

Liposomi u cjepivima

Domitrović, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:749346>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Karla Domitrović

Liposomi u cjepivima

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Oblikovanje lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen pod stručnim mentorstvom prof. dr. sc. Željke Vanić.

Zahvala

Htjela bi se zahvaliti mentorici prof. dr. sc. Željki Vanić na strpljivosti, uloženom vremenu, te stručnom vodstvu prilikom izrade ovog rada.

Hvala i mojoj obitelji i prijateljima. Bez Vaše podrške i pomoći ne bi dospjela do ovog trenutka. Hvala Vam na svakoj utjesi i svakom osmjehu.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. CJEPIVA.....	1
1.2. ADJUVANSI.....	4
1.3. LIPOSOMI.....	7
2. OBRAZLOŽENJE TEME	11
3. MATERIJALI I METODE	12
4. RASPRAVA.....	13
4.1. ZNAČAJ FIZIČKO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA LIPOSOMA NA UČINKOVITOST CJEPIVA.....	13
4.2. VIRUSNI HEPATITIS.....	17
4.3. GRIPA	20
4.4. TUBERKULOZA.....	23
4.5. HIV.....	26
4.6. MALARIJA	28
4.7. TETANUS	30
4.8. TUMORI.....	31
4.9. <i>HERPES ZOSTER</i>	35
5. ZAKLJUČAK	38
6. POPIS OZNAKA I KRATICA	39
7. LITERATURA	41
8. SAŽETAK	57
9. SUMMARY.....	58
10. PRILOZI	59

1. UVOD

1.1. CJEPIVA

Imunizacija je definirana kao “proces kojim osoba postaje zaštićena protiv bolesti kroz cijepljenje”, a cijepljenje (engl. *vaccination*) kao “uvođenje cjepiva u tijelo kako bi se stvorila zaštita protiv određene bolesti”. Cjepivo je pri tome definirano kao “pripravak koji se koristi za stimulaciju tjelesnog imunskog odgovora protiv određene bolesti” (<https://www.cdc.gov/>). Prvi zapisi o pokušajima imunizacije pojavljuju se već u 15. stoljeću u današnjoj Turskoj i Kini, a govore o korištenju osušenih krasta velikih boginja koje su se inhalirale ili utrljavale u rane kao zaštita od zaraze boginjama. Unatoč tome, pionirskom imunizacijom smatra se Edward Jenner, čija su istraživanja 1798. godine dovela do razvitka prvog cjepiva koje je štitilo od velikih boginja (Clem, 2011).

Imunizacija predstavlja veliki zaokret u modernoj medicini i znanosti pružanjem zaštite od brojnih infektivnih bolesti, a u novije vrijeme i od nekih neinfektivnih bolesti, kao što su maligni tumori, povećavajući time kvalitetu života i produljujući životnu dob (Rappuoli i sur., 2014). O uspješnosti cijepljenja zorno svjedoči smanjenje broja oboljelih od ospica s 530.217 slučajeva godišnje u 20. stoljeću, na 69 slučajeva 2016. godine, čime je postignut pad broja oboljelih od preko 99 %, a može se kao dokaz spomenuti i eradicacija virusa velikih boginja (Orenstein i Ahmed, 2017). Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) navodi 27 bolesti koje se mogu spriječiti cjepivima, a ukoliko se uključe i cjepiva protiv ebole i *herpes zoster*-a, taj broj raste na ukupno 29 bolesti (<https://www.who.int/>). No, postoje još brojna infektivna oboljenja za koja nisu razvijena prikladna cjepiva. Neke od potencijalnih meta su virus humane imunodeficijencije (HIV) i respiratorni sincicijski virus, rod bakterija *Shigella*, paraziti roda *Leishmania* i metilji roda *Schistosoma*. Radi složenosti tih organizama i njihovih životnih ciklusa, te mogućnosti izbjegavanja imunskog sustava, potrebno je razviti nove metode i pristupe imunizacije kao što su novi načini djelovanja cjepiva (na primjer razvoj novih molekula), kao i razvitak novih adjuvansa koji bi pomogli u aktivaciji imunskog sustava (Greenwood, 2014).

S obzirom na dio patogena koji sadrže, cjepiva se mogu podijeliti na:

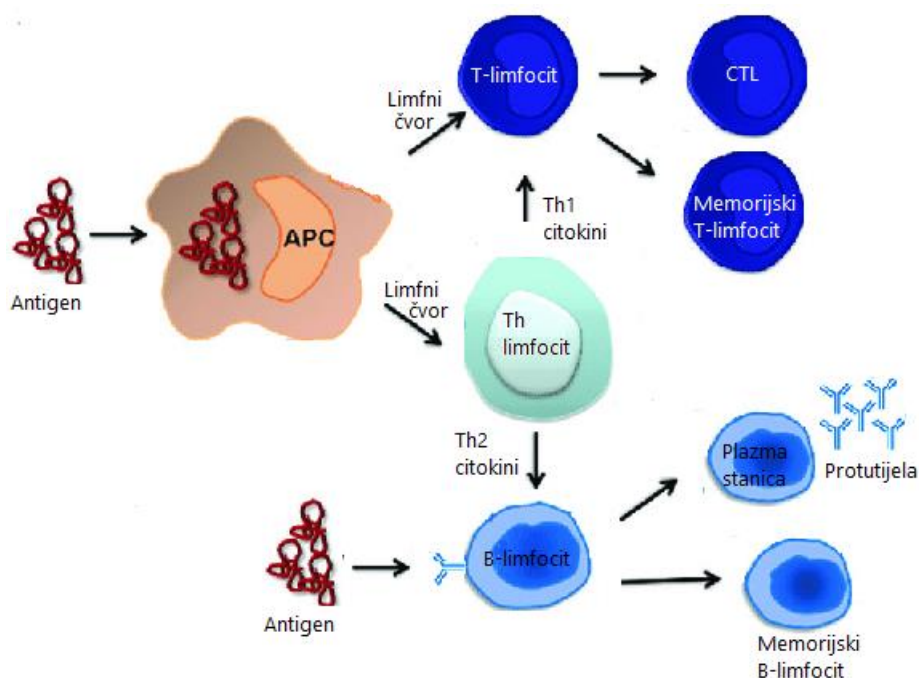
- a) živa, atenuirana cjepiva – sadrže oslabljenog uzročnika bolesti,
- b) inaktivirana cjepiva – sadrže mrtvog patogena,
- c) *split* cjepiva – sadrže virusne čestice influenze fragmentirane detergensom ili eterom,

- d) podjedinična cjepiva – sadrže pročišćene ili rekombinantne proteine, peptide ili polisaharide,
- e) cjepiva s virusom sličnim česticama – nastala organizacijom virusnih proteina u strukturu koja nalikuje virusu,
- f) toksoidna cjepiva – nastala inaktivacijom toksina, stvaraju imunost protiv toksina, a ne uzročnika,
- g) konjugatna cjepiva – nastala povezivanjem antigena ili toksoida s polisaharidima ovojnice mikroorganizama, te
- h) cjepiva s nukleinskim kiselinama – sadrže DNA ili mRNA, a sadržaj se može prenositi viralnim vektorima (Clem, 2011; Hampson, 2008; Iwasaki i Omer, 2020).

Cjepiva se najčešće primjenjuju intramuskularnim injekcijama, no mogući su i drugi putevi primjene, poput supkutane (cjepivo protiv ospica), oralne (Rotarix[®] (GlaxoSmithCline, Ujedinjeno Kraljevstvo) za rotavirus) i intranazalne primjene u obliku spreja (FluMist[®] (AstraZeneca, Ujedinjeno Kraljevstvo) protiv virusa influenze) (<https://www.cdc.gov/>).

Aktivacija imunskog sustava putem cjepiva najčešće započinje s antigen prezentirajućim stanicama (eng. *antigen presenting cells*, APC) na mjestu injektiranja, koje prepoznaju, unose, prerađuju i zatim prezentiraju antigene na svojim membranama (Slika 1). Među APC-ove spadaju makrofagi, B-limfociti i dendritične stanice. APC-ovi luče faktore koji omogućuju privlačenje i aktivaciju drugih stanica imunskog sustava. Aktivacijom dendritičnih stanica one putuju do limfnog čvora i tamo, prezentacijom antigena, aktiviraju T-limfocite. T-limfociti se dijele na pomagačke T-limfocite (eng. *T-helper cells*, Th) i citotoksične T- limfocite (CTL). Th-limfociti upravljaju odgovorima B i T-limfocita. Th-limfociti tipa 2 (Th2) luče citokine, kao što su interleukini 4 i 5, kako bi pomogli u aktivaciji B-limfocita, te se radi toga koriste kao markeri stvaranja Th2 imunskog odgovora. B-limfociti se diferenciraju u plazma stanice koje proizvode protutijela ili memorijske stanice koje pri sljedećem kontaktu s antigenom stvaraju specifična protutijela, brže i u većoj količini (Slika 2). Takva aktivacija je bitna za stvaranje imunskog memorije i višegodišnju proizvodnju protutijela specifičnih za taj antigen. B-limfociti se mogu aktivirati i bez pomoći Th-limfocita, no takva aktivacija ne stvara memoriju, a produkcija protutijela je kratkotrajna. Protutijela imaju bitnu ulogu u zaštiti organizma od izvanstaničnih patogena. Pri tome imunoglobulin G (IgG) čini najveću populaciju protutijela u krvi, te se smatra

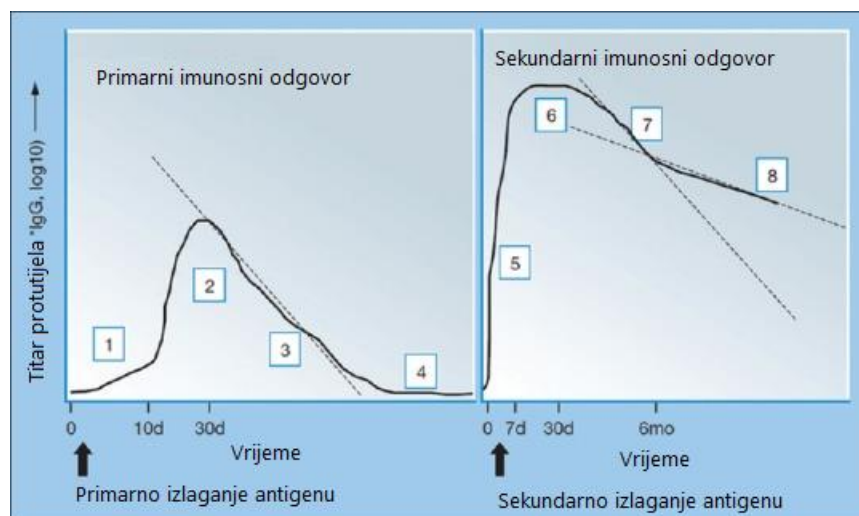
najbitnijim za zaštitu od specifičnih patogena, dok se imunoglobulin A (IgA) najviše stvara u mukoznim tkivima, pa se smatra bitnim faktorom u određivanju mukozne zaštite (<https://www.merckmanuals.com/>). Mukoznoj zaštiti pridonose i Th-limfociti tipa 17 (Th17), koji sudjeluju u borbi protiv izvanstaničnih patogena. CTL-ovi su, s druge strane, bitni za zaštitu od unutarstaničnih patogena. U aktivaciji CTL-ova sudjeluju APC-ovi te Th-limfociti tipa 1. Oni luče citokine poput interferona- γ (IFN- γ) koji se radi toga koristi kao biljeg Th1 imunskog odgovora. T-limfociti se također mogu diferencirati u memorijske stanice bitne za dugotrajnu imunsku zaštitu (Siegrist, 2018).



Slika 1: Prikaz slijeda imunskih reakcija nakon primjene cjepiva. APC, antigen-prezentirajuća stanica; CTL, citotoksični T-limfocit; Th (1 ili 2)-pomagački T limfocit (1 ili 2) (eng. *T-helper cell*). Preuzeto i prilagođeno iz Sokolova i sur., 2015, uz dozvolu *Royal Society of Chemistry*.

Način na koji se aktivira imunski sustav i stvara memorija ovisi o sastavu cjepiva koje se koristi, što je bitno prilikom razvoja novih vrsta cjepiva (Siegrist, 2018). To ujedno znači da je za izradu i racionalnu primjenu cjepiva potrebno poznavati mehanizme imunskog sustava koji pružaju

zaštitu protiv određenih patogena, što još uvijek nije poznato za većinu patogena. Dosadašnja cjepiva su razvijana empirijski, bez znanja o mehanizmu njihovog djelovanja, te se oslanjalo na produkciju protutijela kao glavnu mjeru zaštite od patogena. No, kod nekih intracelularnih patogena ipak je potrebna i aktivacija stanične imunosti (Schijns i sur., 2021).



Slika 2: Primarni i sekundarni odgovor imunskog sustava nakon izlaganja antigenu. d, dan; IgG, imunoglobulin G; mo, mjesec. Preuzeto i prilagođeno iz Siegrist, 2018, uz dozvolu Elsevier-a.

Idealno cjepivo moralo bi zadovoljiti ove kriterije: (i) biti sigurno za populaciju za koju je namijenjeno, (ii) efektivno u stvaranju sterilizirajuće imunosti koja spriječava razvoj bolesti, (iii) stvoriti dugotrajnu imunost putem aktivacije imunostne memorije, (iv) biti jednostavno za proizvodnju, transport i primjenu, te (v) biti prihvatljive cijene (Ada, 1991).

1.2. ADJUVANSI

Kako bi se pojačao imunski odgovor organizma na cjepivo, u cjepivo se može dodati adjuvans. Adjuvans (lat. *adjuvare* – “pomoći”), može na različite načine potaknuti aktivnost imunskog sustava, no ti mehanizmi djelovanja još uvijek nisu u potpunosti definirani. Neki od predloženih mehanizama su kontrolirano oslobađanje antigena putem stvaranja depoa, privlačenje imunskih stanica na mjesto injektiranja poticanjem produkcije citokina i kemokina te aktivacijom APC-ova

i inflammasoma (oligomera koji aktiviraju imunostani sustav). Te mehanizme djelovanja bitno je poznavati za racionalnu izradu cjepiva jer odabir odgovarajućeg adjuvansa omogućuje generiranje različitih imunostanih odgovora koji su bitni za borbu protiv specifičnih antigena (Awate i sur., 2013).

Prvi korišteni adjuvansi u cjepivima je alum, koji potiče Th2 imunostani odgovor putem stvaranja depoa i lokalnim iritacijskim učinkom. Alum se sastoji od aluminijevih soli, kao što su aluminijev hidroksid ili sulfat, čiji sastav varira od cjepiva do cjepiva. Jedan je od najčešće korištenih adjuvansa te se smatra sigurnim za upotrebu (Shaw i Feinberg, 2008).

MF59 je adjuvans sastavljen od skvalena i surfaktanata Tween[®]-a 80 i Span[®]-a 85. Iako mu točan mehanizam djelovanja nije utvrđen, zna se da ne ovisi o depo efektu, te da privlači i priprema APC-ove za imunostani odgovor. Bolji je od aluma u indukciji imunostanog sustava, što se očituje u manjoj količini antigena potrebnoj za postizanje prikladne zaštite kao i većoj širini imunostanog odgovora (većem broju meta na koje se aktivirao imunostani sustav) (Wilson i sur., 2017).

Imunostimulatorne molekule su adjuvansi prirodnog podrijetla (npr. monofosforil lipid A, MPLA) ili sintetskog podrijetla (npr. poliribonukleotidna: poliribocitidilna kiselina, poli (I:C)). Mehanizam njihovog djelovanja je aktivacija APC-ova. Pri tome imunostani odgovor ovisi o tipu receptora APC-a kojeg aktivira antigen. Uklapanjem imunostimulatornih molekula u nosače poput liposoma može se povećati njihova efikasnost budući da nosač pruža određenu zaštitu ukopljene molekule i/ili osigurava bolju prezentaciju molekula vezanih za površinu liposoma. MPLA je detoksificirani derivat lipopolisaharida bakterija, elemenata stanične membrane bakterija, dok su poli (I:C) i deoksicitozin-deoksigvanozin oligodeksinukleotidi (CpG ODN) sintetski analozi nukleinskih kiselina (Henriksen-Lacey i sur., 2011; Tandrup Schmidt i sur., 2016). Određene kombinacije imunostimulatornih molekula s klasičnim adjuvansima (alum, liposomi, emulzija tipa ulje u vodi, U/V) nazivaju se adjuvansnim sustavima (eng. *Adjuvant Systems, AS*). Takvi sustavi razvijeni su s ciljem proširenja imunostanog odgovora u odnosu na klasične adjuvanse koji su korišteni do tada, a koji nisu bili dovoljni za razvijanje cjepiva za određene patogene (npr. HIV), iskorištavanjem komplementarnog ili sinergističkog učinka njihovih sastavnica. Primjeri takvih kombinacija navedeni su u Tablici 1 (Garçon i Pasquale, 2017).

Tablica 1: Primjeri razvijenih AS-ova i njihov sastav

Naziv	Sastav adjuvansnog sustava
AS01B	Liposomi, 50 µg QS-21, 50 µg MPLA
AS01E	Liposomi, 25 µg QS-21, 25 µg MPLA
AS02	U/V emulzija, QS-21, MPLA
AS03	U/V emulzija, α-tokoferol
AS04	MPLA, alum

AS, adjuvanski sustav; MPLA, monofosforil lipid A;
 QS-21, saponinska frakcija 21 ekstrakta biljke *Quillaja saponaria*

Formulacije kationskih adjuvansa (eng. *cationic adjuvant formulation*, CAF) su liposomi ili emulzije razvijene iz potrebe za adjuvansom koji stvara Th1 odgovor, odnosno aktivira stanično posredovanu imunost. Kao baza CAF adjuvansa koristi se dimetildioktadecilamonijev bromid (DDAB), kvarterna amonijeva sol koja daje umjeren do jak Th2 odgovor te jak Th1 odgovor. S obzirom da su DDAB liposomi nestabilni, skloni agregaciji i flokulaciji, kombinirani su s imunomodulatorima koji ih stabiliziraju i pojačavaju imunosti odgovor. Takve kombinacije prikazane su u Tablici 2 (Pedersen i sur., 2018).

Tablica 2: Primjeri istraživanih liposomskih CAF adjuvansa i njihov sastav

Naziv	Sastav liposomskog CAF-a
CAF01	DDAB/TDB
CAF05	DDAB/TDB, poli (I:C)
CAF09	DDAB/monomikoilglicerol, poli (I:C)

CAF, formulacija kationskih adjuvansa; DDAB, dimetildioktadecilamonijev bromid; poli (I:C), poliribinozinska: poliribocitidilična kiselina; TDB, trehaloza 6,6-dibihenat

1.3. LIPOSOMI

Liposomi su sferične vezikule sastavljene od prirodnih ili sintetskih fosfolipida organiziranih u obliku jednog ili više fosfolipidnih dvoslojeva koji okružuju unutarnju/e vodenu/e fazu/e. Fosfolipidi su amfipatske molekule koji sadrže hidrofobne 'repove' (dva lanca masnih kiselina pod određenim kutom) i hidrofilne 'glave' sastavljene od glicerola i fosfatne kiseline. Fosfatna kiselina se može esterificirati organskim molekulama kao što su kolin, inozitol, serin, glicerol ili etanolamin, pri čemu u neutralnom mediju fosfolipidi pokazuju negativan naboj (npr. fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserin, fosfatidilinozitol) ili su neutralni (fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE)). Kationski liposomi sadrže lipide pozitivnog naboja poput dioleil-3-trimetilamonijevog propana (DOTAP) ili DDAB-a (Goyal i sur., 2005; Monteiro i sur., 2014; Vanić, 2012).

Unutar liposoma hidrofobni 'repovi' se orijentiraju jedni prema drugima kako bi uklonili nepovoljne interakcije s vodenim medijem, dok se hidrofilne 'glave' orijentiraju prema okolnom (unutarnjem i vanjskom) vodenom mediju. Jedna od prednosti liposoma je što mogu uklopiti hidrofilne, lipofilne i amfipatske tvari. Pri tome se hidrofobne tvari smještaju u unutrašnjost fosfolipidnog dvosloja (lipidna regija), hidrofilne tvari u vodeno okruženje u središtu liposoma, dok se amfipatske tvari smještaju na granicu između fosfolipidnog dvosloja i vodenog medija (Goyal i sur., 2005; Monteiro i sur., 2014; Vanić, 2012). Zbog svog fosfolipidnog sastava liposomi su biorazgradivi i biokompatibilni, mogu smanjiti toksičnost tvari koju prenose, povećati joj stabilnost, te se mogu primijeniti različitim putevima primjene (Kour i sur., 2018).

Izuzev amfipatske prirode fosfolipida, na fizičko-kemijska svojstva liposoma utječe građa fosfolipida. Duljina masnih kiselina vezanih za glicerol unutar molekule fosfolipida određena je brojem ugljikovih atoma koji čine masnu kiselinu. Zasićenost masnih kiselina određena je prisutnošću dvostruke veze između ugljikovih atoma u lancu što masnu kiselinu čini nezasićenom, dok je u nedostatku dvostruke veze masna kiselina zasićena. Ta dva svojstva utječu na temperaturu faznog prijelaza (T_c) fosfolipida. T_c je temperatura pri kojoj fosfolipidni dvosloj mijenja svoju fluidnost. Ispod te temperature dvosloj je u gel stanju koji je ograničene fluidnosti, no zagrijavanjem iznad T_c , nastaje stanje tekućih kristala koje ima veću fluidnost. Ukoliko je dvosloj građen od različitih vrsta fosfolipida, fazni prijelaz bit će definiran širokim rasponom temperature, no ukoliko se koriste sintetski lipidi točno određenog sastava taj raspon je vrlo uzak. Vrijednost

T_c-a je niža ukoliko su liposomi bogatiji fosfolipidima nezasićenih masnih kiselina ili onim s kraćim lancima jer se tada stvara manje interakcija među lipidnim dijelovima fosfolipida. S promjenom temperature mijenja se i permeabilnost, pri čemu je ona najveća pri T_c. Poznavanje T_c-a bitno je prilikom izrade liposoma te utječe na permeabilnost, agregaciju ili vezanje liposoma za proteine plazme te njihovu stabilnost (Vanić, 2012). Na fizikalna svojstva liposoma značajno utječe kolesterol koji se ugrađuje između lanaca fosfolipidnog dvosloja i stvara dodatne interakcije među njima, time smanjujući mobilnost i permeabilnost fosfolipidnog dvosloja (Çağdaş i sur., 2014).

Liposomi se mogu klasificirati u četiri skupine različitih svojstava. Konvencionalni liposomi sastavljeni su samo od neutralnih i/ili negativno nabijenih fosfolipida te mogu sadržavati i kolesterol. Oni se nakon ulaska u organizam brzo akumuliraju u stanicama retikuloendotelnog sustava što ih čini značajnim za izradu cjepiva.

Sterički stabilizirani ili “stealth” liposomi imaju jako dugo vrijeme polueliminacije (do 48 h) jer sadrže hidrofilne polimere vezane za fosfolipidnu membranu (Vanić, 2012). Polietilenglikol (PEG) je najčešće korišten polimer koji se usidruje u membranu, najčešće putem distearoil-PE-a. Ti hidrofilni polimeri predstavljaju steričku barijeru, čime preveniraju prepoznavanje liposoma od strane stanica retikuloendotelnog sustava što sprječava i njihovo brzo uklanjanje iz cirkulacije (Immordino i sur., 2006).

Površinski modificirani liposomi su oni koji na svojoj površini vežu ligande (protutijela, proteine ili peptide, ugljikohidrate), što omogućuje ciljanu dostavu uklopljenih tvari do točno određenih stanica i tkiva. Ukoliko liposomi kao ligande sadrže protutijela ili fragment protutijela zovu se imunoliposomi (Riaz i sur., 2018).

Polimorfni liposomi uključuju liposome osjetljive na pH, temperaturno-osjetljive liposome te kationske liposome kojima se, radi promjena uvjeta u biološkom okruženju u kojem se nalaze (pad pH, porast temperature, reakcija lipida s DNA), mijenja integritet fosfolipidnog dvosloja, čime se iskorištava svojstvo lipidinog polimorfizma. Liposomi osjetljivi na pad pH pri tome izbjegavaju razgradnju uklopljene aktivne (djelatne) tvari u lizosomu, jer svoj sadržaj oslobađaju u citoplazmu u endosomu (prije kontakta s lizosomom), dok kationski liposomi tvore komplekse s negativno nabijenom membranom stanice te time otpuštaju negativno nabijenu DNA u stanicu (Vanić, 2012; Hafez i Cullis, 2001).

Liposomi se mogu podijeliti u skupine i s obzirom na broj i organizaciju fosfolipidnih dvosloja od kojih se sastoje, a koji se ujedno razlikuju i po veličini. Pri tome postoje unilamelarni, oligolamelarni, multilamelarni i multivezikularni liposomi. Unilamelarni liposomi su sastavljeni od jednog fosfolipidnog dvosloja, multilamelarni liposomi su sastavljeni od više koncentričnih fosfolipidnih dvosloja, dok su multivezikularni liposomi sastavljeni od više ne-koncentrično položenih dvoslojeva (Vanić, 2012).

Virosomi predstavljaju modificirane liposome, najčešće dodatkom površinskih proteina virusa influence (gripe), hemaglutinina (HA) i neuraminidaze (NA) na liposome, no mogu se koristiti i hemaglutinirajući i fuzijski protein hemaglutinirajućeg virusa Japana (HVJ). Prednost virosoma nad liposomima je u tome što zadržavaju funkciju HA virusa influence, kao i proteina HVJ-a, koji omogućuju fuziju virosoma s membranom APC-a i time selektivnu dostavu antigena (Liu i sur., 2015).

Arheosomi su liposomi izrađeni od lipida staničnih membrana bakterija domene *Archaeobacteria*, a karakterizirani su većom stabilnosti lipida u odnosu na one prisutne u konvencionalnim liposomima. Arheosomi se istražuju za aktivaciju imunskog sustava te poboljšavaju prihvaćanje antigena u APC-ove (Kaur i sur., 2015).

Transferosomi su liposomi s vrlo fleksibilnom (elastičnom) membranom, koja omogućuje lakši prolaz transferosoma i dostavu uklopljene djelatne tvari kroz *stratum corneum* u kožu u odnosu na konvencionalne (klasične) liposome. Deformabilnost membrane transferosoma postignuta je destabilizacijom fosfolipidnog dvosloja korištenjem rubnih aktivatora, tj. surfaktanata (natrijev deoksikolat, Tween[®] 80 ili Span[®] 80) (Fernández-García i sur., 2019).

Etosomi su liposomi u koje je inkorporirano i do 45% (w/w) etanola. Etanol etosomima osigurava deformabilnost (elastičnost) membrane, a budući da je prisutan i u vanjskoj vodenoj fazi etosomskih disperzija, smanjuje organiziranost intercelularnih lipida kože, povećavajući im fluidnost čime se olakšava dostava elastičnih etosoma i/ili uklopljene djelatne tvari u dublje slojeve kože (Mishra i sur., 2008; Verma i Pathak, 2010).

Primjenom cjepiva alternativnim putevima, putem sluznica (mukoza), se uz sistemska stvara i lokalna imunost, što nije svojstvo injektiranih cjepiva. Stvaranjem lokalne imunosti putem proizvodnje sekretornog IgA i IgG štiti se mjesto ulaska patogena u organizam. Intranazalnom

primjenom se pri tome stvara i najjača sistemska imunost u usporedbi s primjenom cjepiva putem drugih sluznica. Primjenom cjepiva na mukoznom tkivu stvara se zaštita i na udaljenim mukoznim tkivima. Prednost mukoznih cjepiva je ujedno i jednostavni način korištenja koji ne zahtijeva sterilni pribor ili posebno izučeno osoblje, kao i bolja suradljivost pacijenata zbog neinvazivne primjene (Neutra i Kozlowski, 2006).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cijepljenje predstavlja jednu od najefikasnijih javno-zdravstvenih mjera prevencije razvoja određenih infektivnih bolesti, zaslužnu za produljenje prosječne životne dobi ljudi, povećanje kvalitete života i smanjenje troškova u zdravstvu. Cjepiva su značajno pridonijela smanjenju morbiditeta i mortaliteta od nekih zaraznih bolesti, te eradikaciji (boginje) ili značajnom smanjenju incidencije zaraznih bolesti (npr. ospice) (Koff i Schenkelberg, 2020; Greenwood, 2014).

Unatoč velikim napretcima na području imunizacije, postoje još brojni neriješeni problemi. Za mnoge zarazne bolesti još nisu razvijena cjepiva, a neka od razvijenih cjepiva ne pružaju adekvatnu ili cjeloživotnu zaštitu, uzrokuju ozbiljne nuspojave ili su nepraktična za korištenje. Osim profilaktičkih cjepiva, novija istraživanja bave se razvojem terapijskih cjepiva, koja bi pomogla u liječenju bolesti, a neka od njih namijenjena su za nezarazne bolesti, ponajprije tumore (Koff i Schenkelberg, 2020; Plotkin, 2005).

Liposomi su pokazali veliki potencijal kao dostavljački/terapijski sustav za cjepiva, s obzirom da mogu doprinijeti aktivaciji imunskog sustava te se njihove karakteristike (naboj, veličina, sastav ili način uklapanja antigena) mogu prilagoditi zahtjevima pojedinih cjepiva. Korištenjem liposoma otvara se mogućnost korištenja alternativnih puteva primjene cjepiva (intranazalno, oralno, transdermalno), čime se aktivira mukozna imunost, što pruža dodatnu zaštitu te se smanjuje potreba za osiguranjem zahtjeva sterilnosti proizvodnje. Korištenjem cjepiva s liposomima poboljšavaju se farmakokinetička i farmakodinamička svojstva antigena: veća stabilnost, smanjenje potrebne doze, ciljana dostava do stanica imunskog sustava te ciljana unutarstanična dostava (citosol, endosom). Osim toga, liposomi su značajni radi svoje biorazgradivosti, biokompatibilnosti te visokog kapaciteta uklapanja antigena (Neutra i Kozlowski, 2006; Wang i sur., 2019).

Ovaj rad donosi pregled istraživanja koja koriste liposome kao dostavljački sustav za antigene, te dosadašnja iskustva u primjeni registriranih liposomskih cjepiva. Dostupna istraživanja sistematizirana su s obzirom na vrstu bolesti za koju je sustav razvijan.

3. MATERIJALI I METODE

Literatura korištena u svrhu izrade ovog diplomskog rada sastavljena je od znanstvenih radova dobivenih pretraživanjem *online* znanstvenih baza podataka (*PubMed*, *Science Direct*), te drugih stručnih i znanstvenih knjiga i članaka iz stručnih časopisa dostupnih u elektroničkom obliku. Pritom su korištene ključne riječi na engleskom jeziku vezane za temu ovog diplomskog rada kao što su: *liposomes*, *vaccines*, *adjuvants*, *prophylactic effect*, *HIV*, *herpes zoster*, *influenza*, *viral hepatitis*, *malaria*, *transferosomes*, *ethosomes*, *cationic liposomes*, *Inflexal V[®]*, *Epaxal[®]*, *tumor prevention*, *immunotherapy*, te drugi.

Znanstvena literatura proučavana je analitički i kritički, radi određivanja znanstvenog i stručnog problema, a zatim i istraživanja trenutačnih znanja o temi ovog diplomskog rada. Pri tome su traženi odgovori na specifična pitanja vezana za temu ovog diplomskog rada. Iz radova su izdvojeni bitni rezultati istraživanja, dijelovi rasprava i zaključci. Na temelju tih saznanja oblikovana su vlastita razmatranja vezana za problematiku teme ovog diplomskog rada.

4. RASPRAVA

4.1. ZNAČAJ FIZIČKO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA LIPOSOMA NA UČINKOVITOST CJEPIVA

Prilikom razvoja liposoma kao nosača cjepiva/antigena bitno je prilagoditi fizikalna svojstva koja imaju utjecaj na efikasnost liposoma. Među tim svojstvima su veličina i lamelarnost liposoma, naboj i fluidnost membrane, način vezanja antigena za liposome te prisutnost imunostimulatornih lipida.

Veličina liposoma je značajan fizikalni parametar koji utječe na vrstu stvorenog imunskog odgovora. Brewer i sur. (1998) su pratili reakciju imunskog sustava miševa pri supkutanoj primjeni lipidnih vezikula koje sadrže ovalbumin (OVA), čiji su srednji promjeri iznosili 560, 225 i 155 nm. Proizvodnja IFN- γ služila je kao marker aktivacije Th1 odgovora, a proizvodnja interleukina-5 kao marker aktivacije Th2 odgovora u limfnim čvorovima. Određeno je kako je granica veličine lipidnih vezikula za aktivaciju Th1 odnosno Th2 odgovora između 225 i 155 nm, pri čemu su vezikule promjera 155 nm ili manje aktivirale Th2 odgovor, a one od 225 nm ili veće Th1 odgovor. Sličan zaključak donijeli su i Badiee i sur. (2012), koji su supkutano inokulirali miševima s liposomima različitog srednjeg promjera (100 nm, 400 nm i 1000 nm), a kao antigen su koristili rekombinantni površinski glikoprotein 63 vrste *Leishmania major*. Zaključili su da liposomi promjera 100 nm stvaraju Th2 odgovor. Liposomi srednjih promjera 400 i 1000 nm stvarali su Th1 odgovor te pritom nisu zabilježene značajne razlike u vrsti imunskog odgovora među liposomima različite veličine (400 i 1000 nm).

Veličina liposoma utječe i na transport liposoma s mjesta injektiranja do limfnog čvora. Veći liposomi zadržavaju se na mjestu injektiranja, te time stvaraju depo iz kojeg se postepeno prenose do limfnog čvora putem APC-a s kojima dolaze u kontakt na mjestu injekcije. Time se produljuje vrijeme kontakta antigena sa stanicama imunskog sustava te povećava prihvaćanje antigena u APC-ove. Prema Marasiniju i sur. (2017), nanočestice veće od 200 nm stvaraju depo, dok one manje od 200 nm slobodno putuju do limfnih čvorova te dolaze u kontakt s njihovim stanicama što je bitno za ciljanu dostavu antigena i aktivaciju specifičnih stanica imunskog sustava.

Naboj na površini liposoma drugi je značaj fizikalni parametar koji može utjecati na jačinu stvorene imunskog reakcije. Kraaijeveld i sur. (1984) su ispitivali imunski odgovor liposoma različitog

površinskog naboja. Neutralni liposomi pripremljeni su iz kolesterola i dipalmitoil-PC-a u molarnom omjeru 10:90, pozitivno nabijeni liposomi od kolesterola, oktadecilamina i dipalmitoil-PC-a u molarnom omjeru 10:15:75, dok su negativno nabijeni liposomi sadržavali kolesterol, fosfatidnu kiselinu i dipalmitoil-PC u molarnom omjeru 10:45:45. Kao antigeni su korišteni inaktivirani virusi šume Semliki (eng. *Semliki forest virus*) pomiješani s liposomima. Jačina imunskog odgovora određena je mjerenjem količine stvorenih neutralizirajućih protutijela. Pozitivno nabijeni liposomi stvorili su najjači imunski odgovor, negativno nabijeni liposomi nešto slabiji odgovor, a neutralni liposomi nisu imali značajan utjecaj na stvaranje protutijela. Badiie i sur. (2009a) su proučavali stvaranje Th1 odgovora na neutralne dipalmitoil-PC/kolesterol liposome (2:1, molarni omjer) s uklopljenim rekombinantnim površinskim glikoproteinom 63, vrste *Leishmania major*, kao antigenom. Pozitivno nabijeni liposomi dodatno su sadržavali DDAB, dok su negativno nabijeni liposomi umjesto kationskog lipida sadržavali diacetil-fosfat, pri čemu je molarni omjer (fosfo)lipida liposoma iznosio 2:1:1. Najjači Th1 odgovor stvorili su neutralni liposomi, nešto slabiju reakciju su izazvali pozitivno nabijeni liposomi, a negativni nisu stvorili Th1 odgovor te su autori konstatirali da oni stvaraju samo Th2 odgovor. U ovom slučaju su pozitivno nabijeni liposomi stvorili najveću količinu specifičnih protutijela protiv antigena, a negativno nabijeni najmanju. Yotsumoto i sur. (2007) su, s druge strane, pokazali kako negativno nabijeni liposomi izrađeni od PC-a, fosfatidilserina (PS) i kolesterola u molarnom omjeru 1:1:2, s OVA kao antigenom, potiču proizvodnju IFN- γ u Th1 limfocitima. Negativno nabijeni liposomi s fosfatidnom kiselinom umjesto PS nisu pokazali proizvodnju IFN- γ ukazujući da i izbor 'glave' fosfolipida može utjecati na imunski odgovor. Prema Henriksen-Laceyju i sur. (2010) pozitivno nabijeni liposomi izrađeni od CAF01 sustava, molarnog omjera sastavnica 9:1 pokazali su mogućnost stvaranja deo učinka. Mogućnost stvaranja deoa kod pozitivno nabijenih liposoma potvrdili su i Wang i sur. (2014) koristeći liposome izrađene od DOTAP-a. Nadalje, Ma i sur. (2011) pratili su učinak gustoće naboja na imunski odgovor koristeći liposome različitih omjera koncentracija DOTAP-a i dioleil-PC-a. Utvrdili su kako veća površinska gustoća naboja pozitivno utječe na prezentaciju antigena APC-ovima, kao i na sazrijevanje dendritičnih stanica, ali da promjena koncentracije liposoma u suspenziji nema isti učinak. Takav efekt potencijalno je posljedica privlačenja pozitivno nabijenih liposoma i negativno nabijene membrane APC-a (Marasini i sur., 2017).

Fluidnost membrane liposoma ovisi o Tc lipida koji ga sačinjavaju, što znači da ujedno ovisi i o zasićenosti masnih kiselina te njihovoj duljini. Ukoliko je Tc membrane viša od fiziološke temperature tijela (37°C), tada će, nakon *in vivo* primjene, membrana biti u gel fazi, a ukoliko je Tc manja od te temperature, membrana će biti u fazi tekućih kristala (Tandrup Schmidt i sur., 2016). Yasuda i sur. (1977) proučavali su kako dodatak fosfolipida različite Tc (dioleil-PC, -22 °C; dilauroil-PC, 0 °C; dimiristoil-PC, 23 °C; dipalmitoil-PC, 41 °C; distearoil-PC, 57 °C) utječe na imunogenost liposoma koji sadrži dinitrofenilaminokaproil-PE kao lipidni antigen, te su utvrdili da porast Tc-a uzrokuje porast imunogenosti liposoma s obzirom na proizvodnju protutijela. Liposomi istog sastava, ali vezani za antigen N-(2,4-dinitrofenil)-β-alanilglicilglicin preko PE-a pokazali su najjaču imunogenost za fosfolipide intermedijarnih vrijednosti Tc-a. U istraživanjima supkutane primjene liposoma koji sadrže PC iz jajeta (EPC) (Tc < 0°C), dipalmitoil-PC (Tc = 41 °C) ili distearoil-PC (Tc = 54 °C) i kolesterol u omjeru 2:1 te rekombinantni površinski glikoprotein 63 antigen parazita *Leishmania major* provedene na miševima, su pak liposomi s dipalmitoil-PC-om ili distearoil-PC-om proizveli jači Th1 odgovor od liposoma s EPC-om, koji su pak proizveli jači Th2 odgovor (Badiee i sur., 2009b). Na Tc utječe i prisutnost kolesterola u fosfolipidnom dvosloju. On uzrokuje drugačiju organizaciju fosfolipida dvosloja tako da stvara tekuću fazu pravilne strukture, te time uklanja fazni prijelaz membrane (Henriksen-Lacey i sur., 2011). OVA-liposomi bez i različitim udjelima kolesterola (10%, 20%, 30% i 43%) ubrizgani intraperitonealno u miševima pokazali su kako najjaču proizvodnju protutijela uzrokuje izostanak kolesterola u membrani liposoma (Nakano i sur., 2002). Druga studija pokazala je kako liposomi sastavljeni od PC, kolesterola i PG-a porastom udjela kolesterola (7:0:1, 7:2:1, 7:6:1 i 7:10:1) stvaraju jači imunski odgovor. S druge strane su za liposome sastavljene od dipalmitoil-PC-a, kolesterola i dipalmitoil-PG-a pri istom porastu udjela kolesterola najjači imunski odgovor stvorili liposomi molarog omjera sastavnica 7:6:1 (Kersten i sur., 1988). Smatra se kako viša Tc fosfolipida, koja pridonosi manjoj fluidnosti membrane pri fiziološkim temperaturama, stvara bolju humoralnu i staničnu imunost. Jedno od mogućih objašnjenja takve pojave je veća permeabilnost fluidnih membrana zbog kojih se gubi antigen. Međutim, utjecaj kolesterola još uvijek nije u potpunosti razjašnjen (Watson i sur., 2012; Giddam i sur., 2012), slično kao i utjecaj lamelarnosti liposoma na imunogenost. Tako su Giddam i sur. (2012) iznijeli tvrdnju da bi multilamelarni liposomi bili prikladniji za depo efekt jer se antigen iz njih otpušta sporije, za razliku od unilamelarnih liposoma. S druge strane, Shek i sur. (1983) pokazali su suprotno. Multilamelarni liposomi (330 ± 70 nm) i

unilamelarni liposomi veličine (240 ±50 nm) sastavljeni od dimiristoil-PC-a, kolesterola i diacetilfosfata u molarnom odnosu 7:2:1, uspoređivani su na temelju količine stvorenih specifičnih IgG protutijela protiv goveđeg serumskog albumina. Liposomi su primijenjeni miševima intraperitonealno tako da je svaki miš dobio istu količinu lipida i proteina. Unilamelarni liposomi pokazali su se superiornijim u količini proizvedenih protutijela. Bhowmick i sur. (2010) su pak izradili liposome od distearoil-PC-a, kolesterola i sterilamina u molarnom omjeru 7:2:2 i u njih inkorporirali antigen parazita *Leishmania donovani*. Multilamelarni i unilamelarni liposomi pokazali su jak Th1 odgovor, kao i indukciju specifičnih protutijela. Watson i sur. (2012) napominju kako multilamelarni liposomi usmjeravaju imunosnu reakciju prema stvaranju Th2 odgovora. Glavni problemi ispitivanja lamelarnosti su korištenje različitih metoda izrade, razlike u veličini liposoma te uspješnosti uklapanja antigena (Giddam i sur., 2012).

Način asocijacije antigena s liposomom također može utjecati na konačni imunosni odgovor. Guan i sur. (1998) su pratili aktivaciju humoralne i stanične imunosti primjenom MUC1 peptida BP25 koji je bio uklopljen u liposome ili vezan za površinu liposoma putem laurilcisteina. Liposomi su izrađeni od distearoil-PC-a, kolesterola i dimiristol-PG-a u molarnom omjeru 3:1:0,25 uz MPLA. Miševi su imunizirani jednom supkutano ili dvaput, supkutano i intraperitonealno, s razmakom od 2 tjedna. Oba oblika su stvorila jak odgovor CTL-a, ali samo je antigen vezan za površinu liposoma aktivirao produkciju protutijela, što autori smatraju posljedicom izostanka kontakta antigena uklopljenog u liposome s B-limfocitima. Antigen pomiješan s praznim liposomima nije aktivirao imunosni sustav. S druge strane, liposomi pripravljeni od EPC-a i kolesterola koji su uklopili ili na površini imali vezan peptid polio virusa tipa 3VP-2 putem glutaril-PE-a, aktivirali su produkciju protutijela. Peptid vezan za površinu stvorio je jači primarni odgovor, koji je naglo pao nakon 27 dana od dana imunizacije i nije se pojačao primjenom *booster* doze, dok je uklopljeni antigen nakon druge imunizacije aktivirao jaki imunosni odgovor, što može biti povezano s fluidnošću membrane (Tan i sur., 1991). Aktivacija produkcije protutijela putem uklopljenih antigena smatra se posljedicom otpuštanja antigena iz liposoma (Schwenderer, 2014). Kovalentno vezanje antigena za lipidni nosač može dovesti do promjene strukture proteina i maskiranja bitnih epitopa. Watson i sur. (2011) su stoga razmatrali model nekovalentnog vezanja za liposome putem monovalentne ili trovalentne metalne kelacije s nitrilotriocetnom kiselinom. Pri tome su kao antigene koristili N-terminalni peptid membranske proksimalne regije (MPR) gp41 HIV-a i OVA. Kovalentno vezani

antigeni stvorili su puno jači imunosni odgovor, dok između dviju razina kelacije nije bilo razlike u jačini stvorenog imunosnog odgovora.

Yanasarn i sur. (2011) su proučavali utjecaj istovremene primjene praznih liposoma različitog naboja pomiješanih s antigenom na aktivaciju imunosnog odgovora. Liposomi izrađeni od neutralnog dioleil-PC-a, pozitivno nabijenog DOTAP-a ili negativno nabijene dioleilfosfatidne kiseline i kolesterola (1:1, m/m, omjer lipida i kolesterola) pomiješanih s OVA-om ili protektivnim antigenom bakterije *Bacillus anthracis* primijenjeni su za imunizaciju miševa. Imunizacija se provodila supkutano 3 puta za OVA ili 2 puta za protektivni antigen, s razmakom od 2 tjedna između doza. Dok je neutralni lipid dioleil-PC bio slabo imunogen, DOTAP i dioleilfosfatidna kiselina pokazali su snažnu imunogenost. Istraživanja s dioleilfosfatidnom kiselinom su osim poticanja proizvodnje protutijela također pokazala i proizvodnju CTL-a, te odgođen razvoj tumora B16-OVA stanica. Do kraja studije, 4 od 5 miševa kojima su injektirane tumorske stanice bili su izliječeni, dok su tumori kontinuirano rasli u kontrolnoj skupini. Na osnovu dobivenih rezultata autori su zaključili da neovisno o načinu asocijacije antigena s liposomom dolazi do indukcije imunosnog odgovora (Wang i sur., 2019).

4.2. VIRUSNI HEPATITIS

Virusni hepatitis je upala jetre uzrokovana virusnom infekcijom jetre. Postoji 5 virusa koji uzrokuju virusni hepatitis: hepatitis virus A, B, C, D i E. Simptomi bolesti očituju se kroz vrućicu, proljev i mučninu, abdominalne bolove, gubitak apetita te tamno obojen urin i žuticu. Hepatitis A i hepatitis E virusi uglavnom uzrokuju akutni hepatitis, čiji se simptomi povlače bez liječenja nakon nekoliko tjedana. Prenose se fekalno-oralnim i seksualnim putem (hepatitis A) ili nedovoljno obrađenom hranom, primjerice mesom zaraženih životinja na čovjeka poput svinjetine ili školjkaša (hepatitis E) (<https://www.niddk.nih.gov/>). Većina ljudi se oporavi od hepatitisa A i razvije cjeloživotnu imunost, no postoji i dio koji razvije fulminantni hepatitis koji je smrtonosan (<https://www.who.int/>).

Epaxal[®] (Crucell/Berna Biotech, Švicarska) je inaktivirano virosomsko cjepivo protiv hepatitisa A registrirano 1994. godine. Cjepivo je sastavljeno od fosfolipida dioleil-PE-a i dioleil-PC-a (25:75, m/m) organiziranih u unilamelarne vezikule promjera 150 nm. Virusne čestice hepatitisa A soja

RG-SB inaktiviraju se putem formalina, te adsorbiraju na površinu virosoma. Cjepivo se primijenjuje intradermalno, supkutano ili intramuskularno u obliku prve doze i *booster* doze, primijenjene nakon 12 mjeseci, nakon čega se razvija dugoročna potpuna imunost (prema matematičkim modelima 95% ljudi zaštićeno je u prosjeku za razdoblje od 55,5 godina). U usporedbi s cjepivom gdje su virusne čestice vezane za alum kao adjuvans, virosomsko cjepivo se pokazalo jednako učinkovitim pri primjeni dvije doze, a uzrokovalo je i do 2,5 puta manje lokalnih nuspojava. Prednost virosomskog cjepiva ogleda se kroz razvoj imunosti nakon samo jedne doze, što ga čini idealnim za putnike koji iz niskoendemskih prostora odlaze u visokoendemska područja za hepatitis A, te im najčešće treba brza zaštita. Druga doza se pri tome može primjeniti i do 8 - 11 godina kasnije. Ujedno je dokazano i kako se Epaxal[®] i cjepivo s alumom mogu zamjenjivati, što znači da ukoliko se jedno koristi kao primarna doza, drugo može poslužiti kao *booster* doza (Bovier, 2008).

Hepatitis B, C i D su oblici kod kojih akutna bolest može prijeći u kroničnu bolest. Ovi oblici se prenose krvlju, ali i preko drugih tjelesnih tekućina (hepatitis B i D). Kod hepatitisa B, prijelaz u kronično stanje se događa u oko 95% djece i novorođenčadi i oko 5% odraslih osoba, a za hepatitis C se taj prijelaz događa u oko 75 - 85% slučajeva. Infekcija hepatitisom D javlja se samo kao koinfekcija uz hepatitis B (<https://www.niddk.nih.gov/>). Trenutačno dostupna cjepiva protiv hepatitisa B na hrvatskom tržištu su suspenzije površinskih antigena hepatitisa B dobivene metodom rekombinantne DNA adsorbiranih na alum, uz dodatak AS04 adjuvansa te se primijenjuju u 3, odnosno 4 doze (<https://www.halmed.hr/>).

Umjesto intramuskularne imunizacije, novija istraživanja koriste transdermalne sustave s ciljem aktivacije vrlo imunosno aktivnih slojeva dermisa i epidermisa, bogatih APC-ovima koji bi mogli poboljšati imunosnu reakciju. Stoga su kao novu metodu imunizacije protiv hepatitisa B, Mishra i sur. (2008) proučavali etosome. Ovi sustavi, izrađeni metodom klasičnog, mehaničkog dispergiranja fosfolipida, etanola i vode, su sadržavali 25% etanola, 2% PC-a iz soje i površinski antigen hepatitisa B koji je uklopljen u unutarnju vodenu fazu etosoma. Studije permeabilnosti kroz kožu pokazale su visoku kumulativnu permeabilnost od 67,2% u odnosu na konvencionalne liposome i slobodan antigen čija je permeabilnost bila 16,4% i 4,2%. Cjepivo je nakon dvije primjene pokazalo Th1 odgovor, kao i mukoznu i sistemska zaštitu protutijelima IgG i IgA tipa, s time da je sistemska zaštita bila usporediva s intramuskularno primijenjenim antigenom.

Qiu i sur. (2016) razvijali su DNA cjepivo protiv hepatitisa B koje bi se primijenjivalo putem mikroigli i pri tome su kao nosač plazmidnog vektora koristili kationske liposome sastavljene od dipalmitoil-PC-a, DDAB-a i kolesterola u 2:1:1 molarnom omjeru s ili bez dodatka CpG ODN adjuvansa. Formulacija je u prekliničkoj studiji na miševima primijenjivana putem mikroigli dva puta s razmakom od 3 tjedna. Pri tome su liposomi bili zaslužni za postepeno otpuštanje uklopljenog vektora i time omogućili produljenu genetsku ekspresiju antigena. Proizvodnja IgG protutijela bila je najveća u kombinaciji s CpG ODN-om, što je ukazivalo na njihov sinergizam, no autori smatraju kako je za usmjerenje imunskog odgovora prema Th1 odgovoru zaslužan CpG ODN. U usporedbi s intramuskularno primijenjenim formulacijom istog sastava u istoj dozi, istraživana formulacija je pokazala jači imunski odgovor.

Trenutno na tržištu ne postoji cjepivo za hepatitis C, ali su u literaturi opisana istraživanja usmjerena razvoju cjepiva za prevenciju tog tipa hepatitisa. Jiao i sur. (2003) su ispitali mogućnost primjene kationskih liposoma za prijenos plazmidne DNA koja sadrži gen za proizvodnju nestrukturnog proteina 3 (NS3). Pokazali su kako u odnosu na samu plazmidnu DNA, liposomi sastavljeni od EPC-a i DDAB-a u ekvimolarnom odnosu pokazuju puno veću produkciju citokina, te se stvara Th1 odgovor koji je ključan za borbu protiv virusa hepatitisa C. Drugi kationski liposomi, građeni od DOTAP-a ili dioleiletil-PC-a i EPC-a u molarnom omjeru 1:1, su pokazali lošiji rezultat što se pripisalo lošijoj fuzogenosti korištenih (fosfo)lipida s membranom APC-ova. Ti liposomi ujedno su proizveli i interleukin 12 koji je bitan za aktivaciju Th1 limfocita i staničnog imunskog odgovora. Liposomi sastavljeni od DDAB-a i dioleiletil-PC-a u ekvimolarnom omjeru, unatoč boljoj fuzogenosti od DDAB: EPC liposoma, također su proizveli lošiji imunski odgovor, što se pripisuje nemogućnosti proteina intersticija da ga neutraliziraju, te se on na mjestu injektiranja prvo veže za negativno nabijene stanice mišićnog sustava umjesto za APC, te proizvodi Th2 odgovor. U kasnijem radu, Jiao i sur. (2004) pokazali su i kako CpG ODN može pojačati imunski odgovor, odnosno proizvodnju interleukina 12, ukoliko se inkorporira u DDAB:EPC liposome koji sadrže rekombinantni NS3 antigen, te kako takvi liposomi štite protein i CpG ODN od izvanstanične razgradnje i stvaraju depo efekt bitan za proizvodnju jakog humoralnog i staničnog imunskog odgovora protiv NS3 antigena. Landi i sur. (2017) su pak utvrdili jači humoralni i stanični imunski odgovor na rekombinantne glikoproteine E1E2 hepatitisa C u kombinaciji s arheosomima ili cikličkim diadenozin monofosfatom, nego s alumom ili MPLA kao adjuvansima.

Hecolin[®] (Xiamen Innovax Biotech Co., Ltd., Kina) je cjepivo namijenjeno prevenciji hepatitisa E, te se koristi jedino u Kini. Radi se o virusu sličnim česticama adsorbiranim na čestice aluma. Cjepivo se primjenjuje u starijih od 16 godina u 3 doze (<https://www.who.int/>). S ciljem profilakse hepatitisa E, Arankalle i sur. (2009) su uspoređivali imunosni odgovor liposomima zaštićene kombinacije DNA i proteina hepatitisa E u odnosu na slobodnu DNA (vektore) ili kombinaciju slobodne DNA i odgovarajućih proteina. DNA se sastojao od plazmidnog vektora koji prenosi ORF2 gen ili regiju ORF2 gena koja kodira neutralizirajući epitop hepatitisa E. Liposomi su bili sastavljeni od PC-a, dioleil-PE-a i DOTAP-a u 4:2:1 molarnom omjeru. Slobodna DNA, sama ili u kombinaciji sa ORF2 proteinom, kao i slobodna DNA neutralizirajućeg epitopa, nije potaknula proizvodnju protutijela protiv hepatitisa E. Iako je količina stvorenih protutijela bila usporediva između dviju liposomskih formulacija, u 2 od 4 majmuna imunizirana liposomskom kombinacijom DNA i proteina ORF2 utvrđena je infekcija nakon izlaganja virusu, što nije bio slučaj kod liposoma koji su sadržavali kombinaciju DNA i proteina neutralizirajućeg epitopa, gdje su oba majmuna ostala zaštićena. Kulkarni i sur. (2016) su ispitali kako rekombinantni neutralizirajući epitop korišten kao antigen, uklopljen u liposome sastavljene od PC-a, kolesterola i stearilamina utječe na imunosni sustav. Koristili su 2 doze u razmaku od 4 tjedna i pratili odgovore imunosnog sustava miševa do 420 dana nakon imunizacije. Rezultati su pokazali da je cjepivo potaknulo proizvodnju Th i B memorijskih limfocita, te je dobiven konstantan titar IgG protutijela protiv hepatitis E virusa na osnovu čega su autori zaključili da cjepivo razvija cjeloživotnu imunost.

4.3. GRIPA

Gripa (influenca) je sezonska bolest koja se javlja na jesen i zimu, a uzrokuju ju tri tipa virusa gripe: A, B i C. Radi se o infekciji dišnog sustava s naglom pojavom simptoma, povišenom temperaturom, glavoboljom, malaksalosti, a kasnije i kašljem i grloboljom. Prođe najčešće spontano nakon 7 dana, no u nekih osoba, kao što su stariji i kronični bolesnici, moguće su komplikacije koje mogu biti i smrtonosne, što pogađa između 300 - 500 tisuća ljudi godišnje. Najveći problem virusa gripe je njegova česta mutacija, bilo antigenskim skretanjem (eng. *antigenic drift*; manjim promjenama antigena koje se događaju sporije) ili antigenskom izmjenom (eng. *antigenic shift*; veće promjene odjednom koje dovode do stvaranja novih podtipova virusa), zbog čega je teško proizvesti cjepivo koje dugoročno štiti osobu od gripe. Dosadašnja cjepiva su

multivalentna, što znači da štite od više sojeva virusa, s time da se sojevi virusa protiv kojeg cjepiva štite mijenjaju svake godine s obzirom na procjenu o tome koji će sojevi virusa prevladavati (<https://www.cdc.gov/>, <https://www.zzzjzdnz.hr/>, Herzog i sur., 2009). JVRS-100 je adjuvans sastavljen od kationskih liposoma izrađenih od lipida 1-[2-(oleoiloksi)etil]-2-oleil-3-(2-hidroksietil)imidazolinijevog klorida i kolesterola (1:1, m/m), u koje su inkorporirane plazmidne DNA koje služe kao imunopotencirajuće molekule. Takav adjuvans namijenjen je korištenju u kombinaciji s dostupnim cjepivima protiv influenze u slučajevima lošije zaštite cjepivima uzrokovanim antigenskim skretanjem. Kombinacija adjuvansa s inaktiviranim split virusom H5N1, primijenjena intramuskularno 2 puta s razmakom od 28 dana, izazvala je višu razinu protutijela u usporedbi s neadjuvantiranim cjepivom te je zaštitila ispitivane životinje (tvorovi) od razvoja infekcije pri izlaganju letalnim dozama srodnih virusa gripe (Liu i sur., 2016).

Inflexal V[®] (Crucell/Berna Biotech, Švicarska) je intramuskularno ili duboko supkutano trovalentno virosomsko cjepivo protiv sezonske gripe (<https://www.hpra.ie/>). Registrirano je još 1997. u Švicarskoj. Radi se o podjedinичnom cjepivu koje sadrži HA i NA, površinske antigene influenza virusa dva soja A i jednog soja B. Takvo cjepivo pokazuje bolju imunogenost i podnošljivost od nevirosomskog podjedinичnog cjepiva, a stabilno je i do 18 mjeseci ako se čuva na 5 °C i 3 mjeseca na 25°C. Inflexal V[®] jedino je cjepivo s adjuvansom koje je indicirano za sve dobne skupine. Pokazalo se dobrim za starije pacijente kojima je stanični imunosti odgovor slabiji, jer virosomi mogu, uz humoralnu imunost, potaknuti i odgovor stanične imunosti (Herzog i sur., 2009; Mischler i Metcalfe, 2002).

Osim parenteralnog puta primjene, Crucell/Berna Biotech je ujedno radio na razvoju intranazalnog cjepiva koje je stavljeno na tržište 2000. godine u Švicarskoj. Nasalflu Berna[®] (Crucell/Berna Biotech, Švicarska) je sastavljen od virosoma građenih od PC-a, u čiju su membranu uklopljeni antigeni HA i NA tri soja virusa gripe, dva soja A i soja B. U ovo je cjepivo dodatno uklopljen termolabilan toksin *Escherichia-e coli* koji služi kao adjuvans mukoznog imunostnog sustava. Efikasnost cjepiva praćena je tijekom dva mjeseca, nakon primjene dvije doze u razmaku od jednog tjedna, te je određeno da efikasnost iznosi 89,7% u djece i 85% u odraslih, što znači da je i ovaj tip cjepiva ujedno vrlo imunogen. Radi uklapanja termolabilnog toksina, ovo cjepivo pokazalo je bolju imunogenost nego Inflexal V[®], no ujedno je imalo i veću incidenciju nuspojava (Glück, 2002; Glück, 2001). Cjepivo je 2001. godine povezano sa Bellovom paralizom i povučeno s tržišta (Sendi

i sur., 2004). Vaxisome™ je također cjepivo razvijano za intranazalnu primjenu, ali bazirano na liposomima, sastavljenim od ceramid karbamoil spermina i kolesterola (3:2, m/m), s HA iz tri soja, adsorbiranim na površinu liposoma. Cjepivo je primijenjeno 2 puta intranazalno s razmakom od 14 dana između doza. Za usporedbu je služilo trovalentno neadjuvantirano split cjepivo Vaxigrip® (Sanofi Pasteur, Francuska) primijenjeno intramuskularno. Vaxisome™ je proizveo višu razinu protutijela, te više razine IFN- γ i interleukina 2, što ukazuje na bolji citotoksični učinak CTL-a. Nakon kontakta s virusom, skupina životinja koja je primala Vaxisome™ je pokazala manje opterećenje virusom, manji gubitak tjelesne težine, dok je porast tjelesne temperature bio usporediv s Vaxigrip®-om i manji od negativne kontrole. Bolji rezultat pripisuje se boljem zadržavanju kationskih liposoma na mukoznim membranama i boljoj endocitozi putem APC-ova (Even-Or i sur., 2011).

Tri trovalentna, podjedinčna cjepiva: virosomalno cjepivo Invivac® (Solvay Pharmaceuticals B.V., Nizozemska), cjepivo s MF59 adjuvansom Fluad® (Chiron, Italija) i cjepivo bez adjuvansa Influvac® (Solvay Pharmaceuticals B.V., Nizozemska) uspoređivana su s obzirom na sigurnost i imunogenost kod ljudi starijih od 65 godina. Sva tri cjepiva uspoređiva su po imunogenosti te su rezultirala usporedivim vrijednostima anti-HA protutijela, no Fluad® je pokazao lošiju reaktogenost, s više lokalnih nuspojava od druga dva cjepiva (de Bruijn i sur., 2006).

U pokušaju da se olakša proizvodnja cjepiva protiv gripe koja je bazirana na korištenju velike količine jaja potrebnih za uzgoj virusa i dugotrajnog proizvodnog procesa ograničenog kapaciteta, razvijen je adjuvans Vaxfectin® sastavljen od kationskih liposoma. Za pripravu liposoma korišten je kationski sintetski lipid (\pm)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(cis9-tetradecenil-oksi)-1-propanaminijev bromid i neutralni fosfolipid 1,2-difitanoil-PE (1:1, m/m). Adjuvans je pomiješan sa plazmidnom DNA koja je prenosila uputu za HA H5N1 virusa te je cjepivo ispitano na ljudima pri čemu je primijenjivano u dvije doze intramuskularno ili putem tzv. *jet* injektora. Pokazalo je proizvodnju protutijela usporedivu s proteinskim cjepivima te indukciju CTL-a putem Th1 odgovora koji se održao tijekom 182 dana ispitivanja, što ukazuje na dugotrajnu imunost. Uz to, trajanje proizvodnje je iznosilo 10-12 tjedana što je značajno bolje od 6 mjeseci potrebnih za proizvodnju tada dostupnih cjepiva (Smith i sur., 2010).

4.4. TUBERKULOZA

Tuberkuloza je bolest uzrokovana bakterijom *Mycobacterium tuberculosis*, koja najčešće zahvaća pluća, ali može zahvatiti i druge organe. Ukoliko je imunosni sustav oslabljen, tuberkuloza će se prezentirati u obliku simptoma kao što su kašalj, bol u prsima, iskašljavanje krvi, te je u tom slučaju osoba zarazna i može prenijeti svoju bolest drugima. Bolest se prenosi kapljičnim putem, kašljanjem, kihanjem i govorom. No, ukoliko osoba ima zdrav imunosni sustav, nastupa latentna tuberkuloza, koja nema simptoma i osoba nije zarazna. Kod nekih će se zadržati latentna faza tijekom cijelog života, no kod drugih može doći do aktivacije bakterije i širenja bolesti. Prema podacima SZO-a, čak 10 milijuna ljudi svake godine oboli od tuberkuloze, a 1,5 milijuna umre od tuberkuloze (<https://www.who.int/>; <https://www.cdc.gov/>). Trenutačno dostupno cjepivo protiv tuberkuloze, Bacille Calmette-Guerin (BCG), koje je atenuirano živo cjepivo, ne štiti od aktivacije latentne tuberkuloze, vrlo je varijabilnog učinka u zaštiti od plućne varijante tuberkuloze u mladih i odraslih, odnosno ne pruža dugoročnu zaštitu od tuberkuloze. Njegov učinak traje svega 10 - 20 godina nakon primjene u dojenačkoj dobi (<https://www.who.int/>; Doherty i Andersen, 2005). Docjepljivanje BCG-om u kasnijoj životnoj dobi vrlo je varijabilnog učinka, što uvelike ovisi o razini imunizacije postignute cijepljenjem, prisutnosti latentne tuberkuloze ili izloženosti atipičnim netuberkuloznim mikobakterijama. Stoga su u izradi brojne nove strategije za prevenciju razvitka i širenja tuberkuloze u ljudi, temeljene na ideji zamjene postojećeg cjepiva ili izrade cjepiva koje će služiti kao *booster* doza, odnosno pojačati imunosnu zaštitu koju je pokrenuo BCG, a koje bi bilo neovisno o prijašnjoj imunizaciji (Andersen i Scriba, 2019). Između ostaloga razmatra se i korištenje liposomskih sustava kao potencijalnih adjuvansa u novim cjepivima (Stewart i sur., 2019). Tako se pokazalo da je primjena kationskih liposoma pripremljenih iz EPC-a, dioleil-PE-a i DOTAP-a u molarnom omjeru 2:1:1 rezultirala smanjenjem potrebne DNA za imunizaciju za gotovo 16 puta. Korišteni fragment DNA sadržavao je uputu za *heat-shock* protein 65 i bio je vezan za plazmidni vektor. Ispitivanja provedena na miševima pokazala su da je DNA vezana za površinu liposoma, pri jednoj intranazalnoj primjeni, izazvala Th1 odgovor koji je bio usporediv s 4 intramuskularne doze čiste DNA (Rosada i sur., 2008). Jedna od novih varijanti cjepiva protiv tuberkuloze temeljena na CAF01 dostavljačkom sustavu mogla bi poslužiti kao zamjena za BCG cjepivo u novorođenčadi koja još nije bila izložena tuberkulozi, kao preventivno cjepivo. Kao antigen je korišten H1 rekombinantni fuzijski protein sastavljen od *M. tuberculosis* antigena Ag85b i ESAT-6. Klinička studija faze I pokazala je kako se nakon dvije doze cjepiva, primijenjene

intramuskularno u razmaku od 8 tjedana, razvila dugoročna stanična imunost što je testirano tri godine nakon prve doze. Takva imunost nije postignuta u skupini bez adjuvansa niti s drugim vrstama adjuvansa kao što su MF59 ili alum. Ujedno je pokazano kako ovakvo cjepivo pokazuje vrlo slabu reaktogenost, odnosno ima slabe nuspojave, prvenstveno bol i ukočenost na mjestu injekcije (van Dissel i sur., 2014). Uz H1 antigen, ispitivana je učinkovitost i H56 antigena (kombinacija H1 antigena i Rv2660 antigena) u kombinaciji sa CAF01 sustavom kao *multistage* cjepiva pri čemu H1 antigen služi za indukciju profilakse, a Rv2660 za kontrolu infekcije. Cjepivo je ispitivano na miševima, te je primijenjivano supkutano u 3 doze s 2 tjedna razmaka. Rezultati istraživanja su pokazali da cjepivo omogućuje kontrolu nad bakterijskim rastom kroz prva 4 tjedna praćenja nakon izlaganja usporedivu s H1 i BCG cjepivima, dok je od 12. - 24. tjedna pokazalo bolju zaštitu od H1 i BCG cjepiva, što ukazuje na njegovu prednost u kasnijim fazama infekcije. Studija je potvrdila kako H56 cjepivo ima prednost pred H1 cjepivom kao *booster* cjepivo koje bi se primijenilo 3 mjeseca nakon BCG-a, te da pruža zaštitu protiv reaktivacije tuberkuloze nakon nastupa latentne faze. Pri tome se indukcija i održavanje memorijskih Th1 i Th17 limfocita protiv antigena pripisuje CAF01 adjuvantnom sustavu zbog mogućnosti dugotrajne dostave antigena APC-ovima (Aagaard i sur., 2011). U pokušaju daljnjeg usavršenja cjepiva, razmatrala se kombinacija intranazalne i supkutane primjene H56 cjepiva. Samo intranazalna ili samo supkutana primjena 3 doze cjepiva rezultirala je manjim brojem Th-limfocita u plućima nego kombinacija 2 supkutane doze i 1 intranazalne, ali takvo poboljšanje u imunom odgovoru bilo je prisutno samo tijekom prva 2 tjedna nakon imunizacije, nakon čega je broj limfocita bio usporediv s primjenom 3 supkutane doze (Woodworth i sur., 2019). Drugi tip liposomskog cjepiva koristi adjuvanski sustav AS01E. Kao antigen je korišten M72, rekombinantni fuzijski protein sastavljen od antigena Mtb32A i Mtb39A. Provedena faza II kliničkih ispitivanja na ovom sustavu potvrdila je uspješnost cjepiva u razvoju imunosti u zdravih osoba, ali i u sprječavanju aktivne plućne tuberkuloze u 54% osoba sa latentnom tuberkulozom, a koji su HIV negativni (HIV povećava rizik od infekcija) i cijepljeni protiv tuberkuloze BCG-om, primijenjeno u dvije doze nakon intramuskularne primjene, s mjesec dana razmaka između doza. Pri tome cjepivo nije pokazivalo jaku reaktogenost, tek simptome slične gripi i lokalnu osjetljivost na mjestu primjene (Van Der Meeren i sur., 2018; Penn-Nicholson i sur., 2015). Druga studija otkrila je kako se imunost protiv tuberkuloze javlja i kod HIV-pozitivnih osoba neovisno o tome primaju li antiretrovirusnu terapiju (Kumarasamy i sur., 2016).

Kao *booster* terapija nakon BCG cjepiva koristilo se cjepivo sastavljeno od PS liposoma u koji su uklopljeni antigeni ESAT-6 ili Ag85B uz poli (I:C) kao adjuvans. Cjepivo je primijenjivano 10 tjedana nakon BCG cjepiva supkutano, a zatim nakon 3 tjedna intranazalno. Pritom je proizveden jaki Th1 i Th17 odgovor, usporedive razine IgG-a, te više razine IgA u odnosu na BCG cjepivo, a ujedno je potaknuta i proizvodnja memorijskih T-limfocita (Th i CTL), time pružajući jaču mukoznu zaštitu od BCG cjepiva (Diogo i sur., 2019).

Latentna tuberkuloza obilježena je granulomima, nakupinama stanica imunskog sustava, prvenstveno makrofagima, koje su ogradile bakterije kako bi spriječile njihovo daljnje razvijanje i koncentrirale imunosnu reakciju. No, *M. tuberculosis* ima razvijene mehanizme preživljavanja u granulomima u kojima se stvaraju posebni uvjeti (Guirado i Schlesinger, 2013). Za liječenje latentne tuberkuloze trenutačno se kao prva linija preporučuju antibiotici rifampicin (4 mjeseca, 1x dnevno), rifampicin i izoniazid (3 mjeseca, 1x dnevno) ili izoniazid i rifapentin (3 mjeseca, 1x tjedno). U nekim je slučajevima, kao što je prisutnost HIV-a, potrebna i dulja terapija od 6 - 9 mjeseci (Sterling i sur., 2020).

RUTI[®] (Archivel Farma, Španjolska) je liposomsko terapijsko cjepivo koje se sastoji od fragmenata stanične stijenke bakterije *M. tuberculosis* uzgojenih u uvjetima stresa (niski pH, nedostatak hranjivih tvari), koji onda stvaraju antigene karakteristične za latentne bacile u granulomima. Ti fragmenti su inkorporirani u liposome pripravljene iz PC-a i natrijevog kolata (20:1,4; molarni omjer). U studiji na zamorcima, RUTI[®] je primijenjen u 2 doze supkutano s razmakom od 3 tjedna nakon kemoterapije s rifampicinom i izoniazidom koja je primijenjivana 4 tjedna, 5 puta tjedno. Sama kemoterapija je dugotrajna jer ona djeluje isključivo na aktivne bakterije, ali ne i na latentne bakterije. Latentne bakterije se aktiviraju radi ublažavanja imunskog odgovora nakon smanjenja bakterijskog opterećenja djelovanjem antibiotika, pa je dulji period korištenja antibiotika ključan kako bi se spriječila ponovna aktivacija infekcije. Pritom, ponovni rast bakterija nije odmah aktivirao imunski sustav, već se on javio tek kod određenog bakterijskog opterećenja. Kombinacija RUTI[®] cjepiva i kemoterapije omogućila je uklanjanje aktivnih bakterija i ovojnice od aktiviranih ili spužvastih makrofaga putem kemoterapije, a zatim brzo aktiviranje imunskog sustava protiv latentnih bakterija primjenom cjepiva (Cardona, 2006; Guirado i sur., 2008).

4.5. HIV

Virus HIV-a napada stanice imunskog sustava čovjeka (Th-limfocite i monocite) i tijekom vremena oslabljuje njegovu staničnu imunost. Sindrom stečene imunodeficijencije je bolest koja nastupa kao zadnja faza oboljenja HIV-om, a zapravo predstavlja sklonost infekcijama i tumorima zbog značajno narušenog imunskog sustava. Još uvijek ne postoji lijek koji dovodi do izlječenja bolesti uzrokovane HIV-om, već se provodi tzv. visoko aktivna antiretrovirusna terapija koja omogućuje kontrolu bolesti (<https://www.cdc.gov/>).

Virus HIV-a se prenosi s HIV-pozitivne majke na dijete, unosom zaražene krvi u tijelo ili nezaštićenim spolnim odnosom sa zaraženom osobom. Procjenjuje se da se godišnje zarazi čak 1,5 milijuna ljudi u svijetu, dok je ukupan broj zaraženih u 2020. godini iznosio 37,5 milijuna (<https://www.unaids.org/en>). Upravo zato je jedan od vodećih globalnih zdravstvenih ciljeva izrada profilaktičkog cjepiva, koje bi dugoročno štitilo od infekcije pri izloženosti virusu, ili barem usporilo razvoj i prijenos bolesti. Međutim, do danas cjepivo još uvijek nije razvijeno. Glavni problemi su genetska raznolikost i brzina mutacije virusa, izbjegavanje imunskog sustava, uski period obrane prije stvaranja rezervoara virusa i nepoznata jačina i vrsta imunskog odgovora potrebna da bi se obrana dogodila (Kim i sur., 2010). Jedno od potencijalnih profilaktičkih cjepiva protiv HIV-a sastoji se od virosoma u koje je inkorporiran gp160, prekursor gp120 i gp41, glikoproteina ovojnice HIV-a zaslužnih za vezanje na površinu stanice domaćina i fuziju s njom. Virosomi su sastavljeni od smjese lipida (kolesterol, sfingomijelin, dioleil-PE, PC i PS) i fuzijskih glikoproteina HVJ-a. Cjepivo je primijenjivano intranazalno na miševima, jednom tjedno tijekom četiri tjedna, te je otkriveno da pokazuje sistemsku i lokalnu zaštitu od HIV-a, za razliku od primjene čistog antigena i antigena vezanog za konvencionalne liposome koji su bili neučinkoviti. Virosomsko cjepivo pokazalo je ujedno i potencijal kao terapijsko cjepivo, te je u miševima s deficijencijom IFN- γ ili interleukina-4 proizvelo usporedivu razinu IgG protutijela s razinom IgG protutijela nedeficijentnih miševa (Sakaue i sur., 2003).

Bomsel i sur. (2011) pratili su razvoj lokalnog cervikalnog imunskog odgovora u primata kojima je HIV profilaktičko cjepivo primijenjeno samo intramuskularno ili intramuskularno i intranazalno. Kao antigeni su korišteni derivati glikoproteina gp41, trimerni rekombinantni gp41 antigen i P1 peptid, koji su dobiveni uklanjanjem dijelova gp41 koji ne stvaraju zaštitni imunski odgovor. Pri tome antigeni zauzimaju konformaciju sličnu prirodnoj konformaciji u virusu. Antigeni su

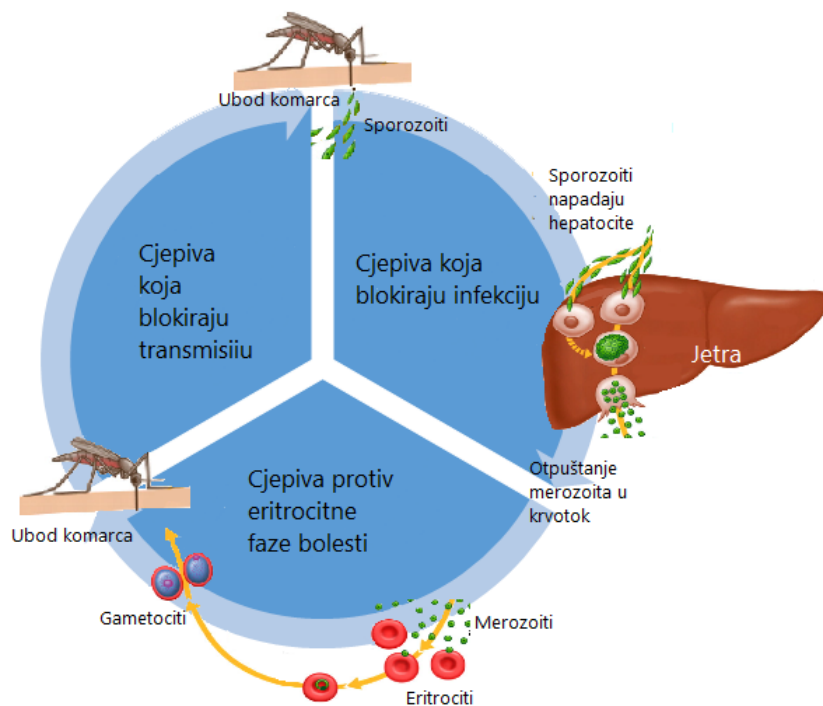
kovalentno vezani preko sukcinatnog poveznika s PE-om, te smješteni u influenza virosome, sastavljene od HA i NA, PC i PE-a. Virosomi su odabrani zbog mogućnosti mukozne i sistemske proizvodnje protutijela, te bolje fuzije s APC-ovima u odnosu na konvecionalne liposome radi prisutnosti HA i NA virusa gripe. U usporedbi s virusnim vektorima, postojanje protutijela na proteine virusa gripe ne utječe na primjenu virosoma. Takvo cjepivo, primijenjeno 2 puta intramuskularno i 2 puta intranazalno, pokazalo je potpunu zaštitu od ulaska HIV-a putem vaginalne sluznice tijekom 6 mjeseci ispitivanja za sve primare, dok je intramuskularno cjepivo primijenjeno 4 puta, pokazalo mukoznu zaštitu tek u 50% slučajeva. Cjepivo je rezultiralo stvaranjem samo mukozne imunosti koja se sastojala od neutralizirajućih i anti-transcitoznih IgA i IgG protutijela, koja nisu stvorena u sistemskej imunosti.

Hanson i sur. (2015) su proveli istraživanje u kojem su razmatrali parametre značajne za izradu anti-HIV liposomskog cjepiva. Kao metu ispitivanog profilaktičkog cjepiva postavili su vanjski dio MPR-a gp41 receptora virusa HIV-a. Smatrali su da je za stvaranje odgovarajućih protutijela bitno i da je antigen smješten u lipidnoj okolini kako bi se simulirali uvjeti stvarnog virusa, te je ugradnja antigena u liposome postignuta kovalentnim vezanjem preko palmitinske kiseline unutar molekula fosfolipida. Izrađeni liposomi sadržavali su dioleil-PC i dioleil-PG u molarnom omjeru 1:4 ili dimiristoil-PC, dioleil-PC i dioleil-PG u molarnom omjeru 2:2:1. Od ispitivanih formulacija u kombinaciji s antigenom (liposomi, U/V emulzija i emulzija tipa voda u ulju i aluma, uz dodatak MPLA u sve formulacije), samo su liposomi rezultirali stvaranjem imunogenog odgovora. Prilikom razmatranja svojstava liposomske formulacije, potvrdili su kako primjena rigidnijih vezikula, građenih od dimiristoil-PC-a, dioleil-PC-a i dioleil-PG-a omogućuje stvaranje bolje imunogenosti. Osim toga i veličina liposoma imala je utjecaj, te je imunogeni odgovor bio jači nakon primjene liposoma srednjeg promjera 150 i 200 nm, u odnosu na liposome manje veličine (65 nm). Također su dokazali da optimalna površinska gustoća antigena iznosi 200 antigena po liposomu, iako je između 40 i 1000 antigena stvorilo pogodan imunogeni odgovor nakon 50. dana primjene formulacije. Autori su istraživali i kako način vezanja peptida Th limfocita za liposome utječe na imunogeni odgovor na antigen. HIV-30 Th peptid su konjugirali s palmitinskom kiselinom ili PEG-om kako bi ga vezali za liposome. S PEG-iliranih liposoma su uklonili HIV-30 s vanjske strane ili su slobodan HIV-30 uklopili u liposome. PEG-ilirani HIV-30 koji je uklonjen s vanjske strane stvorio je najjaču humoralnu i staničnu imunost protiv antigena, dok je u isto vrijeme izbjegnuto stvaranje nespecifičnih protutijela.

Ishii i sur. (1997) su proveli ispitivanja kationskih liposoma kao nosača DNA cjepiva za profilaksu HIV-infekcija. Liposomi građeni od 3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetan)karbarmoil] kolesterola i dioleil-PE sadržavali su uklopljen DNA plazmid koji sadrži gen HIV-a zaslužan za stvaranje proteina ovojnice. Intranazalna, intramuskularna te intraperitonealna primjena liposoma u miševa pokazala je jak humoralni i stanični odgovor, dok su intradermalni i supkutani putevi primjene rezultirali slabom imunom reakcijom. U usporedbi s kontrolom, liposomi su značajno pojačali imunogenost DNA cjepiva.

4.6. MALARIJA

Malarija je bolest koju uzrokuje 5 vrsta parazita. Ti paraziti se prenose putem uboda 'vektora malarije', odnosno ženki komaraca roda *Anopheles*, kojima je krv izvor nutrijenata potrebnih za reprodukciju. Paraziti roda *Plasmodium* se u obliku sporozoita tijekom ugriza komarca otpuštaju u kožu ili direktno u krvotok, otkuda migriraju u jetru i napadaju hepatocite. Razgradnjom hepatocita, u krvotok se otpuštaju merozoiti koji napadaju eritrocite, a produkti njihovog metabolizma oslobađaju se razgradnjom eritrocita, što uzrokuje simptome malarije (Slika 3). Simptomi se javljaju između 7 - 30 dana nakon ugriza, a uključuju povišenu tjelesnu temperaturu, drhtavicu, opću slabost, mučninu i povraćanje, te glavobolju i bolove u mišićima, zbog čega se u zapadnim zemljama često krivo dijagnosticira kao prehlada ili gripa. Malarija je izlječiva ukoliko se liječi brzo, a neliječena na vrijeme dovodi do komplikacija koje mogu završiti smrtonosno (<https://www.cdc.gov/>). Problemi prilikom razvitka cjepiva leže u nerazumijevanju interakcije plazmodija malarije s imunim sustavom, kompleksnosti plazmodija i njegovog životnog ciklusa te velike varijabilnosti njegovih površinskih antigena. Razlikuju se tri vrste cjepiva: ona kojima je cilj obrana organizma od eritrocitne faze bolesti, ona kojima je cilj obrana od sporozoita i hepatocitne faze bolesti te ona koja sprječavaju transmisiju bolesti, odnosno sprječavaju sazrijevanje parazita u komarcu (Slika 3) (Laurens, 2020; Mata i sur., 2013).



Slika 3: Klasifikacija cjepiva protiv malarije s obzirom na dio životnog ciklusa plazmodija malarije kojeg sprječavaju. Slika je preuzeta i prilagođena iz Hill, 2011, uz dozvolu *The Royal Society*.

Mosquirix[®] (GlaxoSmithKline, Ujedinjeno Kraljevstvo) ili RTS,S/AS01E je cjepivo koje štiti od sporozoita i hepatocitne faze bolesti. Sastavljeno je od podjediničnog antigena RTS/S pomiješanog s AS01E liposomskim sustavom. RTS/S antigen je sastavljen od domena cirkumsporozoitnog proteina koji izazivaju specifičan imunogeni odgovor, a vezani su za površinski antigen hepatitisa B koji im služi kao nosač u matriksu. Zbog prisutnosti antigena hepatitisa B, ovakvo cjepivo ujedno štiti i od hepatitisa B (<https://www.ema.europa.eu/en>). Od više testiranih kandidata za adjuvans, AS03, AS04 i alum su se pokazali inferiorniji AS01E sustavu. Cjepivo s AS01E adjuvansom rezultira indukcijom imunogenosti od 53% u odnosu na AS02 adjuvans koji je efikasan u samo 30% slučajeva u djece dobi 5 – 17 mjeseci. Nakon 4 godine, učinkovitost cjepiva s AS01E adjuvansom pada na 36,3% za pojavu kliničke malarije, odnosno na 32,2% za pojavu teške malarije za djecu u dobi 5 – 17 mjeseci. Za djecu dobi 6 -12 tjedana efikasnost je značajno manja i iznosi 30%, a nakon 4 godine pada na 25,9%, odnosno 17,3% (Crompton i sur., 2010; Laurens, 2020; Mata i sur., 2013). Ograničenja Mosquirix[®]-a leže u tome što zahtijeva primjenu 4 doze, te je

imunogenost koju stvara ograničenog trajanja. U ovom slučaju, proteinsko cjepivo koje je u fazi II kliničkog ispitivanja, R21/MM, pokazalo je 77% efikasnosti nakon godine dana za djecu između 5 – 17 mjeseci, i time se pokazalo kao bolji kandidat za imunizaciju od dosadašnjeg Mosquirix[®]-a te je zadovoljilo SZO-ov zahtjev od minimalno 75% efikasnosti (Dattoo i sur., 2021). U svrhu poboljšanja Mosquirix[®] cjepiva, cirkumsporozoitni protein je uklopljen u CAF09 sustav, koji inducira CTL bitne za borbu protiv unutrastaničnih patogena kao dodatnu zaštitu u odnosu na Mosquirix[®]. Intraperitonealnom imunizacijom miševa (3 puta s razmakom od 2 tjedna), postigla se zaštita kod 9 od 10 miševa, što je potvrđeno izlaganjem miševa zaraženim komarcima. Miševi koji su primali samo adjuvans ili neimunizirani miševi izloženi zaraženim komarcima razvili su parazitemiju do 5. dana nakon izlaganja komarcima, dok su imunizirani miševi bili zdravi do 5 tjedana od izlaganja komarcima nakon čega su opet izloženi zarazi i nisu razvili parazitemiju (Espinosa i sur., 2017).

Upotreba virosoma koji je sadržavao peptid UK-39 (za zaštitu hepatocitne faze) i peptid AMA49-C1 (kao zaštitu od eritrocitne faze), konjugiranih s PE-om, stvorilo je reakciju imunosnog sustava protiv eritrocitne faze bolesti u obliku odgođenog nastupa parazitemije i prisutnosti abnormalnih parazita. Cjepivo je primijenjivano 3 puta intramuskularno, s razmakom od 4 tjedna; međutim, rezultati II. faze kliničke studije su pokazali da formulacija nije bila dovoljno učinkovita u zaštiti od infekcije pacijenata koji ranije nisu bili izloženi malariji (Thompson i sur., 2011).

4.7. TETANUS

Tetanus je infekcija uzrokovana bakterijom *Clostridium tetani*, koja je prisutna u obliku spora u okolišu, u zemlji, izmetu životinja i prašini. Spore bakterije u tijelo dospijevaju narušavanjem zaštitne barijere i integriteta kože, bilo preko opekline, ogrebotina, rana ili uboda insekata. Inkubacijski period traje najčešće oko 10 dana, no u nekim slučajevima se javlja i nakon više mjeseci. U anaerobnim uvjetima bakterije rastu i razmnožavaju se prilikom čega otpuštaju egzotoksin koji uzrokuje simptome bolesti: ubrzan rad srca, znojenje, povišenu temperaturu, grčeve mišića lica (prvenstveno čeljusti, što otežava hranjenje), nogu i ruku, te bolne grčeve koji mogu dovesti do smrti uslijed gušenja. Za razliku od drugih bolesti, tetanus nije zarazan. Smatra se da godišnje u svijetu ova bolest uzrokuje između 213 i 293 tisuća smrti, te 5 -7% svih smrti

novorođenčadi, no u Europi je rijetka te je u 2007. prijavljeno svega 125 slučajeva u 25 zemalja (<https://www.zzjzdnz.hr/>; <https://www.ecdc.europa.eu/en>).

Toksoidno cjepivo bazirano na liposomima sastava: dipalmitoil-PC, dipalmitoil-PE, kolesterol i palmitinska kiselina (4:3:7:2, m/m), ispitivano je za prevenciju tetanusa. Toksoid tetanusa (TT) je pritom ugrađen u liposome putem glutaraldehida, koji je vezan za liposome putem amino-skupine dipalmitoil-PE-a. Naito i sur. (1998) su pratili proizvodnju IgG i IgE protutijela u miševa kao markere imunogenosti (IgG) i reaktogenosti (IgE) liposomskog cjepiva, a za usporedbu su koristili cjepivo s alumom kao adjuvansom. Pri tome su pokazali da liposomsko cjepivo pokazuje proizvodnju IgG protutijela usporedivu s alum-cjepivom pri izlaganju letalnoj dozi toksina tetanusa, s puno slabijom proizvodnjom IgE, čak i ukoliko se koristi kao *booster* doza. Liofilizirana ili tekuća liposomska formulacija bila je stabilna do 6 mjeseci pri temperaturi od 4 °C, dok su cjepiva s alumom stabilna i do 3 godine na 2 – 8 °C.

Gupta i sur. (2005) su za prevenciju tetanusa predložili formulaciju transferosoma namijenjenu topikalnoj imunizaciji. Transferosomi su pripremljeni miješanjem etanolne otopine sojinog PC-a i natrijevog deoksikolata u različitim omjerima u fosfatnom puferu koji je sadržavao TT. Jedan od ciljeva ovog ispitivanja je bio da se topikalnom imunizacijom oponaša prirodni put TT infekcije. Osim fizikalno-kemijske karakterizacije transferosoma, ispitivanja učinkovitosti nanoformulacije na štakorima su pokazala da je imunost postignuta topikalnim putem, svojom jačinom i dugotrajnošću, bila usporediva s imunosti postignutom intramuskularno primijenjenom jednakom dozom alum-cjepiva TT, te je bila jača od smjese TT i transferosoma te slobodnog TT-a.

4.8. TUMORI

Rak ili tumor nije jedinstvena bolest, već skupina od preko 100 bolesti koje su posljedica nakupljanja malih genetskih promjena unutar stanica tijekom vremena, bilo radi greški prilikom stanične diobe, naslijeđa ili izloženosti karcinogenima. Mogu se dogoditi u bilo kojem tkivu u tijelu, a posljedica tih promjena je abnormalno ponašanje stanica koje im dopušta nekontrolirano dijeljenje. Ukoliko se takve stanice prošire tijelom i razviju u drugom organu, zovu se metastaze. Najčešći tumori su tumor pluća, dojke, prostate ili kolonorektalni tumor, a smatra se da će tumori pankreasa, štitnjače i jetre postati puno češći. Smrt uzrokovana rakom javlja se kada rak omete vitalnu funkciju tijela. Tumori su bolest koja je u 2020. godini pogodila 10 milijuna ljudi, što je

otprilike pola od 19,3 milijuna dijagnosticiranih slučajeva. Smatra se da će brojka dijagnosticiranih slučajeva porasti do 28,4 milijuna u slijedećih 20 godina (Alzahrani i sur., 2021; Butterfield, 2015; Sung i sur., 2021).

Imunoterapija tumora predstavlja jednu od više dostupnih metoda liječenja raka, a temelji se na aktivaciji imunskog sustava ili pripomoći imunskom sustavu u borbi protiv stanica raka. U literaturi je dostupan popriličan broj znanstvenih radova u kojima su istraživani imunoterapijski pristupi liječenja tumora primjenom liposoma (Tablica 3).

Cheng i sur. (2020) su kao antigen koristili dijelove stanične membrane tumorskih stanica raka dojke 4T1 koje su uklopili u liposome sastavljene od EPC-a, distearoil-PE-PEG 2000, kolesterola i MPLA. Takvo cjepivo moglo bi se koristiti kao personalizirano preventivno cjepivo nakon uklanjanja tumora, koje bi spriječilo ponovni povrat tumora. Cjepivo je primijenjivano 3 puta s razmakom od 11, odnosno 14 dana između doza. U odnosu na kontrolne skupine miševa koji su primali cjepivo koje je sadržavalo samo staničnu membranu tumorskih stanica ili samo liposome (bez antigena), liposomsko cjepivo s antigenom je pokazalo najjaču indukciju CTL odgovora, 10 puta manju veličinu tumora, te stvaranje memorijskih T-limfocita. Nakon 50 dana od indukcije tumorskih stanica, preživljavanje životinja je iznosilo 50%, dok su svi miševi iz kontrolne skupine uginuli.

U pokušaju razvijanja univerzalnog cjepiva za rak, Nakamura i sur. (2013) su proučavali učinak α -galaktozilceramida (α -GalCer), glikolipida koji potiče lučenje IFN- γ (induktora stanične imunosti i bolje antigenske prezentacije), čime se aktivira antitumorska aktivnost neovisna o tipu tumora. PEG-ilirani liposomi sastava EPC, distearoil-PE-PEG 2000, kolesterol i steirilirani okta-arginin kao imunostimulator u molarnom omjeru 70:30:5, značajno su poboljšali anti-metastatsku aktivnost α -GalCer. Nakon intravenske primjene samo jedne doze (miševi), inhibicijski učinak na stanice mišjeg melanoma B16-F10 koje su služile kao model metastaze raka pluća iznosio je 65%. PEG-ilacija je povećala izvornu veličinu liposoma sa 100 nm na 300 nm, što je uzrokovalo njihovo nakupljanje u slezeni i time povećanu proizvodnju IFN- γ , u odnosu na ne-PEG-ilirane (konvencionalne) liposome i topljivi α -GalCer. Korištenjem dioleil-PE-a umjesto EPC-a i kolesterola smanjila se uspješnost prezentacije α -GalCer na APC-ovima.

Tablica 3: Kratki pregled pretkliničkih ispitivanja liposoma za imunoterapiju tumora

Sastav liposoma	Antigen	Indikacija	Način primjene	Rezultati	Literatura
Dimiristoil-PC : dimiristoil-PG : kolesterol : dioleil-PE (30:4:6:10) + MPLA	P5 (HER2 derivirani peptid konjugiran za maleimid i PEG-iliarni dioleil-PE	HER2 pozitivni rak dojke	Supkutano (3 puta, svaka 2 tjedna)	Odgodjen rast tumora i produljeno vrijeme preživljavanja	Shariat i sur., 2014
PE : EPC (4:1) + HA (virosemi)	PTR-4 peptid dobiven iz PTH-rP)	Tumori koji ekspimiraju PTH-rP; tumori s metastazama kostiju	Supkutano (4 puta, svaka 3 tjedna)	Uklanjanje tumorskih stanica koje prezentiraju PTH-rP; odgodjen rasta tumora; anti-angiogenetski učinak	Correale i sur., 2008
Fuzijski aktivni virosomi (izrađeni od H3N2 podtipa influenza virusa)	E7-HPV16 rekombinantni proteinski antigen	Cervikalne predtumorske i tumorske lezije uzrokovane HPV virusom	Intraperitonealno (2 puta, razmak od 2 tjedna)	Jači CTL odgovor; spriječavanje rasta ili nastanka tumora; potencijalno profilaktično cjepivo protiv HPV-a (uz antigene L1/L2)	Bungener i sur., 2006
Liposomi od lipida 1 i 2 te Man-lipida	MART_1 (Melan-A) mRNA	B16F10 melanom	Intravenski (2 puta, razmak od 1 tjedna)	U kontrolnoj skupini nijedan miš nije preživio 23. dan, dok je manozilacija lipida omogućila 50% stopu preživljavanja nakon 30. dana → nepotpuna zaštita; bolja internalizacija u dendritične stanice	Perche i sur., 2011

Sva ispitivanja prikazana u tablici su provedena na miševima. CTL, citotoksični T limfociti; ; EPC, fosfatidilkolin iz jajeta; HA, hemaglutinin; HER2, humani epidermalni faktor rasta 2; HPV, humani papiloma virus; lipid 1, O, O-dioleil-N- [3N- (N-metilimidazol jodid) propilen] fosforamidat; lipid 2, O, O-dioleil-N-histamin fosforamidat; Man-lipid, β -D-manopiranosil-N-dodecilheksadekanamid; MPLA, monofosforil-lipid A; PE, fosfatidiletanolamin; PEG, polietilenglikol; PG, fosfatidilglicerol; PTH-rP, peptid sličan paratireoidnom hormonu.

Jedan od korištenih pristupa je i ugradnja BLP-25 lipopeptida (dio MUC1 antigena prisutnog kod više vrsta tumora) u liposome sastavljene od kolesterola, dimiristol-PG-a i dipalmitoil-PC-a uz adjuvans MPLA. Riječ je o Stimuvax[®] (Merck & Co, SAD) cjepivu. Klinička studija provedena je na pacijentima s tumorom ne-malih stanica pluća faze IIIB (lokoregionalan ili s malignim pleuralnim izljevom) i faze IV. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine, pacijente koji su dobivali samo potpornu terapiju te pacijente koji su uz potpornu terapiju dobivali i cjepivo. Cjepivo je primijenjivano u 8 doza, supkutano jednom tjedno. Za pacijente s lokoregionalnim tumorom faze IIIB cjepivo je pokazalo dvogodišnju šansu preživljavanja od 60%, za razliku od potporne terapije (36,7%). Pritom su bolesnici prijavljivali jednaku ili bolju kvalitetu života od onih koji su primali samo potpornu terapiju. Nažalost, za pacijente s tumorom faze IIIB s malignim pleuralnim izljevom i faze IV cjepivo nije bilo učinkovito. Isto se cjepivo također ispitalo i za liječenje raka prostate koji eksplicira isti tumorski antigen. Primijenjeno na isti način kao u slučaju raka pluća, cjepivo je u 14 od 15 pacijenata produljilo vrijeme potrebno za udvostručavanje tumorskog markera prostata-specifičnog antigena i time usporilo progresiju bolesti. Kod 6 od 15 pacijenata to je usporenje iznosilo više od 50% inicijalnog vremena (North i Butts, 2005; Xia i sur., 2014).

Liposomi su istraživani i kao adjuvanski sustav za cjepivo protiv mišićno-neinvazivnog raka mokraćnog mjehura. Trenutačno se kao prevencija recidiva tumora visokog rizika i za liječenje tumora *in situ* koriste kemoterapeutici ili BCG. Pri tome je BCG djelotvorniji, ali je kemoterapija manje toksična. BCG terapija je u studiji provedenoj na 1.316 pacijenata uzrokovala lokalne nuspojave u 62,8% pacijenata i sistemske nuspojave kod 30,6% pacijenata, te je čak 8% pacijenata moralo prekinuti liječenje radi njene toksičnosti. Problem takve terapije je i mogućnost lokalnih i sistemskih infekcija koje zahtijevaju prekid terapije i korištenje antituberkulostatske terapije (Decaestecker i sur., 2015; Kawai i sur., 2013). Kako bi se smanjila toksičnost BCG-a, umjesto atenuiranih bakterija istraživala se mogućnost korištenja samo stanične stijenke bakterija, koja sadrži imunopotencirajuće lipide (mikoloilarabinogalaktan peptidoglikanski kompleks, mikoloil glikolipidi i lipomanan). No, negativan naboj i hidrofobnost spriječavali su aktivaciju imunskog sustava radi otežane interakcije fragmenata stijenke sa stanicama tumora koji bi prezentirali antigene stijenke. Stoga su fragmenti stanične stijenke uklopljeni u liposome građene od PC-a, kolesterola i steiriliranog okta-arginina (7:3:0,08, molarni omjer). Liposomsko cjepivo pomiješano sa stanicama mišjeg tumora mokraćnog mjehura MBT-2, primijenjeno je supkutano miševima u

dozi od 0,1 mg, te je inhibiralo rast tumorskih stanica i time se pokazalo kao potencijalna zamjena za BCG (Joraku i sur., 2009).

mRNA cjepiva imaju veliki potencijal u antitumorskoj terapiji. Tako su gotovo prije više od 20 godina Zhou i suradnici ukazali na mogućnosti korištenja virosoma kao nosača mRNA za jačanje imunološkog sustava u terapiji melanoma. Zbog nestabilnosti, mRNA je uklopljen u HVJ-virosome pripravljene iz PS-a, PC-a, kolesterola (1:4.8:2, maseni omjer) i inaktiviranog HVJ-a. Korištenjem cjepiva stimulirana je proizvodnja antigenskog proteina gp100 tijekom duljeg vremenskog perioda in vivo, te proizvodnja unutar nepromijenjenih vlastitih stanica što potencijalno stvara jači imunski odgovor u odnosu na tumorske stanice. U in vivo ispitivanjima, miševi su imunizirani s 2 doze u razmaku od 2 tjedna, direktno u slezenu te su potom inokulirani s $2,5 \times 10^3$ stanica mišjeg melanoma B16 F1 za koje su prethodno dokazali da predstavljaju minimalnu dozu stanica koje proizvode tumor kod miševa. Cjepivo je aktiviralo proizvodnju specifičnih protutijela protiv gp100 antigena i CTL. Kontrolna grupa miševa, koji su injektirani s lacZ mRNA HVJ-virosomima, razvili su velike tumore i uginuli unutar 78 dana. Od imuniziranih miševa, njih 8 od 18 nije razvilo tumor ni 150 dana nakon inokulacije, nakon čega su reinokulirani, te praćeni još 60 dana, unutar kojih nisu razvili tumor (Zhou i sur., 1999).

4.9. *HERPES ZOSTER*

Herpes zoster je oboljenje nastalo reaktivacijom *Varicella-zoster* virusa, uzročnika vodenih kozica. Nakon preboljenja vodenih kozica, virus ulazi u stadij latencije u ganglijima dorzalnog korijena i kranijalnog živca gdje je zaštićen od imunskog sustava. Do reaktivacije dolazi zbog imunosupresije ili slabljenja imunskog sustava u starijoj životnoj dobi. Uglavnom se smatra da su osobe starije od 50 godina pod povećanim rizikom od razvitka bolesti. Simptomi su povišena tjelesna temperatura i osjetljivost kože (bol, svrbež) koja prelazi u makulopapularni osip. Glavna komplikacija bolesti, koja se javlja u 20% slučajeva, je postherpetička neuralgija koja se javlja kao bol na području kože koji inerviraju živci oštećeni virusom. Kod nekih se simptomi povlače izliječenjem bolesti, no kod drugih postherpetička neuralgija zahtijeva cjeloživotno liječenje. Kao glavni razlog ponovne aktivacije bolesti smatra se slabljenje T-stanične imunosti (Koshy i sur., 2018; Saguil i sur., 2017).

Shingirix[®] (GlaxoSmithKline, Ujedinjeno Kraljevstvo) je liposomsko cjepivo protiv *herpes zoster*a registrirano 2017. godine. Sadrži AS01B adjuvans pomiješan s antigenom, rekombinantnim glikoproteinom E, te se primijenuje intramuskularno u dvije doze s razmakom od 2 - 6 mjeseci između doza. Shingirix[®] je pokazao efikasnost od 97,2% kod ljudi starijih od 50 godina, odnosno 89,8% u ljudi starijih od 70 godina koji prethodno nisu primili cjepivo, što je puno bolje od 70% (stariji od 50 godina) i 38% (stariji od 70 godina) zaštite koja se postiže cjepivom Zostavax[®] (Merck&Co, SAD). Zostavax[®] je živo atenuirano cjepivo registrirano 2006. godine. Dokazano je da je Shingirix[®] ujedno efikasniji i u smanjenju rizika od postherpetičke neuralgije, te štiti imunosuprimirane pacijente, što nije slučaj kod primjene Zostavax[®] cjepiva. Procijenjeno trajanje djelovanja Shingirix[®]-a je oko 9 godina, dok za Zostavax[®] ono iznosi oko 5 godina. Shingirix[®] je pokazao jednaku djelotvornost neovisno o prethodnoj primjeni Zostavax[®]-a, ali se preporuča razmak od 2 mjeseca između dva cjepiva. Shingirix[®] uzrokuje sistemske nuspojave, kao što su glavobolja, bol u mišićima i povišena temperatura, koje prođu nakon 2 - 3 dana. S obzirom na superiornost, Savjetodavni odbor za imunizacijsku praksu Američkog centra za kontrolu i prevenciju bolesti, preporuča Shingirix[®] kao profilaktičko cjepivo izbora protiv *herpes zoster*-a i postherpetičke neuralgije u osoba starijih od 50 godina i imunosuprimiranih bolesnika (Singh i sur., 2020; Maltz i Fidler, 2019; Shah i sur., 2019).

Brojna istraživanja liposoma u području cjepiva i stimulacije imunskog odgovora rezultirala su registriranim pripravcima koji su sažeto prikazani Tablicom 4.

Tablica 4: Primjeri registriranih liposomskih cjepiva

Naziv cjepiva	Proizvođač	Antigen	Sastav nosača	Indikacija
<i>Epaxal</i> [®]	Crucell/Berna Biotech (Švicarska)	Hepatitis A virusne čestice, soj RG-SB	Diolil-PC: diolil-PE (75:25, molarni omjer)	Hepatitis A
<i>Inflexal V</i> [®]	Crucell/Berna Biotech (Švicarska)	HA i NA, dva soja A i soja B	Diolil-PC: diolil-PE (75:25, molarni omjer)	Gripa
<i>Nasalflu</i> [®]	Crucell/Berna Biotech (Švicarska)	HA i NA, dva soja A i soja B	PC, toksin <i>E. coli</i>	Gripa
<i>Vaxisome</i> [™]	Sanofi Pasteur (Francuska)	HA iz tri soja virusa gripe	Ceramid karbamoil spermin: kolesterol (3:2, molarni omjer)	Gripa
<i>Invivac</i> [®]	Solvay Pharmaceuticals B.V. (Nizozemska)	HA i NA	Virosomi	Gripa
<i>Mosquirix</i> [®]	GlaxoSmithKline (Ujedinjeno Kraljevstvo)	RTS/S	AS01E liposomi	Malarija
<i>Shingrix</i> [®]	GlaxoSmithKline (Ujedinjeno Kraljevstvo)	Rekombinantni glikoprotein E	AS01B liposomi	<i>Herpes zoster</i>
<i>RUTI</i> [®]	Archivel Farma (Španjolska)	Fragmenti stanične stijenke bakterije <i>M. tuberculosis</i>	PC, natrijev kolat (20:1.4, molarni omjer)	Tuberkuloza
<i>Stimuvax</i> [®]	Merck & Co (SAD)	BLP-25 lipopeptid	Kolesterol, dimiristol-PG, dipalmitoil-PC, MPLA	Lokoregionalan tumor ne-malih stanica pluća faze IIIB, rak prostate

AS01B, adjuvantski sustav sastavljen od liposoma, 50 µg QS-21 (saponinska frakcija 21 ekstrakta biljke *Quillaja saponaria*), 50 µg MPLA; AS01E, adjuvantski sustav sastavljen od liposoma, 25 µg QS-21, 25 µg MPLA; BLP-25, fragment MUC1 tumorskog antigena; HA, hemaglutinin; MPLA, monofosforil lipid A; NA, neuraminidaza; PC, fosfatidilkolin; PE, fosfatidiletanolamin; PG-fosfatidilglicerol; RTS/S, dio cirkumsporozitnog proteina kompleksiran s površinskim antigenom hepatitisa B

5. ZAKLJUČAK

Liposomi pokazuju veliki potencijal kao transportni i adjuvanski sustavi u cjepivima. Na njihovo djelovanje utječe veličina, površinski naboj i sastav liposoma (lamelarnost, fluidnost, prisutnost imunostimulatornih lipida) te način vezanja antigena. Prema brojnim pretkliničkim i kliničkim ispitivanjima prikazanim u ovom radu, nanosustavi temeljeni na liposomima su pokazali superiornost u odnosu na konvencionalna cjepiva, što se očituje kroz smanjenu dozu cjepiva, ciljanu dostavu i jači imunski odgovor. Korištenjem takvih inovativnih sustava također je omogućena primjena cjepiva neinvazivnim putevima primjene, poput intranazalne ili transdermalne primjene, čime se olakšava proizvodnja formulacije, aplikacija cjepiva i prihvatljivost od strane pacijenata. Uporaba liposoma u cjepivima pokazala je obećavajuće rezultate za prevenciju ili liječenje bakterijskih, virusnih i parazitskih oboljenja, ali i terapiju tumora o čemu svjedoče registrirani pripravci temeljeni na liposomima, a mnogi od njih su u fazama kliničkih ispitivanja.

6. POPIS OZNAKA I KRATICA

APC	Antigen-prezentirajuća stanica
AS(01(B;E); 02; 03; 04)	Adjuvanski sustav, eng. <i>Adjuvant System</i>
BCG	Bacille Calmette-Guerin
BLP-25	Fragment MUC1 tumorskog antigena
CAF(01; 05; 09)	Formulacija kationskih adjuvansa
CpG ODN	Deoksicitozin-deoksigvanozin oligodeoksinukleotida
CTL	Citotoksični T limfociti
DDAB	Dimetildioktadecilamonijev bromid
DOTAP	Dioleil-3-trimetilamonijev propan
EPC	Fosfatidilkolin iz jajeta
HA	Hemaglutinin
HER2	Humani epidermalni faktor rasta 2
HIV	Virus humane imunodeficijencije
HPV	Humani papiloma virus
HVJ	Hemaglutinirajući virus Japana
IFN- γ	Interferon gama
IgG/IgA/IgE	Imunoglobulin G/ Imunoglobulin A/ Imunoglobulin E
Lipid 1	O, O-dioleil-N- [3N- (N-metilimidazol jodid) propilen]fosforamidat
Lipid 2	O, O-dioleil-N-histamin fosforamidat
Man-lipid	β -D-manopiranosil-N-dodecilheksadekanamid
MPLA	Monofosforil-lipid A
MPR	Membranska proksimalna regija gp41 antigena HIV-a

NA	Neuraminidaza
OVA	Ovalbumin
PC	Fosfatidilkolin
PE	Fosfatidiletanolamin
PEG	Polietilenglikol
PG	Fosfatidilglicerol
pHIV-30	HIV-30 konjugiran s palmitinskom kiselinom;
pMPER	Vanjski dio MPER antigena konjugiran s palimitinskom kiselinom
poli (I:C)	Poliriboinozinska: poliribocitidilična kiselina
PS	Fosfatidilserin
PTH-rP	Peptid sličan paratireoidnom hormonu
QS-21	Saponinska frakcija 21 ekstrakta biljke Quillaja saponaria
RTS/S	Dio cirkumsporozitnog proteina kompleksiran s površinskim antigenom hepatitisa B
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
Tc	Temperatura faznog prijelaza
TDB	Trehaloza 6,6-dibihenat
Th1/Th2/Th17	T pomagački limfocit 1/ T pomagački limfocit 2/ T-pomagački limfocit 17
TT	Toksoid tetanusa
U/V emulzija	Emulzija tipa ulje u vodi
α -GalCer	Alfa-galaktozilceramid

7. LITERATURA

Aagaard C, Hoang T, Dietrich J, Cardona PJ, Izzo A, Dolganov G, Schoolnik GK, Cassidy JP, Billeskov R, Andersen P. A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nat Med*, 2011, 17(2), 189-94.

Ada GL. The ideal vaccine. *World J Microbiol Biotechnol*, 1991, 7(2), 105-9.

Agger EM, Rosenkrands I, Hansen J, Brahimi K, Vandahl BS, Aagaard C, Werninghaus K, Kirschning C, Lang R, Christensen D, Theisen M, Follmann F, Andersen P. Cationic liposomes formulated with synthetic mycobacterial cordfactor (CAF01): a versatile adjuvant for vaccines with different immunological requirements. *PLoS One*, 2008, 3(9), e3116.

Alzahrani SM, Al Doghaither HA, Al-Ghafari AB. General insight into cancer: An overview of colorectal cancer (Review). *Mol Clin Oncol*, 2021, 15(6), 271.

Andersen P, Scriba TJ. Moving tuberculosis vaccines from theory to practice. *Nat Rev Immunol* 19, 2019, 550–562

Arankalle VA, Lole KS, Deshmukh TM, Srivastava S, Shaligram US. Challenge studies in Rhesus monkeys immunized with candidate hepatitis E vaccines: DNA, DNA-prime-protein-boost and DNA-protein encapsulated in liposomes. *Vaccine*, 2009, 27(7), 1032-9.

Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of Action of Adjuvants. *Front Immunol*, 2013, 4, 114.

Badiee A, Jaafari MR, Khamesipour A, Samiei A, Soroush D, Kheiri MT, Barkhordari F, McMaster WR, Mahboudi F. The role of liposome charge on immune response generated in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63). *Exp Parasitol*, 2009a, 121(4), 362-9.

Badiee A, Jaafari MR, Khamesipour A, Samiei A, Soroush D, Kheiri MT, Barkhordari F, McMaster WR, Mahboudi F. Enhancement of immune response and protection in BALB/c mice

immunized with liposomal recombinant major surface glycoprotein of Leishmania (rgp63): the role of bilayer composition. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009b, 74(1), 37-44.

Badiee A, Khamesipour A, Samiei A, Soroush D, Shargh VH, Kheiri MT, Barkhordari F, Robert Mc Master W, Mahboudi F, Jaafari MR. The role of liposome size on the type of immune response induced in BALB/c mice against leishmaniasis: rgp63 as a model antigen. *Exp Parasitol*, 2012, 132(4), 403-9.

Bhowmick S, Mazumdar T, Sinha R, Ali N. Comparison of liposome based antigen delivery systems for protection against Leishmania donovani. *J Control Release*, 2010, 141(2), 199-207.

Bomsel M, Tudor D, Drillet AS, Alfsen A, Ganor Y, Roger MG, Mouz N, Amacker M, Chalifour A, Diomede L, Devillier G, Cong Z, Wei Q, Gao H, Qin C, Yang GB, Zurbriggen R, Lopalco L, Fleury S. Immunization with HIV-1 gp41 subunit virosomes induces mucosal antibodies protecting nonhuman primates against vaginal SHIV challenges. *Immunity*, 2011, 34(2), 269-280.

Bovier PA. Epaxal: a virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7(8), 1141-1150.

Brewer JM, Tetley L, Richmond J, Liew FY, Alexander J. Lipid vesicle size determines the Th1 or Th2 response to entrapped antigen. *J Immunol*, 1998, 161(8), 4000-7

Bungener L, de Mare A, de Vries-Idema J, Sehr P, van der Zee A, Wilschut J, Daemen T. A virosomal immunization strategy against cervical cancer and pre-malignant cervical disease. *Antivir Ther*, 2006, 11(6), 717-27.

Butterfield LH. Cancer vaccines. *BMJ*, 2015, 350, h988.

Çağdaş M, Sezer AD, Bucak S, Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. U: Application of Nanotechnology in Drug Delivery. Sezer AD, urednik, London, IntechOpen, 2014, str. 1-100

Cardona PJ. RUTI: a new chance to shorten the treatment of latent tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)*, 2006, 86(3-4), 273-289.

CDC- Administer the vaccine(s), 2021, <https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/admin/administer-vaccines.html>, pristupljeno 30.09.2021.

CDC- Key Facts About Seasonal Flu Vaccine, 2021, <https://www.cdc.gov/flu/prevent/keyfacts.htm>, pristupljeno 19. 09. 2021.

CDC- Malaria, 2021, <https://www.cdc.gov/malaria/about/faqs.html#disease>, pristupljeno 24.05.2021.

CDC- Tuberculosis vaccines, 2016, <https://www.cdc.gov/tb/topic/basics/vaccines.htm>, pristupljeno 21.09.2021.

CDC- What is HIV?, 2021, <https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>, pristupljeno 21.06.2021.

CDC-Immunization: The Basics, 2021, <https://www.cdc.gov/vaccines/vac-gen/imz-basics.htm>, pristupljeno 30.09.2021.

Cheng R, Fontana F, Xiao J, Liu Z, Figueiredo P, Shahbazi MA, Wang S, Jin J, Torrieri G, Hirvonen JT, Zhang H, Chen T, Cui W, Lu Y, Santos HA. Recombination Monophosphoryl Lipid A-Derived Vicosome for the Development of Preventive Cancer Vaccines. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(40), 44554-44562.

Clem AS. Fundamentals of Vaccine Immunology. *J Glob Infect Dis*, 2011, 3(1), 73–78.

Correale P, Del Vecchio MT, Renieri T, Di Genova G, La Placa M, Remondo C, Savellini GG, Terrosi C, Zurbriggen R, Amacker M, Francini G, Cusi MG. Anti-angiogenetic effects of immune-reconstituted influenza virosomes assembled with parathyroid hormone-related protein derived peptide vaccine. *Cancer Lett*, 2008, 263(2), 291-301.

Crompton PD, Pierce SK, Miller LH. Advances and challenges in malaria vaccine development. *J Clin Invest*, 2010, 120(12), 4168-4178.

Dattoo MS, Natama MH, Somé A, Traoré O, Rouamba T, Bellamy D, Yameogo P, Valia D, Tegneri M, Ouedraogo F, Soma R, Sawadogo S, Sorgho F, Derra K, Rouamba E, Orindi B,

Ramos Lopez F, Flaxman A, Cappuccini F, Kailath R, Elias S, Mukhopadhyay E, Noe A, Cairns M, Lawrie A, Roberts R, Valéa I, Sorgho H, Williams N, Glenn G, Fries L, Reimer J, Ewer KJ, Shaligram U, Hill AVS, Tinto H. Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2021, 397(10287), 1809-1818.

de Bruijn IA, Nauta J, Gerez L, Palache AM. The virosomal influenza vaccine Invivac: immunogenicity and tolerability compared to an adjuvanted influenza vaccine (Fluad in elderly subjects). *Vaccine*, 2006, 24(44-46), 6629-31.

Decaestecker K, Oosterlinck W. Managing the adverse events of intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy. *Res Rep Urol*, 2015, 7, 157-63.

Diogo GR, Hart P, Copland A, Kim MY, Tran AC, Poerio N, Singh M, Paul MJ, Fraziano M, Reljic R. Immunization With Mycobacterium tuberculosis Antigens Encapsulated in Phosphatidylserine Liposomes Improves Protection Afforded by BCG. *Front Immunol*, 2019, 10, 1349.

Doherty TM, Andersen P. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(4), 687-702.

ECDC- Disease factsheet about tetanus, <https://www.ecdc.europa.eu/en/tetanus/facts>, pristupljeno 05.07.2021.

EMA- HbVaxPro- European public assessment report, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/hbvaxpro>, pristupljeno 12.09.2021.

EMA- Hexacima- European public assessment report, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/hexacima>, pristupljeno 12.09.2021.

EMA- Infanrix hexa- European public assessment report, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/infanrix-hexa>, pristupljeno 12.09.2021.

EMA- Twinrix paediatric- European public assessment report,
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/twinrix-paediatric>; pristupljeno 12.09.2021.

EMA-Fendrix- European public assessment report,
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/fendrix>; pristupljeno 12.09.2021.

EMA-Mosquirix: Opinion on medicine for use outside EU,
<https://www.ema.europa.eu/en/mosquirix-h-w-2300>, pristupljeno 24.05.2021.

EMA-Twinrix adult- European public assessment report,
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/twinrix-adult>; pristupljeno 12.09.2021.

Espinosa DA, Christensen D, Muñoz C, Singh S, Locke E, Andersen P, Zavala F. Robust antibody and CD8+ T-cell responses induced by *P. falciparum* CSP adsorbed to cationic liposomal adjuvant CAF09 confer sterilizing immunity against experimental rodent malaria infection. *NPJ Vaccines*, 2017, 2, 10.

Even-Or O, Joseph A, Itskovitz-Cooper N, Samira S, Rochlin E, Eliyahu H, Goldwaser I, Balasingam S, Mann AJ, Lambkin-Williams R, Kedar E, Barenholz Y. A new intranasal influenza vaccine based on a novel polycationic lipid-ceramide carbamoyl-spermine (CCS). II. Studies in mice and ferrets and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*, 2011, 29(13), 2474-86.

Fernández-García R, Lalatsa A, Statts L, Bolás-Fernández F, Ballesteros MP, Serrano DR. Transferosomes as nanocarriers for drugs across the skin: Quality by design from lab to industrial scale. *Int J Pharm*, 2020, 573, 118817.

Garçon N, Di Pasquale A. From discovery to licensure, the Adjuvant System story. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(1), 19-33.

Giddam AK, Zaman M, Skwarczynski M, Toth I. Liposome-based delivery system for vaccine candidates: constructing an effective formulation. *Nanomedicine (Lond)*, 2012, 7(12), 1877-93

Glück R. Intranasal immunization against influenza. *J Aerosol Med*, 2002, 15(2), 221-8.

Glück R. Preclinical and clinical evaluation of a new virosomal intranasal influenza vaccine. *Int Congr, Elsevier*, 2001, 1219, 969-978

Greenwood B. The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014, 369(1645), 20130433

Guan HH, Budzynski W, Koganty RR, Krantz MJ, Reddish MA, Rogers JA, Longenecker BM, Samuel J. Liposomal formulations of synthetic MUC1 peptides: effects of encapsulation versus surface display of peptides on immune responses. *Bioconjug Chem*, 1998, 9(4), 451-458.

Guirado E, Gil O, Cáceres N, Singh M, Vilaplana C, Cardona PJ. Induction of a specific strong polyantigenic cellular immune response after short-term chemotherapy controls bacillary reactivation in murine and guinea pig experimental models of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*, 2008,15(8), 1229-1237.

Gupta PN, Mishra V, Singh P, Rawat A, Dubey P, Mahor S, Vyas SP. Tetanus toxoid-loaded transfersomes for topical immunization. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57(3), 295-301

Hafez IM, Cullis PR. Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(2-3), 139-148.

HALMED; Engerix B za djecu, Sažetak opisa svojstava lijeka,
https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Engerix-B-SPC_2.pdf, pristupljeno 12.09.2021.

HALMED; Engerix B za odrasle, Sažetak opisa svojstava lijeka,
<https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Engerix-B-SPC.pdf> , pristupljeno 12.09.2021.

Hampson AW. Vaccines for pandemic influenza. The history of our current vaccines, their limitations and the requirements to deal with a pandemic threat. *Ann Acad Med Singap*, 2008, 37(6), 510-7.

Hanson MC, Abraham W, Crespo MP, Chen SH, Liu H, Szeto GL, Kim M, Reinherz EL, Irvine DJ. Liposomal vaccines incorporating molecular adjuvants and intracellular T-cell help promote the immunogenicity of HIV membrane-proximal external region peptides. *Vaccine*, 2015, 33(7), 861-868.

Henriksen-Lacey M, Bramwell VW, Christensen D, Agger EM, Andersen P, Perrie Y. Liposomes based on dimethyldioctadecylammonium promote a depot effect and enhance immunogenicity of soluble antigen. *J Control Release*, 2010, 142(2), 180-6.

Henriksen-Lacey M, Korsholm KS, Andersen P, Perrie Y, Christensen D. Liposomal vaccine delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, 8(4), 505-519.

Herzog C, Hartmann K, Künzi V, Kürsteiner O, Mischler R, Lazar H, Glück R. Eleven years of Inflexal V-a virosomal adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine*, 2009, 27(33), 4381-7.

Hill AV. Vaccines against malaria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2011, 366(1579), 2806-2814.

HPRA-Summary of product characteristics-Inflexal V®, 2014,
https://www.hpra.ie/img/uploaded/swedocuments/LicenseSPC_PA0941-002-001_25032014125039.pdf, pristupljeno 19.09.2021.

Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine*, 2006, 1(3), 297-315.

Ishii N, Fukushima J, Kaneko T, Okada E, Tani K, Tanaka SI, Hamajima K, Xin KQ, Kawamoto S, Koff W, Nishioka K, Yasuda T, Okuda K. Cationic liposomes are a strong adjuvant for a DNA vaccine of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1997, 13(16), 1421-1428.

Iwasaki A, Omer SB. Why and How Vaccines Work. *Cell*, 2020, 183(2), 290-295.

Jiao X, Wang RY, Feng Z, Alter HJ, Shih JW. Modulation of cellular immune response against hepatitis C virus nonstructural protein 3 by cationic liposome encapsulated DNA immunization. *Hepatology*, 2003, 37(2), 452-60.

Jiao X, Wang RY, Qiu Q, Alter HJ, Shih JW. Enhanced hepatitis C virus NS3 specific Th1 immune responses induced by co-delivery of protein antigen and CpG with cationic liposomes. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 6), 1545-1553.

Joraku A, Homhuan A, Kawai K, Yamamoto T, Miyazaki J, Kogure K, Yano I, Harashima H, Akaza H. Immunoprotection against murine bladder carcinoma by octaarginine-modified liposomes incorporating cell wall of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *BJU Int*, 2009, 103(5), 686-93.

Kaur G, Garg T, Rath G, Goyal AK, Archaeosomes: an excellent carrier for drug and cell delivery. *Drug Delivery*, 2016, 23(7), 2497-2512

Kawai K, Miyazaki J, Joraku A, Nishiyama H, Akaza H. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. *Cancer Sci*, 2013, 104(1), 22-7.

Kersten GF, van de Put AM, Teerlink T, Beuvery EC, Crommelin DJ. Immunogenicity of liposomes and iscoms containing the major outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*: influence of protein content and liposomal bilayer composition. *Infect Immun*, 1988, 56(6), 1661-4.

Kim JH, Rerks-Ngarm S, Excler JL, Michael NL. HIV vaccines: lessons learned and the way forward. *Curr Opin HIV AIDS*, 2010, 5(5), 428-434.

Koff WC, Schenkelberg T. The future of vaccine development. *Vaccine*, 2020, 38(28), 4485-4486.

Koshy E, Mengting L, Kumar H, Jianbo W. Epidemiology, treatment and prevention of herpes zoster: A comprehensive review. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2018, 84(3), 251-262.

Kosik I, Yewdell JW. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase: Yin-Yang Proteins Coevolving to Thwart Immunity. *Viruses*, 2019, 11(4), 346.

Kour P, Rath G, Sharma G, Goyal AK. Recent advancement in nanocarriers for oral vaccination. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(sup3), S1102-S1114.

Kraaijeveld CA, Schilham M, Jansen J, Benaissa-Trouw B, Harmsen M, van Houte AJ, Snippe H. The effect of liposomal charge on the neutralizing antibody response against inactivated encephalomyocarditis and Semliki Forest viruses. *Clin Exp Immunol*, 1984, 56(3), 509-14.

Kulkarni SP, Thanapati S, Arankalle VA, Tripathy AS. Specific memory B cell response and participation of CD4+ central and effector memory T cells in mice immunized with liposome encapsulated recombinant NE protein based Hepatitis E vaccine candidate. *Vaccine*, 2016, 34(48), 5895-5902

Kumarasamy N, Poongulali S, Bollaerts A, Moris P, Beulah FE, Ayuk LN, Demoitie MA, Jongert E, Ofori-Anyinam O. A Randomized, Controlled Safety, and Immunogenicity Trial of the M72/AS01 Candidate Tuberculosis Vaccine in HIV-Positive Indian Adults. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(3), e2459.

Landi A, Law J, Hockman D, Logan M, Crawford K, Chen C, Kundu J, Ebensen T, Guzman CA, Deschatelets L, Krishnan L, Tyrrell DLJ, Houghton M. Superior immunogenicity of HCV envelope glycoproteins when adjuvanted with cyclic-di-AMP, a STING activator or archaeosomes. *Vaccine*, 2017, 35(50), 6949-6956.

Laurens MB. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. *Hum Vaccin Immunother*, 2020, 16(3), 480-489.

Liu H, Tu Z, Feng F, Shi H, Chen K, Xu X. Virosome, a hybrid vehicle for efficient and safe drug delivery and its emerging application in cancer treatment. *Acta Pharm*, 2015, 65(2), 105-16.

Liu F, Sun X, Fairman J, Lewis DB, Katz JM, Levine M, Tumpey TM, Lu X. A cationic liposome-DNA complexes adjuvant (JVRS-100) enhances the immunogenicity and cross-protective efficacy of pre-pandemic influenza A (H5N1) vaccine in ferrets. *Virology*, 2016, 492, 197-203.

Ma Y, Zhuang Y, Xie X, Wang C, Wang F, Zhou D, Zeng J, Cai L. The role of surface charge density in cationic liposome-promoted dendritic cell maturation and vaccine-induced immune responses. *Nanoscale*, 2011, 3(5), 2307-14.

Maltz F, Fidler B. Shingrix: A New Herpes Zoster Vaccine. *P T*, 2019, 44(7), 406-433.

Marasini N, Ghaffar KA, Skwarczynski M, Toth I, Chapter Twelve - Liposomes as a Vaccine Delivery System, U: Micro and Nanotechnology in Vaccine Development. Skwarczynski M, Toth I, urednici, Norwich, NY, William Andrew Publishing, Elsevier, 2017, str. 221-239

Mata E, Salvador A, Igartua M, Hernández RM, Pedraz JL. Malaria vaccine adjuvants: latest update and challenges in preclinical and clinical research. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:282913.

Merck manuals-Immunoglobulins (IgA, IgG, IgM)- <https://www.merckmanuals.com/-/media/Manual/LabTests/ImmunoglobulinsIgAIgGIgM>, posjećeno 22.10.2021.

Mischler R, Metcalfe IC. Inflexal V a trivalent virosome subunit influenza vaccine: production. *Vaccine*, 2002, 20 Suppl 5, B17-B23.

Mishra D, Mishra PK, Dubey V, Nahar M, Dabadghao S, Jain NK. Systemic and mucosal immune response induced by transcutaneous immunization using Hepatitis B surface antigen-loaded modified liposomes. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 33(4-5), 424-33.

Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM, Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface*, 2014, 11(101), 20140459.

Naito S, Horino A, Komiya T, Fukuda T, Takahashi M, Ami Y, Suzaki Y, Oka T, Okuma K, Morokuma M, Nakano Y, Mori M, Nishinohara S, Komuro K, Uchida T. Induction of Protection against Tetanus Toxin in Mice by Tetanus Toxoid–Liposome Conjugate. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998, 116, 215-219.

Nakamura T, Yamazaki D, Yamauchi J, Harashima H. The nanoparticulation by octaarginine-modified liposome improves α -galactosylceramide-mediated antitumor therapy via systemic administration. *J Control Release*, 2013, 171(2), 216-24.

Nakano Y, Mori M, Yamamura H, Naito S, Kato H, Taneichi M, Tanaka Y, Komuro K, Uchida T. Cholesterol inclusion in liposomes affects induction of antigen-specific IgG and IgE antibody production in mice by a surface-linked liposomal antigen. *Bioconjug Chem*, 2002, 13(4), 744-9.

Neutra M, Kozlowski P, Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol* 6, 2006, 148–158

NIDDK-What is viral hepatitis?, 2017, <https://www.niddk.nih.gov/health-information/liver-disease/viral-hepatitis/what-is-viral-hepatitis>, pristupljeno 08. 09. 2021.

North S, Butts C. Vaccination with BLP25 liposome vaccine to treat non-small cell lung and prostate cancers. *Expert Rev Vaccines*, 2005, 4(3), 249-57.

Orenstein WA, Ahmed R, Simply put: Vaccination saves lives. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(16), 4031–4033.

Pedersen GK, Andersen P, Christensen D, Immunocorrelates of CAF family adjuvants. *Semin Immunol*, 2018, 39, 4-13

Penn-Nicholson A, Geldenhuys H, Burny W, van der Most R, Day CL, Jongert E, Moris P, Hatherill M, Ofori-Anyinam O, Hanekom W; Vaccine Study Team, Bollaerts A, Demoitie MA, Kany Luabeya AK, De Ruymaeker E, Tameris M, Lapierre D, Scriba TJ. Safety and immunogenicity of candidate vaccine M72/AS01E in adolescents in a TB endemic setting. *Vaccine*, 2015, 33(32), 4025-4034.

Perche F, Benvegna T, Berchel M, Lebegue L, Pichon C, Jaffrès PA, Midoux P. Enhancement of dendritic cells transfection in vivo and of vaccination against B16F10 melanoma with mannosylated histidylated lipopolyplexes loaded with tumor antigen messenger RNA. *Nanomedicine*, 2011, 7(4), 445-53.

Plotkin SA. Vaccines: past, present and future. *Nat Med*, 2005, 11(4 Suppl), S5-S11.

Qiu Y, Guo L, Zhang S, Xu B, Gao Y, Hu Y, Hou J, Bai B, Shen H, Mao P. DNA-based vaccination against hepatitis B virus using dissolving microneedle arrays adjuvanted by cationic liposomes and CpG ODN. *Drug Deliv*, 2016, 23(7), 2391-2398.

Rappuoli R, Pizza M, Del Giudice G, De Gregorio E. Vaccines, new opportunities for a new society. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(34), 12288-12293.

Riaz MK, Riaz MA, Zhang X, Lin C, Wong KH, Chen X, Zhang G, Lu A, Yang Z. Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1), 195.

Rosada RS, de la Torre LG, Frantz FG, Trombone AP, Zárata-Bladés CR, Fonseca DM, Souza PR, Brandão IT, Masson AP, Soares EG, Ramos SG, Faccioli LH, Silva CL, Santana MH,

Coelho-Castelo AA. Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes. *BMC Immunol*, 2008, 9, 38.

Saguil A, Kane S, Mercado M, Lauters R. Herpes Zoster and Postherpetic Neuralgia: Prevention and Management. *Am Fam Physician*, 2017, 96(10), 656-663.

Sakaue G, Hiroi T, Nakagawa Y, Someya K, Iwatani K, Sawa Y, Takahashi H, Honda M, Kunisawa J, Kiyono H. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160-encapsulated hemagglutinating virus of Japan-liposome induces antigen-specific CTLs and neutralizing antibody responses. *J Immunol*, 2003, 170(1), 495-502.

Schijns V, Majhen D, van der Ley P, Thakur A, Summerfield A, Berisio R, Nativi C, Fernández-Tejada A, Alvarez-Dominguez C, Gizurarson S, Zamyatina A, Molinaro A, Rosano C, Jakopin Ž, Gursel I, McClean S. Rational Vaccine Design in Times of Emerging Diseases: The Critical Choices of Immunological Correlates of Protection, Vaccine Antigen and Immunomodulation. *Pharmaceutics*, 2021, 13(4), 501.

Schwendener, RA, Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances, *Ther Adv Vaccines*, 2014, 2(6), 159-182.

Sendi P, Locher R, Bucheli B, Battegay M, Intranasal Influenza Vaccine in a Working Population. *Clinical Infectious Diseases*, 2004, 38(7), 974–980

Shah RA, Limmer AL, Nwannunu CE, Patel RR, Mui UN, Tyring SK. Shingrix for Herpes Zoster: A Review. *Skin Therapy Lett*, 2019, 24(4), 5-7.

Shariat S, Badiie A, Jalali SA, Mansourian M, Yazdani M, Mortazavi SA, Jaafari MR. P5 HER2/neu-derived peptide conjugated to liposomes containing MPL adjuvant as an effective prophylactic vaccine formulation for breast cancer. *Cancer Lett*, 2014, 355(1), 54-60.

Shaw AR, Feinberg MB. Vaccines. *Clinical Immunology*, 2008, 1353-1382.

Shek PN, Yung BY, Stanacev NZ. Comparison between multilamellar and unilamellar liposomes in enhancing antibody formation. *Immunology*, 1983, 49(1), 37-44.

Shukla A, Khatri K, Gupta PN, Goyal AK, Mehta A, Vyas SP. Oral immunization against hepatitis B using bile salt stabilized vesicles (bilosomes). *J Pharm Pharm Sci*, 2008, 11(1), 59-66.

Siegrist CA. 2 - Vaccine Immunology, U: Plotkin's Vaccines (Seventh Edition), Editor(s): Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM, urednici, Philadelphia, PA, *Elsevier*, 2018, str. 16-34

Singh G, Song S, Choi E, Lee PB, Nahm FS. Recombinant zoster vaccine (Shingrix®): a new option for the prevention of herpes zoster and postherpetic neuralgia. *Korean J Pain*, 2020, 33(3), 201-207.

Smith LR, Wloch MK, Ye M, Reyes LR, Boutsaboualoy S, Dunne CE, Chaplin JA, Rusalov D, Rolland AP, Fisher CL, Al-Ibrahim MS, Kabongo ML, Steigbigel R, Belshe RB, Kitt ER, Chu AH, Moss RB. Phase 1 clinical trials of the safety and immunogenicity of adjuvanted plasmid DNA vaccines encoding influenza A virus H5 hemagglutinin. *Vaccine*, 2010, 28(13):2565-2572.

Sokolova V, Westendorf AM, Buer J, Überla K, Epple M. The potential of nanoparticles for the immunization against viral infections. *J Mater Chem B*. 2015, 3(24), 4767-4779.

Sterling TR, Njie G, Zenner D, Cohn DL, Reves R, Ahmed A, Menzies D, Horsburgh CR Jr, Crane CM, Burgos M, LoBue P, Winston CA, Belknap R. Guidelines for the Treatment of Latent Tuberculosis Infection: Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, 2020. *MMWR Recomm Rep*, 2020, 69(1):1-11.

Stewart E, Triccas JA, Petrovsky N., 2019, Adjuvant Strategies for More Effective Tuberculosis Vaccine Immunity. *Microorganisms*, 2019, 7(8):255.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209-249.

Tan L, Weissig V, Gregoriadis G. Comparison of the immune response against polio peptides covalently-surface-linked to and internally-entrapped in liposomes. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 1991, 9(1):25-30

Tandrup Schmidt S, Foged C, Korsholm KS, Rades T, Christensen D. Liposome-Based Adjuvants for Subunit Vaccines: Formulation Strategies for Subunit Antigens and Immunostimulators. *Pharmaceutics*, 2016, 8(1):7.

Thompson FM, Porter DW, Okitsu SL, Westerfeld N, Vogel D, Todryk S, Poulton I, Correa S, Hutchings C, Berthoud T, Dunachie S, Andrews L, Williams JL, Sinden R, Gilbert SC, Pluschke G, Zurbriggen R, Hill AV. Evidence of blood stage efficacy with a virosomal malaria vaccine in a phase IIa clinical trial. *PLoS One*, 2008, 3(1):e1493

UNAIDS- Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet, 2021,
<https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>, pristupljeno 21.6.2021.

Van Der Meeren O, Hatherill M, Nduba V, Wilkinson RJ, Muyoyeta M, Van Brakel E, Ayles HM, Henostroza G, Thienemann F, Scriba TJ, Diacon A, Blatner GL, Demoitié MA, Tameris M, Malahleha M, Innes JC, Hellström E, Martinson N, Singh T, Akite EJ, Khatoon Azam A, Bollaerts A, Ginsberg AM, Evans TG, Gillard P, Tait DR. Phase 2b Controlled Trial of M72/AS01E Vaccine to Prevent Tuberculosis. *N Engl J Med*, 2018, 379(17):1621-1634.

van Dissel JT, Joosten SA, Hoff ST, Soonawala D, Prins C, Hokey DA, O'Dee DM, Graves A, Thierry-Carstensen B, Andreasen LV, Ruhwald M, de Visser AW, Agger EM, Ottenhoff, Ingrid Kromann THM, Andersen P. A novel liposomal adjuvant system, CAF01, promotes long-lived Mycobacterium tuberculosis-specific T-cell responses in human. *Vaccine*, 2014, 32(52):7098-7107

Vanić Ž. Liposomi kao nosači lijekova: strukturna svojstva i klasifikacija. *Farm glas*, 68 (2012), 6; 391-400.

Verma P, Pathak K. Therapeutic and cosmeceutical potential of ethosomes: An overview. *J Adv Pharm Technol Res*, 2010, 1(3):274-282.

Wang C, Liu P, Zhuang Y, Li P, Jiang B, Pan H, Liu L, Cai L, Ma Y. Lymphatic-targeted cationic liposomes: a robust vaccine adjuvant for promoting long-term immunological memory. *Vaccine*, 2014, 32(42):5475-83.

Wang N, Chen M, Wang T. Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: From basics to clinical immunization. *J Control Release*, 2019, 303:130-150.

Watson DS, Endsley AN, Huang L. Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine*, 2012, 30(13):2256-72.

Watson DS, Platt VM, Cao L, Venditto VJ, Szoka FC Jr. Antibody response to polyhistidine-tagged peptide and protein antigens attached to liposomes via lipid-linked nitrilotriacetic acid in mice. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(2):289-297.

WHO- BCG vaccine, <https://www.who.int/teams/health-product-and-policy-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/bcg>, pristupljeno 21.09.2021.

WHO- Hepatitis A, 2021, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-a>, pristupljeno 08.09.2021.

WHO- Hepatitis E vaccine Hecolin®, https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/october/2_HepEvaccsafety_immunogenicity_efficacy_final_1Oct2014.pdf, pristupljeno 13.10.2021.

WHO- Tuberculosis, https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_, pristupljeno 21.09.2021.

WHO-Ebola virus disease: Vaccines, <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/ebola-vaccines>, pristupljeno 24.10.2021.

WHO-Vaccine-preventable diseases, <https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases>, pristupljeno 24.10.2021.

Wilson KL, Xiang SD, Plebanski M, Chapter Six - Inflammatory/Noninflammatory Adjuvants and Nanotechnology—The Secret to Vaccine Design, U: Micro and Nanotechnology in Vaccine Development, Skwarczynski M, Toth I, urednici, Norwich, NY, William Andrew Publishing, Elsevier, 2017, str. 99-125

Woodworth JS, Christensen D, Cassidy JP, 2019, Mucosal boosting of H56:CAF01 immunization promotes lung-localized T cells and an accelerated pulmonary response to *Mycobacterium tuberculosis* infection without enhancing vaccine protection. *Mucosal Immunol*, 12, 816–826

Xia W, Wang J, Xu Y, Jiang F, Xu L. L-BLP25 as a peptide vaccine therapy in non-small cell lung cancer: a review. *J Thorac Dis*, 2014, 6(10):1513-20.

Yanasarn N, Sloat BR, Cui Z. Negatively charged liposomes show potent adjuvant activity when simply admixed with protein antigens. *Mol Pharm*, 2011, 8(4):1174-1185.

Yasuda T, Dancey GF, Kinsky SC. Immunogenicity of liposomal model membranes in mice: dependence on phospholipid composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, 74(3):1234-6.

Yotsumoto S, Kakiuchi T, Aramaki Y. Enhancement of IFN-gamma production for Th1-cell therapy using negatively charged liposomes containing phosphatidylserine. *Vaccine*, 2007, 25(29):5256-62

Zhou WZ, Hoon DS, Huang SK, Fujii S, Hashimoto K, Morishita R, Kaneda Y. RNA melanoma vaccine: induction of antitumor immunity by human glycoprotein 100 mRNA immunization. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(16):2719-24

ZZJZDNZ- Tetanus, <https://www.zzjzdnz.hr/zdravlje/prevenција-zaraznih-bolesti/1123>, pristupljeno 05.07.2021.

8. SAŽETAK

Cijepljenje predstavlja jednu od najučinkovitijih preventivnih mjera zaštite populacije protiv raznih zaraznih bolesti. S ciljem unaprijeđenja postojećih cjepiva ili razvitka novih cjepiva protiv zaraznih, ali i nezaraznih bolesti, liposomi su istraživani kao adjuvanski i transportni sustavi. Ključne prednosti korištenja liposoma u cjepivima ogledaju se u zaštiti antigena od razgradnje, vezanja/uklapanja jednog ili više hidrofилnih i lipofilnih antigena, kontroliranju oslobađanja antigena, većoj unutarstaničnoj dostavi i poboljšavanju antigen-specifičnog imunološkog odgovora. Liposomi su istraživani u cjepivima za prevenciju ili liječenje bakterijskih, virusnih i parazitskih oboljenja, ali i imunoterapiju tumora. Primjenom liposoma smanjuje se potrebna doza cjepiva za učinkovit imunološki odgovor te su omogućeni i drugi putevi imunizacije (preko sluznica i kože). Intenzivna istraživanja u ovom području rezultirala su registriranim liposomskim cjepivima, dok su brojni u različitim fazama kliničkih ispitivanja.

9. SUMMARY

Vaccination is considered to be one of the most effective methods of protection against many infectious diseases. Liposomes have been investigated as adjuvants and vaccine delivery systems against viral, bacterial and parasitic infections as well as and non-infectious diseases such as tumor immunotherapy. Primary benefits attributed to liposomes include: protection of antigens, delivery of one or more hydrophilic or hydrophobic antigens embedded in liposomes or attached to a liposomal surface, controlled antigens release, increased intracellular delivery and antigen-specific immune response. Therefore, liposomes-based vaccines require smaller doses needed to generate a protective immune response, and also provide an alternative route of immunization (through the skin and mucosa). Extensive research in this area resulted in registered liposomal vaccines, while many are in different phases of clinical trials.

10. PRILOZI

Prilog 1. Dozvola *Royal Society of Chemistry* za preuzimanje i prilagodbu slike iz Sokolova i sur. (2015).



ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY

Check for updates

View PDF Version Previous Article Next Article

Open Access Article

 This Open Access Article is licensed under a [Creative Commons Attribution-Non Commercial 3.0 Unported Licence](#)

DOI: [10.1039/C5TB00618J](https://doi.org/10.1039/C5TB00618J) (Review Article) *J. Mater. Chem. B*, 2015, **3**, 4767-4779

The potential of nanoparticles for the immunization against viral infections

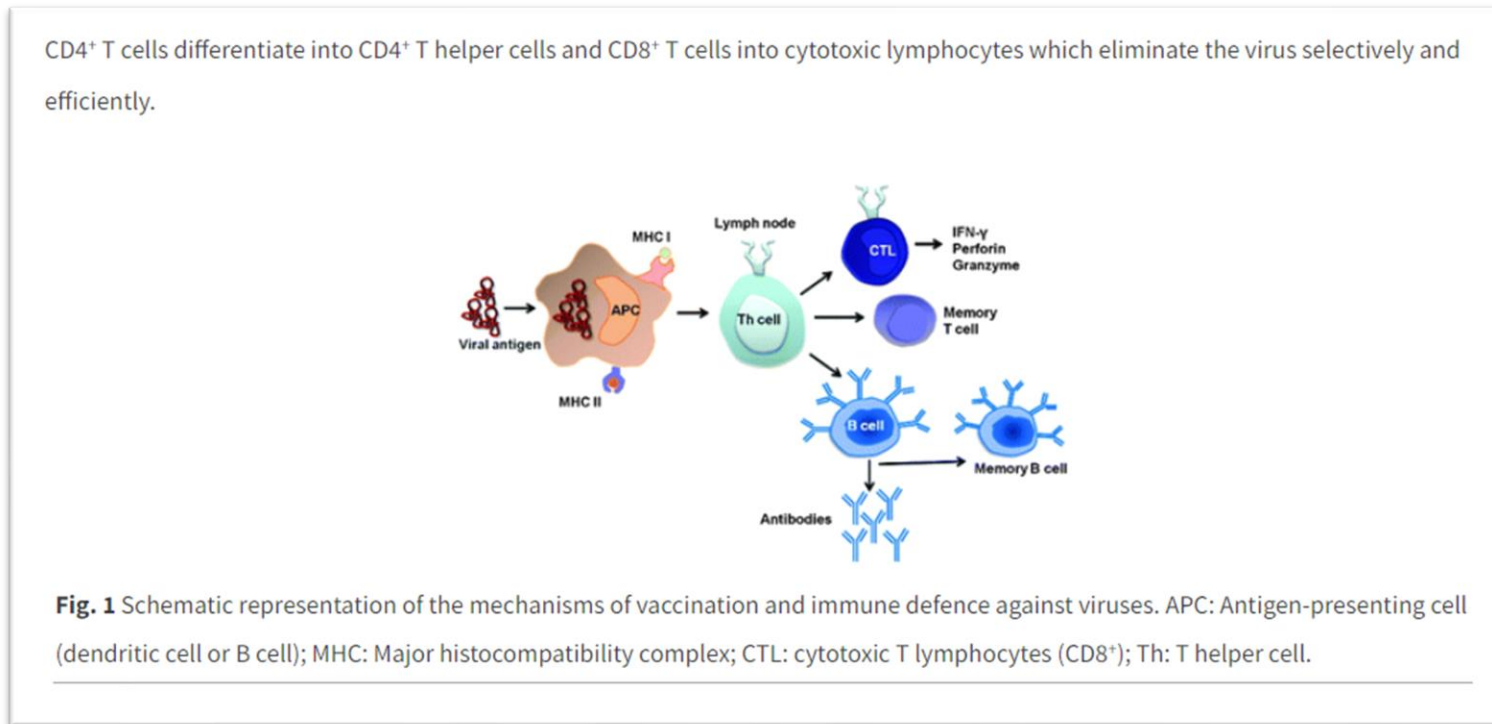
Viktoriya Sokolova^a Astrid Maria Westendorf^b Jan Buer^b Klaus Überla^c and Matthias Fehle^{*a}

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence. You can use material from this article in other publications, without requesting further permission from the RSC, provided that the correct acknowledgement is given and it is not used for commercial purposes. To request permission to reproduce material from this article in a commercial publication, please go to the Copyright Clearance Center request page. If you are an author contributing to an RSC publication, you do not need to request permission provided correct acknowledgement is given. If you are the author of this article, you do not need to request

permission to reproduce figures and diagrams provided correct acknowledgement is given. If you want to reproduce the whole article in a third-party commercial publication (excluding your thesis/dissertation for which permission is not required) please go to the Copyright Clearance Center request page.

DOI: <https://doi.org/10.1039/C5TB00618J>



Preuzeto prema Attribution-NonCommercial 3.0 Unported (CC BY-NC 3.0) licenci: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>

Attribution-NonCommercial 3.0 Unported



CREATIVE COMMONS CORPORATION IS NOT A LAW FIRM AND DOES NOT PROVIDE LEGAL SERVICES. DISTRIBUTION OF THIS LICENSE DOES NOT CREATE AN ATTORNEY-CLIENT RELATIONSHIP. CREATIVE COMMONS PROVIDES THIS INFORMATION ON AN "AS-IS" BASIS. CREATIVE COMMONS MAKES NO WARRANTIES REGARDING THE INFORMATION PROVIDED, AND DISCLAIMS LIABILITY FOR DAMAGES RESULTING FROM ITS USE.

License

THE WORK (AS DEFINED BELOW) IS PROVIDED UNDER THE TERMS OF THIS CREATIVE COMMONS PUBLIC LICENSE ("CCPL" OR "LICENSE"). THE WORK IS PROTECTED BY COPYRIGHT AND/OR OTHER APPLICABLE LAW. ANY USE OF THE WORK OTHER THAN AS AUTHORIZED UNDER THIS LICENSE OR COPYRIGHT LAW IS PROHIBITED.

BY EXERCISING ANY RIGHTS TO THE WORK PROVIDED HERE, YOU ACCEPT AND AGREE TO BE BOUND BY THE TERMS OF THIS LICENSE. TO THE EXTENT THIS LICENSE MAY BE CONSIDERED TO BE A CONTRACT, THE LICENSOR GRANTS YOU THE RIGHTS CONTAINED HERE IN CONSIDERATION OF YOUR ACCEPTANCE OF SUCH TERMS AND CONDITIONS.

1. Definitions

- a. **"Adaptation"** means a work based upon the Work, or upon the Work and other pre-existing works, such as a translation, adaptation, derivative work, arrangement of music or other alterations of a literary or artistic work, or phonogram or performance and includes cinematographic adaptations or any other form in which the Work may be recast, transformed, or adapted including in any form recognizably derived from the original, except that a work that constitutes a Collection will not be considered an Adaptation for the purpose of this License. For the avoidance of doubt, where the Work is a musical work, performance or phonogram, the synchronization of the Work in timed-relation with a moving image ("synching") will be considered an Adaptation for the purpose of this License.
- b. **"Collection"** means a collection of literary or artistic works, such as encyclopedias and anthologies, or performances, phonograms or broadcasts, or other works or subject matter other than works listed in Section 1(f) below, which, by reason of the selection and arrangement of their contents, constitute intellectual creations, in which the Work is included in its entirety in unmodified form along with one or more other contributions, each constituting separate and independent works in themselves, which together are assembled into a collective whole. A work that constitutes a Collection will not be considered an Adaptation (as defined above) for the purposes of this License.
- c. **"Distribute"** means to make available to the public the original and copies of the Work or Adaptation, as appropriate, through sale or other transfer of ownership.
- d. **"Licensor"** means the individual, individuals, entity or entities that offer(s) the Work under the terms of this License.

- e. **"Original Author"** means, in the case of a literary or artistic work, the individual, individuals, entity or entities who created the Work or if no individual or entity can be identified, the publisher; and in addition (i) in the case of a performance the actors, singers, musicians, dancers, and other persons who act, sing, deliver, declaim, play in, interpret or otherwise perform literary or artistic works or expressions of folklore; (ii) in the case of a phonogram the producer being the person or legal entity who first fixes the sounds of a performance or other sounds; and, (iii) in the case of broadcasts, the organization that transmits the broadcast.
- f. **"Work"** means the literary and/or artistic work offered under the terms of this License including without limitation any production in the literary, scientific and artistic domain, whatever may be the mode or form of its expression including digital form, such as a book, pamphlet and other writing; a lecture, address, sermon or other work of the same nature; a dramatic or dramatico-musical work; a choreographic work or entertainment in dumb show; a musical composition with or without words; a cinematographic work to which are assimilated works expressed by a process analogous to cinematography; a work of drawing, painting, architecture, sculpture, engraving or lithography; a photographic work to which are assimilated works expressed by a process analogous to photography; a work of applied art; an illustration, map, plan, sketch or three-dimensional work relative to geography, topography, architecture or science; a performance; a broadcast; a phonogram; a compilation of data to the extent it is protected as a copyrightable work; or a work performed by a variety or circus performer to the extent it is not otherwise considered a literary or artistic work.
- g. **"You"** means an individual or entity exercising rights under this License who has not previously violated the terms of this License with respect to the Work, or who has received express permission from the Licensor to exercise rights under this License despite a previous violation.
- h. **"Publicly Perform"** means to perform public recitations of the Work and to communicate to the public those public recitations, by any means or process, including by wire or wireless means or public digital performances; to make available to the public Works in such a way that members of the public may access these Works from a place and at a place individually chosen by them; to perform the Work to the public by any means or process and the communication to the public of the performances of the Work, including by public digital performance; to broadcast and rebroadcast the Work by any means including signs, sounds or images.
- i. **"Reproduce"** means to make copies of the Work by any means including without limitation by sound or visual recordings and the right of fixation and reproducing fixations of the Work, including storage of a protected performance or phonogram in digital form or other electronic medium.

2. Fair Dealing Rights. Nothing in this License is intended to reduce, limit, or restrict any uses free from copyright or rights arising from limitations or exceptions that are provided for in connection with the copyright protection under copyright law or other applicable laws.

3. License Grant. Subject to the terms and conditions of this License, Licensor hereby grants You a worldwide, royalty-free, non-exclusive, perpetual (for the duration of the applicable copyright) license to exercise the rights in the Work as stated below:

- a. to Reproduce the Work, to incorporate the Work into one or more Collections, and to Reproduce the Work as incorporated in the Collections;
- b. to create and Reproduce Adaptations provided that any such Adaptation, including any translation in any medium, takes reasonable steps to clearly label, demarcate or otherwise identify that changes were made to the original Work. For example, a translation could be marked "The original work was translated from English to Spanish," or a modification could indicate "The original work has been modified.";

- c. to Distribute and Publicly Perform the Work including as incorporated in Collections; and,
- d. to Distribute and Publicly Perform Adaptations.

The above rights may be exercised in all media and formats whether now known or hereafter devised. The above rights include the right to make such modifications as are technically necessary to exercise the rights in other media and formats. Subject to Section 8(f), all rights not expressly granted by Licensor are hereby reserved, including but not limited to the rights set forth in Section 4(d).

4. Restrictions. The license granted in Section 3 above is expressly made subject to and limited by the following restrictions:

- a. You may Distribute or Publicly Perform the Work only under the terms of this License. You must include a copy of, or the Uniform Resource Identifier (URI) for, this License with every copy of the Work You Distribute or Publicly Perform. You may not offer or impose any terms on the Work that restrict the terms of this License or the ability of the recipient of the Work to exercise the rights granted to that recipient under the terms of the License. You may not sublicense the Work. You must keep intact all notices that refer to this License and to the disclaimer of warranties with every copy of the Work You Distribute or Publicly Perform. When You Distribute or Publicly Perform the Work, You may not impose any effective technological measures on the Work that restrict the ability of a recipient of the Work from You to exercise the rights granted to that recipient under the terms of the License. This Section 4(a) applies to the Work as incorporated in a Collection, but this does not require the Collection apart from the Work itself to be made subject to the terms of this License. If You create a Collection, upon notice from any Licensor You must, to the extent practicable, remove from the Collection any credit as required by Section 4(c), as requested. If You create an Adaptation, upon notice from any Licensor You must, to the extent practicable, remove from the Adaptation any credit as required by Section 4(c), as requested.
- b. You may not exercise any of the rights granted to You in Section 3 above in any manner that is primarily intended for or directed toward commercial advantage or private monetary compensation. The exchange of the Work for other copyrighted works by means of digital file-sharing or otherwise shall not be considered to be intended for or directed toward commercial advantage or private monetary compensation, provided there is no payment of any monetary compensation in connection with the exchange of copyrighted works.
- c. If You Distribute, or Publicly Perform the Work or any Adaptations or Collections, You must, unless a request has been made pursuant to Section 4(a), keep intact all copyright notices for the Work and provide, reasonable to the medium or means You are utilizing: (i) the name of the Original Author (or pseudonym, if applicable) if supplied, and/or if the Original Author and/or Licensor designate another party or parties (e.g., a sponsor institute, publishing entity, journal) for attribution ("Attribution Parties") in Licensor's copyright notice, terms of service or by other reasonable means, the name of such party or parties; (ii) the title of the Work if supplied; (iii) to the extent reasonably practicable, the URI, if any, that Licensor specifies to be associated with the Work, unless such URI does not refer to the copyright notice or licensing information for the Work; and, (iv) consistent with Section 3(b), in the case of an Adaptation, a credit identifying the use of the Work in the Adaptation (e.g., "French translation of the Work by Original Author," or "Screenplay based on original Work by Original Author"). The credit required by this Section 4(c) may be implemented in any reasonable manner; provided, however, that in the case of a Adaptation or Collection, at a minimum such credit will appear, if a credit for all contributing authors of the Adaptation or Collection appears, then as part of these credits and in a manner at least as prominent as the credits for the other contributing authors. For the avoidance of doubt, You may only use the credit required by this Section for the purpose of attribution in the manner set out above and, by exercising Your rights under this License, You may not implicitly or explicitly assert or imply any connection with, sponsorship or

endorsement by the Original Author, Licensor and/or Attribution Parties, as appropriate, of You or Your use of the Work, without the separate, express prior written permission of the Original Author, Licensor and/or Attribution Parties.

- d. For the avoidance of doubt:
- i. **Non-waivable Compulsory License Schemes.** In those jurisdictions in which the right to collect royalties through any statutory or compulsory licensing scheme cannot be waived, the Licensor reserves the exclusive right to collect such royalties for any exercise by You of the rights granted under this License;
 - ii. **Waivable Compulsory License Schemes.** In those jurisdictions in which the right to collect royalties through any statutory or compulsory licensing scheme can be waived, the Licensor reserves the exclusive right to collect such royalties for any exercise by You of the rights granted under this License if Your exercise of such rights is for a purpose or use which is otherwise than noncommercial as permitted under Section 4(b) and otherwise waives the right to collect royalties through any statutory or compulsory licensing scheme; and,
 - iii. **Voluntary License Schemes.** The Licensor reserves the right to collect royalties, whether individually or, in the event that the Licensor is a member of a collecting society that administers voluntary licensing schemes, via that society, from any exercise by You of the rights granted under this License that is for a purpose or use which is otherwise than noncommercial as permitted under Section 4(c).
- e. Except as otherwise agreed in writing by the Licensor or as may be otherwise permitted by applicable law, if You Reproduce, Distribute or Publicly Perform the Work either by itself or as part of any Adaptations or Collections, You must not distort, mutilate, modify or take other derogatory action in relation to the Work which would be prejudicial to the Original Author's honor or reputation. Licensor agrees that in those jurisdictions (e.g. Japan), in which any exercise of the right granted in Section 3(b) of this License (the right to make Adaptations) would be deemed to be a distortion, mutilation, modification or other derogatory action prejudicial to the Original Author's honor and reputation, the Licensor will waive or not assert, as appropriate, this Section, to the fullest extent permitted by the applicable national law, to enable You to reasonably exercise Your right under Section 3(b) of this License (right to make Adaptations) but not otherwise.

5. Representations, Warranties and Disclaimer

UNLESS OTHERWISE MUTUALLY AGREED TO BY THE PARTIES IN WRITING, LICENSOR OFFERS THE WORK AS-IS AND MAKES NO REPRESENTATIONS OR WARRANTIES OF ANY KIND CONCERNING THE WORK, EXPRESS, IMPLIED, STATUTORY OR OTHERWISE, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, WARRANTIES OF TITLE, MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, NONINFRINGEMENT, OR THE ABSENCE OF LATENT OR OTHER DEFECTS, ACCURACY, OR THE PRESENCE OF ABSENCE OF ERRORS, WHETHER OR NOT DISCOVERABLE. SOME JURISDICTIONS DO NOT ALLOW THE EXCLUSION OF IMPLIED WARRANTIES, SO SUCH EXCLUSION MAY NOT APPLY TO YOU.

6. Limitation on Liability. EXCEPT TO THE EXTENT REQUIRED BY APPLICABLE LAW, IN NO EVENT WILL LICENSOR BE LIABLE TO YOU ON ANY LEGAL THEORY FOR ANY SPECIAL, INCIDENTAL, CONSEQUENTIAL, PUNITIVE OR EXEMPLARY DAMAGES ARISING OUT OF THIS LICENSE OR THE USE OF THE WORK, EVEN IF LICENSOR HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES.

7. Termination

- a. This License and the rights granted hereunder will terminate automatically upon any breach by You of the terms of this License. Individuals or entities who have received Adaptations or Collections from You under this License, however, will not have their licenses terminated provided such individuals or entities remain in full compliance with those licenses. Sections 1, 2, 5, 6, 7, and 8 will survive any termination of this License.
- b. Subject to the above terms and conditions, the license granted here is perpetual (for the duration of the applicable copyright in the Work). Notwithstanding the above, Licensor reserves the right to release the Work under different license terms or to stop distributing the Work at any time; provided, however that any such election will not serve to withdraw this License (or any other license that has been, or is required to be, granted under the terms of this License), and this License will continue in full force and effect unless terminated as stated above.

8. Miscellaneous

- a. Each time You Distribute or Publicly Perform the Work or a Collection, the Licensor offers to the recipient a license to the Work on the same terms and conditions as the license granted to You under this License.
- b. Each time You Distribute or Publicly Perform an Adaptation, Licensor offers to the recipient a license to the original Work on the same terms and conditions as the license granted to You under this License.
- c. If any provision of this License is invalid or unenforceable under applicable law, it shall not affect the validity or enforceability of the remainder of the terms of this License, and without further action by the parties to this agreement, such provision shall be reformed to the minimum extent necessary to make such provision valid and enforceable.
- d. No term or provision of this License shall be deemed waived and no breach consented to unless such waiver or consent shall be in writing and signed by the party to be charged with such waiver or consent.
- e. This License constitutes the entire agreement between the parties with respect to the Work licensed here. There are no understandings, agreements or representations with respect to the Work not specified here. Licensor shall not be bound by any additional provisions that may appear in any communication from You. This License may not be modified without the mutual written agreement of the Licensor and You.
- f. The rights granted under, and the subject matter referenced, in this License were drafted utilizing the terminology of the Berne Convention for the Protection of Literary and Artistic Works (as amended on September 28, 1979), the Rome Convention of 1961, the WIPO Copyright Treaty of 1996, the WIPO Performances and Phonograms Treaty of 1996 and the Universal Copyright Convention (as revised on July 24, 1971). These rights and subject matter take effect in the relevant jurisdiction in which the License terms are sought to be enforced according to the corresponding provisions of the implementation of those treaty provisions in the applicable national law. If the standard suite of rights granted under applicable copyright law includes additional rights not granted under this License, such additional rights are deemed to be included in the License; this License is not intended to restrict the license of any rights under applicable law.

Creative Commons Notice

Creative Commons is not a party to this License, and makes no warranty whatsoever in connection with the Work. Creative Commons will not be liable to You or any party on any legal theory for any damages whatsoever, including without limitation any general, special, incidental or consequential damages arising in connection to this license. Notwithstanding the foregoing two (2) sentences, if Creative Commons has expressly identified itself as the Licensor hereunder, it shall have all rights and obligations of Licensor.

Except for the limited purpose of indicating to the public that the Work is licensed under the CCPL, Creative Commons does not authorize the use by either party of the trademark "Creative Commons" or any related trademark or logo of Creative Commons without the prior written consent of Creative Commons. Any permitted use will be in compliance with Creative Commons' then-current trademark usage guidelines, as may be published on its website or otherwise made available upon request from time to time. For the avoidance of doubt, this trademark restriction does not form part of the License.


Prilog 2. Dozvola Elsevier-a za preuzimanje i prilagodbu slike iz Siegrist (2018).


<https://s100.copyright.com//CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=80be1fc6-9a55-44f7-bebd-12e120ac74c1>


Prilog 3. Dozvola *The Royal Society* za preuzimanje i prilagodbu slike iz Hill (2011).



PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY B


BIOLOGICAL SCIENCES

 Open Access

 Check for updates

 **View PDF**

 Tools  Share


Cite this article 

Section

Abstract

Articles





Vaccines against malaria

Adrian V. S. Hill 

Published: 12 October 2011 | <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0091>

Abstract

There is no licenced vaccine against any human parasitic disease and *Plasmodium falciparum* malaria, a major cause of infectious mortality, presents a great challenge to vaccine developers. This has led to the assessment of a wide variety of approaches to malaria vaccine design and development, assisted by the availability of a safe challenge model for small-scale efficacy testing of vaccine candidates. Malaria vaccine

 **Details**  References  Related  Figures


Published online 12/10/2011

Published in print 12/10/2011

License:

This journal is © 2011 The Royal Society

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



briefly survey a broader range of approaches.

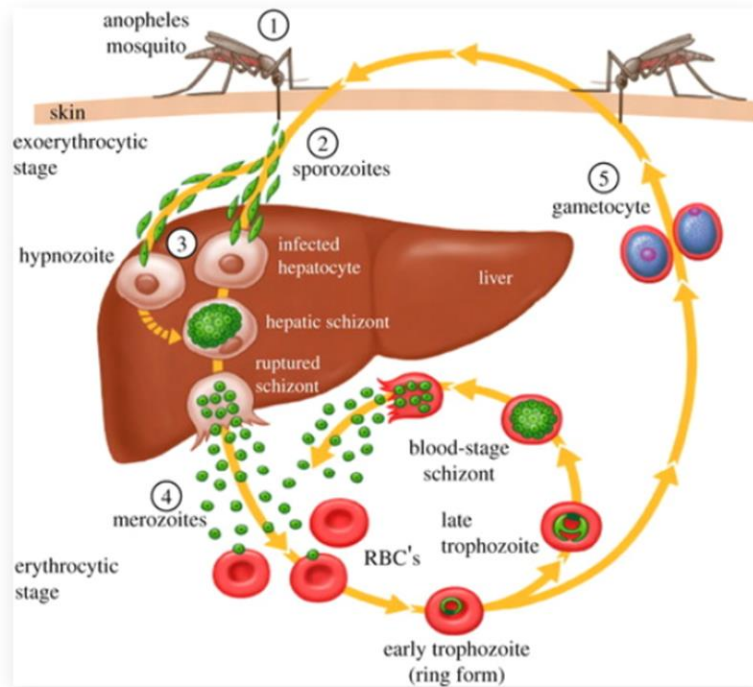


Figure 1. Life cycle of the malaria parasite illustrating the various stages that are relevant to vaccine design. These are (1) the anopheline mosquito vector, used in experimental protocols to immunize with irradiated sporozoites administered by mosquito bite; (2) the sporozoite, the target of several vaccines, including RTS,S; (3) the liver-stage, usually targeted by vectored vaccines; (4) the blood-stage, usually targeted by protein in adjuvant vaccine candidates. Merozoite antigens have been most often included in blood-stage vaccines; (5) the gametocyte which along with the ookinete, formed after fertilization in the mosquito midgut, is the source of parasite antigens used in sexual-stage transmission-blocking vaccines. Pre-erythrocytic vaccines, which target the sporozoite and the liver-stage parasite are intended to prevent infection as well as disease while blood-stage vaccines are intended to prevent clinical illness and death.

Details References Related Figures

Discussion Meeting issue 'New vaccines for global health' organized and edited by Brian Greenwood and Adrian V. S. Hill

Article Information

DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0091>
 PubMed: 21893544
 Published by: Royal Society
 Print ISSN: 0962-8436
 Online ISSN: 1471-2970

History:

Published online 12/10/2011
 Published in print 12/10/2011

License:

This journal is © 2011 The Royal Society

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



Article Metrics

[View All Metrics](#)

Preuzeto prema Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) licenci: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0091>

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku tehnologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

LIPOSOMI U CJEPIVIMA

Karla Domitrović

SAŽETAK

Cijepljenje predstavlja jednu od najučinkovitijih preventivnih mjera zaštite populacije protiv raznih zaraznih bolesti. S ciljem unaprijeđenja postojećih cjepiva ili razvitka novih cjepiva protiv zaraznih, ali i nezaraznih bolesti, liposomi su istraživani kao adjuvanski i transportni sustavi. Ključne prednosti korištenja liposoma u cjepivima ogledaju se u zaštiti antigena od razgradnje, vezanja/uklapanja jednog ili više hidrofilnih i lipofilnih antigena, kontroliranju oslobađanja antigena, većoj unutarstaničnoj dostavi i poboljšavanju antigen-specifičnog imunološkog odgovora. Liposomi su istraživani u cjepivima za prevenciju ili liječenje bakterijskih, virusnih i parazitskih oboljenja, ali i imunoterapiju tumora. Primjenom liposoma smanjuje se potrebna doza cjepiva za učinkovit imunološki odgovor te su omogućeni i drugi putevi imunizacije (preko sluznica i kože). Intenzivna istraživanja u ovom području rezultirala su registriranim liposomskim cjepivima, dok su brojni u različitim fazama kliničkih ispitivanja.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 69 stranica, 3 grafičkih prikaza, 4 tablica i 149 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Liposomi, cjepivo, profilaktično, terapijsko, imunosni odgovor

Mentor: **Dr. sc. Željka Vanić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željka Vanić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ivan Pepić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Maja Šegvić Klarić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: veljača 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Technology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

LIPOSOMES IN VACCINE FORMULATIONS

Karla Domitrović

SUMMARY

Vaccination is considered to be one of the most effective methods of protection against many infectious diseases. Liposomes have been investigated as adjuvants and vaccine delivery systems against viral, bacterial and parasitic infections as well as and non-infectious diseases such as tumor immunotherapy. Primary benefits attributed to liposomes include: protection of antigens, delivery of one or more hydrophilic or hydrophobic antigens embedded in liposomes or attached to a liposomal surface, controlled antigens release, increased intracellular delivery and antigen-specific immune response. Therefore, liposomes-based vaccines require smaller doses needed to generate a protective immune response, and also provide an alternative route of immunization (through the skin and mucosa). Extensive research in this area resulted in registered liposomal vaccines, while many are in different phases of clinical trials.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 69 pages, 3 figures, 4 tables and 149 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Liposomes, vaccine, prophylactic, therapeutic, immune response

Mentor: **Željka Vanić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željka Vanić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivan Pepić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Maja Šegvić Klarić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: February 2022.