adjuvans. Na zvířecích modelech se zkoumaly jeho účinky na imunitní systém po intranazálním a intradermálním podání vakcíny. Obě cesty podání vykazovaly při laboratorních testech slibné výsledky [70].

5.2.4. Princip působení slizničních adjuvans

Princip působení adjuvans do jisté míry závisí i na způsobu podání vakcíny. Pokud je podána perorálně, cílovými strukturami jsou Peyerovy pláty v tenkém střevě. Při sublingválním a bukálním podání jsou cílovými buňkami Langerhansovy buňky (LC) [13]. Při intranazálním podání zatím není zcela jasné, které buňky jsou cílovými buňkami [57]. Dle novější studie

z roku 2018 by ale po vakcinaci mohly antigeny pronikat nosní sliznicí do APC, popřípadě mohou být převzaty M-buňkami v NALT [61].

CTB

Cholera toxin patří mezi imunitní potenciátory, tzn. že stimuluje imunitní odpověď. Cholera toxin mobilizuje dendritické buňky, které se přesouvají do místa vpichu. Aktivované buňky následně migrují do lymfatických uzlin [63]. Mechanismus působení LT je podobný, ve vakcínách se ale kvůli své toxicitě nepoužívají.

Většinou jsou nahrazovány podjednotkou B. Pokud je podávána sublingválně stimuluje produkci IL-4 a INF- γ T_H lymfocyty (CD4+ buňkami). Interleukin 4 je důležitý pro rozvoj T_H2 a pro diferenciaci B lymfocytů v plazmatické buňky a produkci protilátek. Ty jsou hlavně třídy IgG a IgA. Dále také stimuluje rozvoj T_C lymfocytů (CD8+), které produkují INF- γ , důležitý prozánětlivý faktor [13].

LTA1

Kvůli své neurotoxicitě se ve vakcínách nepoužívá přímo termolabilní enterotoxin, ale jeho podjednotka A. Při studiích nevykazovala neurotoxicitu a u myši došlo po imunizaci vakcínou obsahující LTA1 ke zvýšení odpovědi na inaktivovaný antigen spojenou s následnou ochranou proti viru.

Při testech bylo zjištěno, že adjuvantní vlastnosti LTA1 jsou lepší než LT. Test byl proveden s chřipkovým antigenem (H1N1), který byl odebrán z komerční injekční vakcíny Fluzone a byl aplikován myším [68]. LTA1 podporuje rozvoj imunitní odpovědi specifické pro antigen. Jsou stimulovány APC, vyvíjí se T_H1, T_H17, T_H2. Pomocné lymfocyty T_H1 následně produkují INF- γ , IL-2, TNF α . Produkovány jsou i další cytokiny, př. IL-6, který je prozánětlivý a díky němu dochází k náboru dalších pomocných buněk, T_H17, nebo IL-22. Jsou produkovány protilátky IgG i IgA a odpověď imunitního systému je slizniční i systémová [68].

MPLA

U tohoto slizničního adjuvans mechanismus velmi závisí na způsobu podání. Při sublingválním podání nevykazuje dostatečnou účinnost. Při intranazálním, popřípadě při subkutánním podání bylo docíleno dostatečné imunitní odpovědi. MPLA funguje jako agonista TLR-4. Při aktivaci tohoto receptoru se spouští vnitřní signální dráha NF- κ B a produkce prozánětlivých cytokinů.

CpG

Oligodeoxynukleotidy jsou běžnou součástí membrány virů nebo bakterií. V těle jsou rozpoznávány TLR9 [59]. Cytosin-fosfát-guanosin také funguje jako imunitní potenciátor, má

silné imunomodulační účinky. Jde o agonistu TLR9. Stimuluje buňky k vyšší produkci INF- γ , IL-4, IL-5 a IL-6 [13]. Interleukin 4 stimuluje rozvoj protilátkové odpovědi. Interleukin 5 stimuluje růst eozinofilů, ovlivňuje B lymfocyty a tím i tvorbu IgA. Interleukin 6 je prozánětlivý cytokin, je zodpovědný za zvýšení teploty v organismu, růst linií T a B lymfocytů a vývoj T_H17 lymfocytů, jejichž hlavní funkcí je regulace zánětu.

R848

Resiquimod je adjuvans, které také patří mezi imunitní potenciátory. Je to imidazochinolin. Jde o agonistu TLR7/8. Po podání aktivuje lokální buňky vrozené imunity a dochází k pohlcení antigenu. Ovlivňuje zrání APC, které potom antigen transportují do lymfatických uzlin. Podporuje rozvoj T_H1 buněčné odpovědi a tím stimuluje hlavně specifickou buněčnou odpověď (aktivaci a proliferaci CD4 T lymfocytů) [70]. Buňky lymfatických uzlin produkují INF- γ , IL-2 a také IL-6, IL-17 a IL-10 v krční lymfatické uzlině.

Cytokiny

Cytokiny jsou velmi důležité látky pro rozvoj imunitní odpovědi. V organismu stimulují řadu buněk a procesů. Jejich použití jako adjuvans zaručuje zvýšení aktivity buněk a stimulaci produkce protilátek. Používají se interferony (INF- α a INF- γ), interleukiny (IL-1, IL-2, IL-4, IL-12 a IL-18). Výsledná reakce závisí na zvoleném cytokinu, protože každý cytokin stimuluje jiné reakce [59].

Interleukin 1 spouští zánětlivou reakci, stimuluje další buňky imunitního systému, které mohou produkovat cytokiny a sám může ovlivňovat produkci látek (cytokinů). Interleukin 2 je zodpovědný za aktivaci T i B lymfocytů a dalších buněk, jako jsou neutrofily, makrofágy a NK buňky. Může také zvýšit sekreci dalších cytokinů [59]. Interleukin 12 ovlivňuje buňky nespecifické imunity, hlavně NK buňky, rozvoj pomocných lymfocytů (hlavně T_H1), makrofágů a neutrofilů. Interleukin 18 je zodpovědný za aktivaci NK buněk a stimulaci tvorby INF- γ [3].

Poly(I:C)

Polyinosinko-polycytidilová kyselina působí jako agonista TLR3. Napodobuje infekci patogenů a tím podporuje rozvoj imunitní odpovědi [71]. Kromě receptoru TLR3 může působit i na TLR4 [69]. Aktivuje dráhu NF- κ B, produkci cytokinu a antivirových interferonů, které zvyšují nábor a aktivaci buněk imunitního systému [71]. Také dochází k aktivaci mitogenem aktivovaná proteinkinázy (MAPK), která ovlivňuje řadu dalších procesů v buňce [69].

5.2.5. Výhody a nevýhody použití slizničních adjuvans

Výhodou slizničních adjuvans je hlavně jejich možnost použití ve slizničních vakcínách, které představují zcela nové perspektivy vakcinace. Jejich použití ve vakcínách je velmi důležité, bez adjuvans zůstávají antigeny na slizničním povrchu jen velmi krátkou dobu z důvodu rychlé clearance. Slizniční vakcíny poskytují kompletní ochranu – systémovou i slizniční. To může být výhodou, protože většina patogenů vstupuje do organismu přes sliznice [61].

Slizniční vakcíny jsou aplikovány neinvazivním způsobem, aplikace je bezbolestná, minimalizují se vedlejší účinky v místě aplikace. Důležité je i minimalizování rizika nákazy po aplikaci nesterilní jehlou a s tím je spojené celkové zvýšení bezpečnosti aplikace [63]. Použití slizničních vakcín představuje možnost, jak usnadnit očkování například v odlehlých venkovských oblastech rozvojových zemích. Protože je tato aplikace snazší a vhodná pro hromadná očkování, není potřeba injekční aplikace od doktora [12; 59]. Obyvatelé z venkovských oblastí by tak nemuseli dojíždět do nemocničního zařízení kvůli aplikaci vakcíny [12]. Zkoumají se i slizniční vakcíny ve formě prášků, který je stabilnější při různých teplotách a vlhkosti než kapalně vakcíny. U této formy vakcín by zcela odpadly náklady spojené s přepravou, jako zajištění stálé teploty v chladících boxech apod. [61]. Náklady na výrobu slizničních vakcín obvykle bývají nižší, než při výrobě vakcín podávaných injekčně [63].

5.2.6. Výzkum nových slizničních adjuvans a vakcín

Kromě vývoje nových adjuvans se vědecké laboratoře snaží zjistit více informací o farmakokinetice a farmakodynamice přípravků v organismu. Studuje se odpověď organismu na dávku ve snaze optimalizovat dávku vakcín. Snaží se o optimalizaci dávky antigenu i adjuvans [13; 63].

Dalším předmětem zkoumání jsou mechanismy působení nových, ale i některých již známých vakcín i adjuvans. Objasnění a pochopení mechanismu by znamenalo velký pokrok a nové perspektivy v očkovací strategii. Zkoumá se hlavně příjem a přeprava antigenů a interakce s imunitním systémem vrozeným i získaným [13]. Je také třeba prozkoumat možnost přesměrování antigenů a adjuvans do CNS (viz případy Bellovy obrny) [63].

Při vývoji nových vakcín se výzkumné laboratoře snaží o stabilní složení bez vedlejších účinků, optimální dávky antigenů i adjuvans. Protože imunizaci výrazně ovlivňuje i doba kontaktu vakcíny se sliznicemi a uvolňování antigenu, hledá se ta optimální. Ukázalo se, že je také velmi důležité použít vhodné zvířecí modely. Je třeba, aby na vakcínu reagovaly podobně

jako člověk. U některých mohou být imunitní odpovědi jiné a výsledky testů velmi zkreslené. V dnešní době se pro tento účel používají hlavně myši, avšak drobné rozdíly v imunitních systémech ztěžují interpretaci výsledků [72].

Slizniční cesta podání se ukázala jako velmi slibná díky indukci systémové i slizniční imunity a poskytnutí dostatečné ochrany. Výhodná je i forma aplikace vakcíny. Intranazální a sublingvální vakcíny by bylo možné používat u kojenců, protože je jejich aplikace bezbolestná. Pro tyto vakcíny je ale třeba najít vhodná adjuvans.

V následující části jsou uvedena některá nová slizniční adjuvans.

PS-GAMP

V poslední době jsou zkoumány univerzální vakcíny proti chřipce podávané plicní cestou. Potřeba univerzální vakcíny na chřipku je značná. Chřipkový virus má možnost mutace genů hemaglutininu (HA) a neuraminidázy (NA). Složení vakcín se tak mění každý rok, aby se docílilo co nejlepší ochrany. Některé roky ale vakcíny nejsou dostatečně účinné. Zkoumané plicní vakcíny zatím neprošly klinickými studiemi, ale vykazovaly dobré výsledky [73]. Cílem stimulace jsou plicní rezidentní T lymfocyty ($CD8^+ T_{RM}$ a $CD4^+ T_{RM}$), stimulována je i humorální imunita. Pro vakcíny bylo třeba najít vhodné slizniční adjuvans. Jako slibný se ukázal 2',3'-cyklický guanosin monofosfát-adenosinmonofosfát (cGAMP) zapouzdřený do PS – biomimetické nanočástice [73; 74]. Cyklický GAMP je poměrně důležitou látkou v těle při virové infekci, díky němu dochází k rychlému náboru přirozených zabíjácích buněk. Jde o přirozeného a velmi silného agonistu STING (stimulátor interferonových genů) [74]. Povrch alveolů je pokryt směsí bílkovin a lipidů (PS vrstva), které jsou produkovány epitelovými buňkami. Díky této bariéře se cGAMP nemůže do buněk dostat. Tento problém se vyřešil po zabalení cGAMP do syntetizovaných nanočástic, které se lipidovým složením i nábojem velmi podobají PS [73; 74]. Díky tomu jsou částice PS-cGAMP rozpoznány makrofágy v plicích jako vlastní a vstoupí do nich. V cytosolu buňky je poté vypuštěn obsah nanočástic (cGAMP) a dochází ke stimulaci STING, který stimuluje expresi INF typu 1 [74]. Zvyšuje se nábor i diferenciaci DC. Je stimulována robustní odpověď T lymfocytů ($CD8^+$ i $CD4^+$) a ochrana organismu je zajištěna již dva dny po imunizaci [73]. To je nespornou výhodou, protože současné vakcíny proti chřipce zajišťují ochranu po 10-14 dnech po aplikaci [74]. Kromě vrozené imunity je také stimulována humorální imunita a produkce protilátek IgG i IgA [73]. Toto adjuvans ve spojení s vakcínou zajišťuje širokou ochranu proti virům chřipky.

Výsledky imunizace po použití vakcíny s adjuvans PS-GAMP byly porovnány s vakcínou obsahující jiné slizniční adjuvans, a to kyselinu polycytidylovou, která je také známá pod názvem poly(I:C). PS-GAMP vykazovalo mnohem vyšší účinnost, titer protilátek na sliznici

i v séru byl několikanásobně vyšší. Navíc bylo zjištěno, že myši, očkované slizniční vakcínou chřipkového viru H1N1 s adjuvans PS-GAMP, byly chráněny i před jinými vysoce patogenními viry (H1N1, H3N2, H5N1 a H7N9). Při použití vakcíny s adjuvans poly(I:C) nebyla tato ochrana zaznamenána [73; 74].

HP- β -CD

Polymer hydroxypropyl- β -cyklodextrin byl zkoumán jako možné adjuvans pro intranazální vakcíny proti chřipce. Při testech bylo zjištěno, že po jeho podání dochází v alveolech k uvolnění IL-33 z epitelových buněk a následnému rozvoji imunitní odpovědi. Tato dráha je pro HP- β -CD jedinečná, protože po stimulaci jinými adjuvans nebyla výsledná reakce organismu závislá na IL-33 [60]. Po podání následně dochází k rozvoji TH2 lymfocytů a protilátkové odpovědi.

Mannatid

Jde o polysacharid známý také jako α -polyaktin nebo polyaktin A (PA). Byl izolován z bakterií rodu *Streptococcus*. V Číně se používá jako imunomodulátor pro léčbu zhoršené imunity, zkoumá se ale i jeho použití jako adjuvans. U vakcín H1N1 a enteroviru 71 (EV71) zvýšil imunogenicitu při podávání intranazální cestou. Stále není znám mechanismus jeho působení a je třeba ověřit i jeho bezpečnost [37]. Studie provedená roku 2017 potvrdila, že PA je schopen stimulovat odpověď T, B lymfocytů a NK buněk, produkci interferonů, interleukinů i sérových a slizničních protilátek. PA byl součástí vakcíny proti chřipce, výsledky byly srovnány s vakcínou obsahující MF59. Vakcína s PA vykazovala srovnatelnou účinnost [37].

Chitosan

Chitosanu je v poslední době věnováno poměrně velké množství pozornosti. Vakcíny s obsahem chitosanu byly zkoumány v několika klinických studiích, ve kterých vykazoval velmi dobré adjuvantní vlastnosti, neprojevil žádnou toxicitu a byl velmi dobře snášen. Ukázal se jako vhodné slizniční adjuvans. Jako velmi slibné se ukázalo jeho použití ve slizničních vakcínách spolu s MPLA [67]. Při srovnání jeho adjuvantních vlastností s hydroxidem hlinitým při parenterálním podání vakcíny proti chřipce vykazoval podobné vlastnosti, takže by bylo možné i jeho použití v parenterálních vakcínách [75]. Jedná se o přírodní hydrofilní lineární polysacharid, je složen z d-glukosaminu a N-acetyl-d-glukosaminu [76]. Jeho výroba není náročná, vyrábí se částečnou deacetylací chitinu, který je přirozenou součástí těl koryšů a buněk hub, takže je v přírodě velmi hojný [75; 77]. Díky svým dobrým vlastnostem byl zkoumán pro použití v lékařských a farmaceutických aplikacích jako doručovací systém léků. Je biologicky rozložitelný, netoxický a nezpůsobuje alergie [76].

Chitosan je znám již delší dobu především pro svoji schopnost aktivovat makrofágy a stimulovat produkci cytokinů. Jeho adjuvantní vlastnosti ve velké míře závisí na způsobu výroby. Acetylovaná forma chitosanu stimuluje přednostně odpověď T_H2 . Částečně deacetylovaný chitosan při testech přednostně stimuloval odpověď T_H1 [77].

Bylo zjištěno, že chitosan prodlužuje dobu, po kterou je antigen přítomen na sliznici [67]. To je u slizničních vakcín velmi důležité, protože sliznice má velmi rychlou clearance cizorodých částic [61]. Díky své viskozitě mu poskytuje i dostatečnou ochranu. Může usnadnit vstup antigenu do NALT a stimulovat makrofágy [67]. Po parenterálním podání vakcíny obsahující *Mycobacterium tuberculosis* bylo zjištěno, že má schopnost aktivovat dendritické buňky a podporovat jejich zrání [75; 77]. Dendritické buňky po stimulaci chitosanem produkovaly velké množství $INF-\alpha$ a $INF-\beta$ a to i bez předchozího stimulu prozánětlivými cytokiny IL-12 a IL-6 [77]. Chitosan neaktivuje DC prostřednictvím PAMP. Zřejmě se tak děje na základě uvolnění hostitelské DNA do cytosolu buňky, která jako PAMP působí. Přítomnost chitosanu v buňce vyvolává mitochondriální stres, uvolnění ROS (reaktivní forma kyslíku) a uvolnění mitochondriální DNA (mtDNA) [77]. Tento děj aktivuje cestu vedoucí k tvorbě INF , aktivaci a vyžívání DC, vyvolávají vyváženou tvorbu T_H1 a T_H2 buněk [75].

APG

Alkyl glykosid je netoxická, biologicky rozložitelná látka, která se vyrábí syntézou alkoholu a glukózy. Je široce používán v kosmetice nebo potravinářském průmyslu, díky svým vlastnostem se zvažuje i jeho použití jako slizniční adjuvans. Při použití ve vakcíně proti chřipce indukoval vznik vysokých titrů protilátek IgG i slizničních protilátek IgA v oblasti nosohltanu a plic [78].

FSL-1

Jde o syntetický diacylovaný lipoprotein. Je odvozen od *Mycoplasma salivarium*. V organismu je rozpoznáván molekulami TLR2/6. Při použití jako adjuvans FSL-1 působí jako agonista TLR2/6. Indukuje odpověď $TNF-\alpha$ v makrofázích a je aktivátorem dráhy $NF-\kappa B$ [79].

FSL-1 může aktivovat makrofágy, podporuje tvorbu celé řady cytokinů: (IL)-6, IL-8, IL-10 a IL-12 a (TNF)- α . Uvažuje se o jeho použití ve vakcínách proti rakovině [79].

6. ZÁVĚR

Vakcinace je v poslední době často skloňované téma. Představuje jednu z nejdůležitějších a neúčinnějších strategií prevence řady nemocí. Ve snaze vyrobit co nejbezpečnější vakcíny se ale často snižuje jejich imunogennost a tím i účinnost. Proto je třeba do vakcín přidávat adjuvans, která tento problém mohou vyřešit. Další výhodou přidávání adjuvans do vakcín je možnost snížení dávky antigenu a tím snížení nákladů na výrobu vakcín.

Cílem práce bylo představit adjuvans běžně používaná ve vakcínách. V parenterálních vakcínách je to hlavně alum, MF59 a lipidové částice. Slizniční adjuvans musejí po aplikaci čelit náročnějším podmínkám v organismu (nízké pH, sliny, trávicí enzymy), proto je mnohem náročnější vývoj nových adjuvans. Některá zatím známá adjuvans, například bakteriální toxiny, nevykazují dostatečnou bezpečnost a mohou způsobovat komplikace v podobě Bellovy obrny. Bezpečnější by mělo být použití geneticky upravených toxinů, popřípadě jejich B podjednotek. Pár slov k současným používaným slizničním adjuvans.

Stále je potřeba vyvíjet nová adjuvans, aby byly odstraněny již známé nedostatky u těch běžně používaných. Tím by se vakcíny daly více přizpůsobit potřebám lidí. Jedním z nově zkoumaných a velmi slibných adjuvans je chitosan. Jeho deriváty (hlavně trimethyl chitosan) vykazovaly ve studiích velmi dobré vlastnosti při použití ve slizničních i parenterálních vakcínách a zatím nevykazovaly žádnou toxicitu. V budoucnu by mohly nahradit ty na bázi hliníkových adjuvans. Jsou součástí vakcín, které jsou předmětem klinických testů, a to jsou především vakcíny proti TBC, HBV, chřipce, noroviru nebo *Helicobacter pylori*.

Vzhledem k tomu, že se věda a výzkum posouvají stále kupředu, je velmi pravděpodobné, že se v budoucnu dočkáme nových adjuvans a účinnějších vakcín.

ZDROJE

- [1] APOSTÓLICO, Juliana, Victória LUNARDELLI, Fernanda COIRADA, Silvia BOSCARDIN a Daniela ROSA. Adjuvants: Classification, Modus Operandi , and Licensing. *Journal of Immunology Research* [online]. 2016, 1-16 [cit. 2021-03-02]. ISSN 2314-8861. doi:10.1155/2016/1459394
- [2] HO, Nataschja, Lisa HUIS IN 'T VELD, Tonke RAAIJMAKERS a Gosse ADEMA. Adjuvants Enhancing Cross-Presentation by Dendritic Cells: The Key to More Effective Vaccines?. *Frontiers in Immunology* [online]. 2018, **9** [cit. 2021-03-01]. ISSN 1664-3224. doi:10.3389/fimmu.2018.02874
- [3] KREJSEK, Jan, Ctirad ANDRÝS a Irena KRČMOVÁ. *Imunologie člověka: KREJSEK, Jan, Ctirad ANDRÝS a Irena KRČMOVÁ*. Hradec Králové: Garamon s.r.o., 2016. str. 123-142, 445-456. ISBN ISBN 978-80-86472-74-4.
- [4] *Adjuvans. Velký lékařský slovník On-Line ©1998-2021* [online]. [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/adjuvans>
- [5] ZHU, Wandi, Chunhong DONG, Lai WEI a Bao-Zhong WANG. Promising Adjuvants and Platforms for Influenza Vaccine Development. *Pharmaceutics* [online]. 2021, **13**(1) [cit. 2021-03-01]. ISSN 1999-4923. doi:10.3390/pharmaceutics13010068
- [6] LIANG, Zhihui, Haoru ZHU, Xin WANG et al. Adjuvants for Coronavirus Vaccines. *Frontiers in Immunology* [online]. 2020, **11** [cit. 2021-03-01]. ISSN 1664-3224. doi:10.3389/fimmu.2020.589833
- [7] NANISHI, Etsuro, David DOWLING a Ofer LEVY. Toward precision adjuvants: optimizing science and safety. *Current Opinion in Pediatrics* [online]. 2020, **32**(1), 125-138 [cit. 2021-03-01]. ISSN 1040-8703. doi:10.1097/MOP.0000000000000868
- [8] DEL GIUDICE, Giuseppe, Rino RAPPUOLI a Arnaud DIDIERLAURENT. Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Seminars in Immunology* [online]. 2018, **39**, 14-21 [cit. 2021-03-01]. ISSN 10445323. doi:10.1016/j.smim.2018.05.001
- [9] MAO, Helen a Shoubai CHAO. Advances in Vaccines. SILVA, Ana Catarina, João Nuno MOREIRA, José Manuel Sousa LOBO a Hugo ALMEIDA, ed., Ana SILVA,

- João MOREIRA, José LOBO, Hugo ALMEIDA. *Current Applications of Pharmaceutical Biotechnology* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020, s. 155-188 [cit. 2021-03-02]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. ISBN 978-3-030-40463-5. doi:10.1007/10_2019_107
- [10] TREGONING, John, Ryan RUSSELL a Ekaterina KINNEAR. Adjuvanted influenza vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2017, **14**(3), 550-564 [cit. 2021-03-01]. ISSN 2164-5515. doi:10.1080/21645515.2017.1415684
- [11] JÍLKOVÁ, Eva. Principy aktivní imunizace. Je očkování zátěž?. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2012, **14**(89), 336-338 [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/09/10.pdf>
- [12] ZHENG, Zhichao, Diana DIAZ-ARÉVALO, Hongbing GUAN a Mingtao ZENG. Noninvasive vaccination against infectious diseases. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2018, **14**(7), 1717-1733 [cit. 2021-03-24]. ISSN 2164-5515. doi:10.1080/21645515.2018.1461296
- [13] KRAAN, Heleen, Hilde VRIELING, Cecil CZERKINSKY, Wim JISKOOT, Gideon KERSTEN a Jean-Pierre AMORIJ. Buccal and sublingual vaccine delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2014, **190**, 580-592 [cit. 2021-03-01]. ISSN 01683659. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.060
- [14] LIVINGSTON, Edward, Preeti MALANI a C. CREECH. The Johnson & Johnson Vaccine for COVID-19. *JAMA* [online]. 2021 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0098-7484. doi:10.1001/jama.2021.2927
- [15] CORUM, Johnatan a Carl ZIMMER. How the Johnson and Johnson Vaccine Works. *The New York Times* [online]. 2021 [cit. 2021-04-12]. Dostupné z: <https://www.nytimes.com/interactive/2020/health/johnson-johnson-covid-19-vaccine.html>
- [16] VETTER, Volker, Gülhan DENIZER, Leonard FRIEDLAND, Jyothsna KRISHNAN a Marla SHAPIRO. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of Medicine* [online]. 2018, **50**(2), 110-120 [cit. 2021-03-25]. ISSN 0785-3890. doi:10.1080/07853890.2017.1407035

- [17] WANG, Yulong, Wenjun WU, Nicolas NEGRE, Kevin WHITE, Cheng LI a Parantu SHAH. Determinants of antigenicity and specificity in immune response for protein sequences. *BMC Bioinformatics* [online]. 2011, **12**(1) [cit. 2021-03-01]. ISSN 1471-2105. doi:10.1186/1471-2105-12-251
- [18] QIU, Tianyi, Jingxuan QIU, Yiyang YANG, Lu ZHANG, Tiantian MAO, Xiaoyan ZHANG, Jianqing XU a Zhiwei CAO. A benchmark dataset of protein antigens for antigenicity measurement. *Scientific Data* [online]. 2020, **7**(1) [cit. 2021-03-01]. ISSN 2052-4463. doi:10.1038/s41597-020-0555-y
- [19] MAHANTY, Siddhartha, Antoine PRIGENT a Olivier GARRAUD. Immunogenicity of infectious pathogens and vaccine antigens. *BMC Immunology* [online]. 2015, **16**(1) [cit. 2021-03-01]. ISSN 1471-2172. doi:10.1186/s12865-015-0095-y
- [20] BAXTER, David. Active and passive immunization for cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2014, **10**(7), 2123-2129 [cit. 2021-03-02]. ISSN 2164-5515. doi:10.4161/hv.29604
- [21] TROMBETTA, Claudia, Elena GIANCHECCHI a Emanuele MONTOMOLI. Influenza vaccines: Evaluation of the safety profile. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2017, **14**(3), 657-670 [cit. 2021-04-10]. ISSN 2164-5515. doi:10.1080/21645515.2017.1423153
- [22] FAN, Xue, Yun WANG, Qiu SU et al. Intranasal Immunization Using CTA1-DD as a Mucosal Adjuvant for an Inactivated Influenza Vaccine. *Biomedical and Environmental Sciences* [online]. 2019, **32**(7), 531-540 [cit. 2021-04-10]. doi:10.3967/bes2019.070
- [23] CARVALHO, Miguel a Davinder GILL. Rotavirus vaccine efficacy: current status and areas for improvement. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2018, **15**(6), 1237-1250 [cit. 2021-03-04]. ISSN 2164-5515. doi:10.1080/21645515.2018.1520583
- [24] GRANT, Gavin, Shalini DESAI, Laure DUMOLARD, Katrina KRETSINGER a Susan REEF. Progress Toward Rubella and Congenital Rubella Syndrome Control and Elimination — Worldwide, 2000–2018. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* [online]. 2019, **68**(39), 855-859 [cit. 2021-03-04]. ISSN 0149-2195. doi:10.15585/mmwr.mm6839a5

- [25] Priorix. *Emc* [online]. Datapharm Ltd, 2020 [cit. 2021-05-27]. Dostupné z: <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/2054/SPC/Priorix/#gref>
- [26] GOPFERTO VÁ, Dana. Správná technika a další aspekty aplikace očkovacích látek. *Očkování a cestovní medicína* [online]. 2014, (2) [cit. 2021-03-25]. Dostupné z: <https://odbornost.avenier.cz/cz/spravna-technika-a-dalsi-aspekty-aplikace-ockovacich-latek>
- [27] *Parenterální. Velký lékařský slovník On-Line ©1998-2021* [online]. Maxdorf [cit. 2021-03-21]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/parenteralni>
- [28] MAŠKOVÁ, Eliška a Kateřina KUBOVÁ. Subkutánní aplikace léčiv – přehled a výhody podání. *Remedia online* [online]. 2014, (6) [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-formy/Subkutanni-aplikace-leciv-prehled-a-vyhody-podani/6-H-1Nb.magarticle.aspx>
- [29] KO, Eun-Ju a Sang-Moo KANG. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2018, **14**(12), 3041-3045 [cit. 2021-03-01]. ISSN 2164-5515. doi:10.1080/21645515.2018.1495301
- [30] WEINBERGER, B. Adult vaccination against tetanus and diphtheria: the European perspective. *Clinical & Experimental Immunology* [online]. 2017, **187**(1), 93-99 [cit. 2021-03-03]. ISSN 00099104. doi:10.1111/cei.12822
- [31] Malaria vaccine implementation programme (MVIP). *World Health Organization* [online]. 2020 [cit. 2021-04-12]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/malaria-vaccine-implementation-programme>
- [32] BUCKLEY, Paul, Kieran ALDEN, Margherita COCCIA et al. Application of Modeling Approaches to Explore Vaccine Adjuvant Mode-of-Action. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, **10** [cit. 2021-04-13]. ISSN 1664-3224. doi:10.3389/fimmu.2019.02150
- [33] DIDIERLAURENT, Arnaud, Catherine COLLIGNON, Patricia BOURGUIGNON et al. Enhancement of Adaptive Immunity by the Human Vaccine Adjuvant AS01 Depends on Activated Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* [online]. 2014, **193**(4), 1920-1930 [cit. 2021-04-13]. ISSN 0022-1767. doi:10.4049/jimmunol.1400948

- [34] ZHENG, Yu, Lijun BIAN, Huiting ZHAO et al. Respiratory Syncytial Virus F Subunit Vaccine With AS02 Adjuvant Elicits Balanced, Robust Humoral and Cellular Immunity in BALB/c Mice. *Frontiers in Immunology* [online]. 2020, **11** [cit. 2021-04-12]. ISSN 1664-3224. doi:10.3389/fimmu.2020.526965
- [35] KESTER, Kent, D. GRAY HEPPNER, Philippe MORIS et al. Sequential Phase 1 and Phase 2 randomized, controlled trials of the safety, immunogenicity and efficacy of combined pre-erythrocytic vaccine antigens RTS,S and TRAP formulated with AS02 Adjuvant System in healthy, malaria naïve adults. *Vaccine* [online]. 2014, **32**(49), 6683-6691 [cit. 2021-04-12]. ISSN 0264410X. doi:10.1016/j.vaccine.2014.06.033
- [36] WILKINS, Amanda, Dmitri KAZMIN, Giorgio NAPOLITANI, Elizabeth CLUTTERBUCK, Bali PULENDRAN, Claire-Anne SIEGRIST a Andrew POLLARD. AS03- and MF59-Adjuvanted Influenza Vaccines in Children. *Frontiers in Immunology* [online]. 2017, **8** [cit. 2021-03-04]. ISSN 1664-3224. doi:10.3389/fimmu.2017.01760
- [37] REN, Shu-Ting, Xue-Mei ZHANG, Peng-Fei SUN et al. Intranasal Immunization Using Mannatide as a Novel Adjuvant for an Inactivated Influenza Vaccine and Its Adjuvant Effect Compared with MF59. *PLOS ONE* [online]. 2017, **12**(1) [cit. 2021-04-11]. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0169501
- [38] DIDIERLAURENT, Arnaud, Sandra MOREL, Laurence LOCKMAN et al. AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology* [online]. 2009, **183**(10), 6186-6197 [cit. 2021-03-04]. ISSN 0022-1767. doi:10.4049/jimmunol.0901474
- [39] GUIMARÃES, Luísa, Britain BAKER, Carlo PERRICONE a Yehuda SHOENFELD. Vaccines, adjuvants and autoimmunity. *Pharmacological Research* [online]. 2015, **100**, 190-209 [cit. 2021-04-07]. ISSN 10436618. doi:10.1016/j.phrs.2015.08.003
- [40] SCHWENDENER, Reto A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Therapeutic Advances in Vaccines* [online]. 2014, **2**(6), 159-182 [cit. 2021-03-04]. ISSN 2051-0144. doi:10.1177/2051013614541440

- [41] GUO, Jingao, Moumita MONDAL a Dongming ZHOU. Development of novel vaccine vectors: Chimpanzee adenoviral vectors. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2018, **14**(7), 1679-1685 [cit. 2021-03-21]. ISSN 2164-5515. doi:10.1080/21645515.2017.1419108
- [42] BARRY, Michael. Single-cycle adenovirus vectors in the current vaccine landscape. *Expert Review of Vaccines* [online]. 2018, , 1-11 [cit. 2021-03-21]. ISSN 1476-0584. doi:10.1080/14760584.2018.1419067
- [43] DICKS, Matthew, Alexandra SPENCER, Lynda COUGHLAN, Karolis BAUZA, Sarah GILBERT, Adrian HILL a Matthew COTTINGHAM. Differential immunogenicity between HAdV-5 and chimpanzee adenovirus vector ChAdOx1 is independent of fiber and penton RGD loop sequences in mice. *Scientific Reports* [online]. 2015, **5**(1) [cit. 2021-03-24]. ISSN 2045-2322. doi:10.1038/srep16756
- [44] ANTROBUS, Richard, Lynda COUGHLAN, Tamara BERTHOUD, Matthew DICKS, Adrian HILL, Teresa LAMBE a Sarah GILBERT. Clinical Assessment of a Novel Recombinant Simian Adenovirus ChAdOx1 as a Vectored Vaccine Expressing Conserved Influenza A Antigens. *Molecular Therapy* [online]. 2014, **22**(3), 668-674 [cit. 2021-03-21]. ISSN 15250016. doi:10.1038/mt.2013.284
- [45] DICKS, Matthew, Alexandra SPENCER, Nick EDWARDS et al. A Novel Chimpanzee Adenovirus Vector with Low Human Seroprevalence: Improved Systems for Vector Derivation and Comparative Immunogenicity. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(7) [cit. 2021-03-24]. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0040385
- [46] HASSAN, Ahmed, Natasha KAFI, Igor DMITRIEV et al. A Single-Dose Intranasal ChAd Vaccine Protects Upper and Lower Respiratory Tracts against SARS-CoV-2. *Cell* [online]. 2020, **183**(1), 169-18413 [cit. 2021-03-24]. ISSN 00928674. doi:10.1016/j.cell.2020.08.026
- [47] KNOLL, Maria a Chizoba WONODI. Oxford–AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. *The Lancet* [online]. 2021, **397**(10269), 72-74 [cit. 2021-03-24]. ISSN 01406736. doi:10.1016/S0140-6736(20)32623-4

- [48] DUBÉ, Jean-Yves, Fiona MCINTOSH, Juan ZARRUK, Samuel DAVID, Jérôme NIGOU a Marcel BEHR. Synthetic mycobacterial molecular patterns partially complete Freund's adjuvant. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2021-03-03]. ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-020-62543-5
- [49] FONTES, Jillian, Jobert BARIN, Monica TALOR, Natalie STICKEL, Julie SCHAUB, Noel ROSE a Daniela ČIHÁKOVÁ. Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during initiation of the immune response. *Immunity, Inflammation and Disease* [online]. 2017, **5**(2), 163-176 [cit. 2021-03-03]. ISSN 20504527. doi:10.1002/iid3.155
- [50] HE, Peng, Yening ZOU a Zhongyu HU. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2015, **11**(2), 477-488 [cit. 2021-03-01]. ISSN 2164-5515. doi:10.1080/21645515.2014.1004026
- [51] MARRACK, Philippa, Amy MCKEE a Michael MUNKS. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2009, **9**(4), 287-293 [cit. 2021-03-03]. ISSN 1474-1733. doi:10.1038/nri2510
- [52] GOFF, Peter, Tomoko HAYASHI, Luis MARTÍNEZ-GIL et al. Synthetic Toll-Like Receptor 4 (TLR4) and TLR7 Ligands as Influenza Virus Vaccine Adjuvants Induce Rapid, Sustained, and Broadly Protective Responses. *Journal of Virology* [online]. 2015, **89**(6), 3221-3235 [cit. 2021-03-01]. ISSN 0022-538X. doi:10.1128/JVI.03337-14
- [53] VAN MAELE, Laurye, Delphine FOUGERON, Delphine CAYET, Aurélie CHALON, Diego PICCIOLI, Catherine COLLIGNON, Jean-Claude SIRARD a Arnaud DIDIERLAURENT. Toll-like receptor 4 signaling in hematopoietic-lineage cells contributes to the enhanced activity of the human vaccine adjuvant AS01. *European Journal of Immunology* [online]. 2019, **49**(12), 2134-2145 [cit. 2021-04-13]. ISSN 0014-2980. doi:10.1002/eji.201948234
- [54] COHET, Catherine, Robbert VAN DER MOST, Vincent BAUCHAU et al. Safety of AS03-adjuvanted influenza vaccines: A review of the evidence. *Vaccine* [online]. 2019, **37**(23), 3006-3021 [cit. 2021-03-04]. ISSN 0264410X. doi:10.1016/j.vaccine.2019.04.048

- [55] DEN BROK, Martijn, Christian BÜLL, Melissa WASSINK et al. Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation. *Nature Communications* [online]. 2016, **7**(1) [cit. 2021-03-04]. ISSN 2041-1723. doi:10.1038/ncomms13324
- [56] ROSE, Markus A. Mucosal Immunity and acute viral gastroenteritis. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2014, **10**(7), 2112-2114 [cit. 2021-03-20]. ISSN 2164-5515. doi:10.4161/hv.29605
- [57] PABST, Reinhard. Mucosal vaccination by the intranasal route. Nose-associated lymphoid tissue (NALT)—Structure, function and species differences. *Vaccine* [online]. 2015, **33**(36), 4406-4413 [cit. 2021-03-01]. ISSN 0264410X. doi:10.1016/j.vaccine.2015.07.022
- [58] AINAI, Akira, Elly RIET, Ryo ITO et al. Human immune responses elicited by an intranasal inactivated H5 influenza vaccine. *Microbiology and Immunology* [online]. 2020, **64**(4), 313-325 [cit. 2021-04-10]. ISSN 0385-5600. doi:10.1111/1348-0421.12775
- [59] LI, Miao, Yi WANG, Yuan SUN, Hongyu CUI, Shu ZHU a Hua-Ji QIU. Mucosal vaccines: Strategies and challenges. *Immunology Letters* [online]. 2020, **217**, 116-125 [cit. 2021-04-08]. ISSN 01652478. doi:10.1016/j.imlet.2019.10.013
- [60] KOBARI, Shingo, Takato KUSAKABE, Masatoshi MOMOTA et al. IL-33 Is Essential for Adjuvant Effect of Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin on the Protective Intranasal Influenza Vaccination. *Frontiers in Immunology* [online]. 2020, **11** [cit. 2021-04-11]. ISSN 1664-3224. doi:10.3389/fimmu.2020.00360
- [61] BAHAMONDEZ-CANAS, Tania a Zhengrong CUI. Intranasal immunization with dry powder vaccines. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2018, **122**, 167-175 [cit. 2021-05-27]. ISSN 09396411. doi:10.1016/j.ejpb.2017.11.001
- [62] RHEE, Joon Haeng. Current and New Approaches for Mucosal Vaccine Delivery. *Mucosal Vaccines* [online]. Elsevier, 2020, s. 325-356 [cit. 2021-03-01]. ISBN 9780128119242. doi:10.1016/B978-0-12-811924-2.00019-5
- [63] REINA, J. The sublingual influenza vaccine. *Vacunas (English Edition)* [online]. 2019, **20**(1), 37-41 [cit. 2021-03-01]. ISSN 24451460. doi:10.1016/j.vacune.2018.10.002

- [64] VERNEROVÁ, Eva. SLIZNIČNÍ IMUNITA U DĚTÍ, LIZNIČNÍ IMUNITA U DĚTÍ, MOŽNOSTI IMUNOMODULACE A ALERGIE. *Ambulantná terapia* [online]. 2008, **6**(3), 198-201 [cit. 2021-03-20]. Dostupné z:
<https://www.solen.sk/storage/file/article/63363649be9317fbfe3ce85cbc17ced4.pdf>
- [65] ARRIGHI, Antonello, Martina ČERNÁ, Jiří SLÍVA a Lucie KOŠŤÁLOVÁ. Sublingvální alergenová imunoterapie - nové možnosti. *FarmiNews* [online]. 2016, (1), 38-39 [cit. 2021-04-06]. Dostupné z:
<http://www.edukafarm.cz/data/soubory//casopisy/Farmi%201-2016/15%20Sublingval.pdf>
- [66] URBAN, Elisabeth, Gerd VOLK, Katharina GEIBLER, Jovanna THIELKER, Andreas DITTBERNER, Carsten KLINGNER, Otto WITTE a Orlando GUNTINAS-LICHIUS. Prognostic factors for the outcome of Bells' palsy: A cohort register-based study. *Clinical Otolaryngology* [online]. 2020, **45**(5), 754-761 [cit. 2021-04-07]. ISSN 1749-4478. doi:10.1111/coa.13571
- [67] SMITH, Alan, Michael PERELMAN a Michael HINCHCLIFFE. Chitosan. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. 2014, **10**(3), 797-807 [cit. 2021-04-11]. ISSN 2164-5515. doi:10.4161/hv.27449
- [68] VALLI, E., A. HARRIETT, M. NOWAKOWSKA et al. LTA1 is a safe, intranasal enterotoxin-based adjuvant that improves vaccine protection against influenza in young, old and B-cell-depleted (μ MT) mice. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1) [cit. 2021-04-11]. ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-019-51356-w
- [69] REISINGER, Sonali, Deeba KHAN, Eryan KONG, Angelika BERGER, Arnold POLLAK a Daniela POLLAK. The Poly(I: C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2015, **149**, 213-226 [cit. 2021-04-11]. ISSN 01637258. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.01.001
- [70] VAN AALST, Susan, Manon JANSEN, Irene LUDWIG, Ruurd VAN DER ZEE, Willem VAN EDEN a Femke BROERE. Routing dependent immune responses after experimental R848-adjuvated vaccination. *Vaccine* [online]. 2018, **36**(11), 1405-1413 [cit. 2021-04-02]. ISSN 0264410X. doi:10.1016/j.vaccine.2018.01.077

- [71] BIANCHI, Francesca, Samantha PRETTO, Elda TAGLIABUE, Andrea BALSARI a Lucia SFONDRINI. Exploiting poly(I: C) to induce cancer cell apoptosis. *Cancer Biology & Therapy* [online]. 2017, **18**(10), 747-756 [cit. 2021-04-11]. ISSN 1538-4047. doi:10.1080/15384047.2017.1373220
- [72] SCHINNERLING, Katina, Carlos ROSAS, Lilian SOTO, Ranjeny THOMAS a Juan AGUILLÓN. Humanized Mouse Models of Rheumatoid Arthritis for Studies on Immunopathogenesis and Preclinical Testing of Cell-Based Therapies. *Frontiers in Immunology* [online]. 2019, **10** [cit. 2021-05-25]. ISSN 1664-3224. doi:10.3389/fimmu.2019.00203
- [73] WANG, Ji, Peiyu LI, Yang YU et al. Pulmonary surfactant–biomimetic nanoparticles potentiate heterosubtypic influenza immunity. *Science* [online]. 2020, **367**(6480) [cit. 2021-04-11]. ISSN 0036-8075. doi:10.1126/science.aau0810
- [74] WANG, Fengyuan, Guopu CHEN a Yuanjin ZHAO. Biomimetic nanoparticles as universal influenza vaccine. *Smart Materials in Medicine* [online]. 2020, **1**, 21-23 [cit. 2021-04-11]. ISSN 25901834. doi:10.1016/j.smaim.2020.03.001
- [75] MALIK, Anshu, Manish GUPTA, Vatika GUPTA, Himanshu GOGOI a Rakesh BHATNAGAR. Novel application of trimethyl chitosan as an adjuvant in vaccine delivery. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2018, **13**, 7959-7970 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1178-2013. doi:10.2147/IJN.S165876
- [76] BI, Yongli, Qingan XU, Lingkai SU et al. The Combinations Chitosan-Pam 3 CSK 4 and Chitosan-Monophosphoryl Lipid A: Promising Immune-Enhancing Adjuvants for Anticaries Vaccine PAc. *Infection and Immunity* [online]. 2019, **87**(12), 00651-19 [cit. 2021-04-11]. ISSN 0019-9567. doi:10.1128/IAI.00651-19
- [77] RITEAU, Nicolas a Alan SHER. Chitosan: An Adjuvant with an Unanticipated STING. *Immunity* [online]. 2016, **44**(3), 522-524 [cit. 2021-04-09]. ISSN 10747613. doi:10.1016/j.immuni.2016.03.002
- [78] WU, Hui, Yuanyuan BAO, Xiang WANG, Dongming ZHOU a Wenzhe WU. Alkyl polyglycoside, a highly promising adjuvant in intranasal split influenza vaccines.

Human Vaccines & Immunotherapeutics [online]. 2017, **13**(6), 1279-1287 [cit. 2021-04-11]. ISSN 2164-5515. doi:10.1080/21645515.2016.1278098

- [79] LI, Mingjing, Zhaoyu WANG, Bocheng YAN et al. Design of a MUC1-based tricomponent vaccine adjuvanted with FSL-1 for cancer immunotherapy. *MedChemComm* [online]. 2019, **10**(12), 2073-2077 [cit. 2021-04-11]. ISSN 2040-2503. doi:10.1039/C9MD00254E