



UPPSALA
UNIVERSITET

DNA-vaccin

Linnéa Pettersson

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2009
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

DNA-vaccin

Linnéa Pettersson

Självständigt arbete i biologi 2009

Sammandrag

Framtagningen och den omfattande spridningen av vaccin mot sjukdomar har varit en stor framgång för den medicinska vetenskapen. En av anledningarna till vaccinets framgång är att man lyckats frammana ett livslångt försvar mot patogener med antikroppar men man har även upptäckt att det inte går att vaccinera mot många av patogenerna. Detta beror oftast på organismens livscykel som påverka delar i vårt eget immunförsvar samt deras förmåga att mutera och ändra sig. En av patogenerna vars livscykel påverkar vårt immunförsvar är HIV och forskarna har länge strävat efter att hitta ett vaccin eller botemedel mot viruset. De tror att de är nära att lösa uppgiften och det ska ske med hjälp av DNA-vaccin. Metoden går ut på att man för in en plasmid med sekvenser som kodar för specifika antigener från patogenen i värden. Utifrån detta kan immunförsvaret börja arbeta och frammana den respons som behövs för den specifika patogenen. DNA-vaccinet härmar nämligen den första typen av vaccin då en hel patogen fördes in, den kan alltså inducera både humoralt och cellulärt försvar men risken för att bli sjuk av patogenen finns inte.

Forskningen pågår och området är under ständig utveckling, men det har uppstått många problem på vägen. Svårigheterna inkluderar designen på plasmiden, induceringssätt samt mängden DNA som ska föras in. Den här rapporten sammanfattar nuvarande kunskaper inom området och vad som måste göras för att de kliniska prövningarna ska lyckas samt beskrivningar av sjukdomar som det i framtiden kanske kan vaccineras mot.

Inledning

Vaccinet kan vara en av de mest betydande upptäckterna för människan och dess fortlevnad. Många sjukdomar har försvunnit med hjälp av vaccin men det finns många kvar som försämrar människans levnadskvalitet (Robinson och Tamera, 2000). Nu på senare tid har problem med multiresistenta bakterier uppkommit, en av dem är tuberkulos som tidigare hölls i schack men som är på väg tillbaka. Det har alltså länge funnits en strävan till att utveckla ett smidigare och bättre sätt att vaccinera på (Dover *et al.*, 2008).

DNA-vaccinet upptäcktes av en slump precis som så mycket annat i forskarvärlden. Under ett genterapiförsök med ett mänskligt tillväxthormon på en plasmid fick Tang *et al.* (1992) immunförsvaret hos en mus att reagera på den främmande genprodukten. Forskarna undrade om denna upptäckt kunde appliceras på sjukdomar och i en review som publicerades 1995 gick de ut med att detta var framtidens vaccin (Waine och McManus, 1995). Där föreslogs det att DNA-vaccin främst skulle användas hos de patienter som har någon form av immunförsvarsbrist. Med hjälp av DNA-vaccinet skulle de kunna lösa problemet med HIV och de sjukdomar man ännu inte kunde vaccinera mot samt medfödda immunförsvarssjukdomar. Det behövs nämligen ett fungerande immunförvar för att de tidigare vaccinen ska fungera.

Första generationens vaccin verkade så att man förde in en levande, försvagad eller död form av en hel organism. Metoden kunde dock vara lite riskabel då patogenen kan revetera till sin farliga form och göra patienten sjuk. Den levande formen användes för till exempel polio och

då blev alla T-lymfocyter igångsatta (Alarcon *et al.*, 1999). Dessa inkluderar T-hjälparceller som identifierar antigenet (kroppsfrämmande ämne), Cytotoxiska T-celler (CTL) som dödar den infekterade cellen genom toxiska ämnen eller genom att frammana apoptos samt T-minnesceller som kommer ihåg antigenen och kan sätta igång immunförsvaret snabbare och mer effektivt (Kindt *et al.*, 2007). När man använder en död patogen kan däremot inte specifika CTL bildas så vissa infektioner påverkas inte av den. Andra generationens vaccin använder rekombinanta protein som har tagits fram utifrån patogenens gener. Proteinerna kan däremot inte heller frammana specifika CTL. Den tredje generationens vaccin är DNA-vaccinet, det går ut på att föra in en plasmid i djuret. Plasmiden innehåller gener som kodar för antigener samt de andra nödvändiga delarna för att plasmiden ska transkriberas och translateras i djuret (Alarcon *et al.*, 1999).

Produktion och applikation sker i fyra steg där första steget är att få in en plasmid med en gen i en bakterie. Bakterien är oftast *Escherichia coli* då den är lätt att kontrollera i ett laboratorium. Det finns många tekniker som kan användas för att få in plasmiden, en av metoderna är värmeshock men även elektroporering används. Bakterien odlas upp med selektion så bara bakterierna med plasmiden överlever. Steg två går ut på att cellerna lyseras och plasmiden renas. Även här finns många metoder för att skilja plasmiden från bakteriens DNA. Efter det levereras plasmiden in i den eukaryota cellen med en av många olika metoder och i steg fyra så uttrycks genen i värden (Williams *et al.*, 2009).

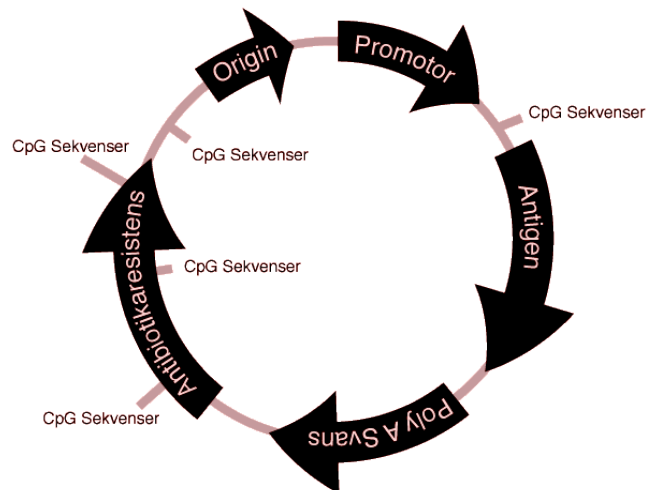
Den här rapporten beskriver de olika procedurerna i detalj samt urskiljer vilka för- och nackdelar det finns med DNA-vaccin. Vad är det som gör att detta vaccin är bättre än tidigare vaccin? Vad finns det för risker och hur undviker vi dem?

Vektorns design

För att ett vaccin ska vara effektivt måste man kunna styra immunförsvaret till den rätta responsen som patogenen kräver. Det är T-hjälparcellerna som gör detta, antingen T-hjälparcell respons 1 (TH1) som är en cellulär respons där olika interferoner bildas och den infekterade cellen dödas eller T-hjälparcell respons 2 (TH2) som är en humoral respons då antikroppar bildas (Kindt *et al.*, 2007). Detta kontrolleras med plasmiden och dess innehåll. Det är även viktigt att designen är optimal för uttryck men också för produktion. Det är produktionen av plasmiden som gör att den kan bli billigare än andra vaccin. Säkerheten är också en essentiell aspekt (Williams *et al.*, 2009).

Konstruktion och tillverkning

DNA-vaccin består av en eller flera gener som kodar för antigener och är klonade till en bakteriell plasmid som är tillverkad för att få ett optimalt uttryck i eukaryota celler (Figur 1). Några av de nödvändigheter som finns på plasmiden är en startpunkt för replikation i bakterier, en antibiotikaresistens gen, en stark promotor samt en polyadenylsekvens som ger poly(A) svansen efter transkription. Startpunkten för replikation finns för att plasmiden ska replikera sig då bakterien gör det. De flesta använder sig av ColEI i *E. coli* då denna är lättkopierad. Den starka promotorn finns för att genuttrycket i däggdjur ska bli så stort som möjligt. För att kunna selektera för de bakterier som har fått in plasmiden använder man sig av en rapportgen som oftast består av en antibiotikakassett. Om vaccinet ska användas för möss används oftast ampicillin. Polyadnylylsekvensen används för att mRNA:s avläsning ska stabiliseras vid terminering (Gurunathan *et al.*, 2000).



Figur 1. Översiktsbild för ett DNA-vaccin. En promotor, antigen med termineringssekvens samt en eventuell antibiotikaresistens för selektion i bakterien.

Promotor och mRNA samt terminering

Vanligen används en promotor från de tidigt uttryckta generna hos cytomegalovirus som är ett herpesvirus. Denna promotor har högre uttryck än andra vanliga promotorer så som Simian virus 40 (SV40) eller cellulära promotorer som människans ubiquitin C (UbC)(Williams *et al.*, 2009). För att uttrycket ska öka ytterligare kan en region från ett mänskligt leukemivirus (HTLV-1 R-U5) inkorporeras efter promotorn. Detta visades då Barouch *et al.* (2005) använde denna region i samband med ett HIV-vaccin och den cellulära immunförsvarsresponsen ökade.

Efter promotorn och HTLV regionen brukar ett intron placeras då uttrycket oftast blir högre om ett intron finns (Williams *et al.*, 2009). Denna inkluderas i mRNAs ledarsekvens där den separerar exon 1 och exon 2. Vanligen används Kozak konsensus sekvens, som har en viktig roll vid initiering av translation (Kozak, 1997), i början av exon 2 då sekvensen har ett startkodon och känns igen av ribosomen. Exonen är optimerad för att den sekundära strukturen hos DNA:t ska vara rätt och påverka startkodonet ATG hos antigenen (Williams *et al.*, 2009)

Termineringssignalerna och polyadenylylsekvensen kommer oftast från bovin tillväxthormon, SV40 eller kaninens β -globingener (Böhm *et al.*, 1997) DNA som finns mellan stoppkodonet och terminatorn är begränsat så inga kryptiska peptider ska uttryckas (Williams *et al.*, 2009).

Alternativa selektionsmarkeringar

Antibiotikaresistens är den vanligaste selektionsmetoden, men för att slippa ha en antibiotikaresistens på plasmiden som sedan ska föras in i en värd har nya selektionsmetoder utforskats. Genom att ta bort genen för antibiotikaresisten och fokusera på andra metoder så sparar man plats då plasmiden blir mindre. Detta är fördelaktigt då små plasmider är mer potenta än stora (Bloquel *et al.*, 2004). Ett sätt att undvika en antibiotikaresistensgen på plasmiden är att ha den i genomet hos bakterien. På plasmiden finns istället en *lac*- eller *tet*

operator. Antibiotikaresistens i genomet kan konstrueras så att den är reglerad av operatören på plasmiden (Williams *et al.*, 2009). Ett alternativt system har utvecklats och har *dapD* genen som kontrolleras av *lac* operatören/ promotor. *Dap*-genen är associerad med celldöd och i detta fall måste det finnas tre *lac* operon för att *dapD* genen ska uttryckas, om den inte uttrycks så dör cellen (Cranenburgh *et al.*, 2001). Att ha tre *lac* operon fördelaktigt då de inte tar så stor plats. En nackdel med systemet är att operonet/promotorn har visats störa DNA-replikationen (McGlynn och Guy, 2008).

Immunförsvarsrespons av CpG

Tidigare forskning har visat att plasmiden i sig ger en viss respons från immunförsvaret, det har förklarats med att plasmiden är gjord av bakteriellt DNA som innehåller stora mängder CpG (cytosin följt av guanin)(Jakob *et al.*, 2008). Man tillsätter oligodeoxynukleotider (oligo DNA), bestående av flera GC-palindrom, för att NK-celler (natural killer cells, känner igen och dödar celler genom att initiera celldöd) ska utsöndra interferon γ (ett protein som stimulerar förstärkning av immunförsvaret)(Iho *et al.*, 1999). En förklaring till att immunförsvaret känner igen det bakteriella DNA:t kan vara att sekvenserna är olika metylerade och att denna skillnad kan vara ett resultat av en evolutionär länk mellan immunförsvaret och igenkänning av bakteriellt DNA (Krieg *et al.*, 1995).

Ytterligare stimulans

För att få en starkare stimulans av immunförsvaret kan man tillsätta olika rekombinanta protein eller poxvirus till plasmiden. Det har visats att när man tillsätter proteinerna så ökar koncentrationen och uthålligheten av antikropparna när man har använt en svag immunogen (Letvin *et al.*, 1997). För att få ännu mer respons kan proteinerna induceras på sidan om i samband med inducering av plasmid. Detta visades då Sedegah *et al.* (1998) skulle vaccinera mot malaria och använde extra protein. Han såg att de som fått både protein och plasmiden hade en högre motståndskraft mot malaria än de med bara plasmiden.

Sekvenser som inte bör användas

Palindrom är ostabila precis som direkta eller inverterade repetitioner. I direkta repetitioner är mutationer mycket vanligare, särskilt om bakterien är i stationär fas (Ribeiro *et al.*, 2008). Ovanliga DNA strukturer bildas när många pyrimidin/purin sekvenser används (som CpG), det kan då bildas Z-DNA som är vänstervriden(Bichara *et al.*, 1995). Om plasmiden är för G-rik kan både tetraplex- och triplex DNA bildas. Plasmider där Z-DNA bildas är ostabila och de som bildar trippelsträngat DNA reducerar plasmidens superspiralisering (Cooke *et al.*, 2004), vilket gör det mycket svårare att designa plasmiden.

Leveransmetoder

Det finns många sätt att föra in plasmiden i värdjuret och de olika metoderna har sina fördelar och nackdelar där den bästa metoden inte har fastställts än. Ett annat problem är var vaccinet ska induceras och beroende på vilken celltyp man för in vaccinet i så får de olika resultat (Aларcon *et al.*, 1999).

Intramuskulär injektion

Den vanligaste metoden för att föra in plasmiden är att använda en flytande lösning och en spruta. Traditionellt används skelettmuskler (Figur 2) då de är stora och lättåtkomliga med en spruta men även hjärtmuskeln och diafragman har visat sig fungera (Acsadi *et al.*, 1991). DNA som injicerats i muskeln fördelas via extracellulära utrymmet och går in i myofibrerna (Wolff *et al.*, 1992). Förklaringen på hur det här har gått till är ännu oklar men Wolff *et al.* (1992)

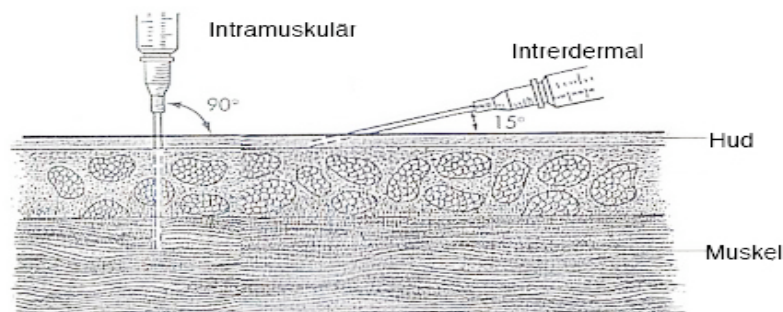
antyder att det har skett via någon form av membrantransport. Det är mycket som måste tas i beaktning när man injicerar DNA, några av dem är nåltyp, ålder och kön på patienten samt vilken vinkel nålen förs in (Wolff *et al.* 1991, Wells och Goldspink 1992).

Gene-gun

Metoden går ut på att man kapslar in plasmiden i en guld- eller volframpartikel, partikeln skjuts sedan in i målcellen med komprimerat helium. Detta sätt används oftast för hudceller men det var visats att den även fungerar på andra typer av celler så som leverceller (Williams *et al.*, 1991) och hjärnceller (Jiao *et al.*, 1993). Genom att använda denna metod går det åt mindre DNA då DNA:t kommer in i cytosolen direkt och cellen inte behöver ta upp det från de extracellulära utrymmen som vid intramuskulär och intradermal injektion (Williams *et al.*, 1991). Det går nämligen åt hundra till tusen gånger mer DNA vid injektion med vätska (Fynan *et al.*, 1993). När gene-gun används är främst TH2 som blir aktiv i jämförelse med intramuskulär injektion som triggade TH1 (Feltquate *et al.*, 1997). Responsen kan antingen bero på skillnaden i leveranssätt men det kan även ha att göra med de olika celler som utsätts. En annan orsak till att immunförsvaret triggas kan vara den skada som sker i muskeln vid injicering. Detta visades genom öka skadan i muskeln med elektroporering och immunförsvaret blev mer effektivt, fler antikroppar och CTL hittades (Tollefsen *et al.*, 2002)

Interdermal injektion

Det här tillvägagångssättet går ut på att man injicerar en vätska mellan hudlagren (Figur 2) där hudens immunförsvaret finns och är en naturlig barriär för infektion (Meyer *et al.*, 2007). Det interdermala utrymmet innehåller många antigen-presenterande celler (APC) som introducerar ett antigen till en annan cell som leder till aktivering i den andra cellen. Antigenen presenteras till lymfocyterna i det lymfocytiska systemet (Bos, 1997) som har en viktig roll i immunförsvaret (Kindt *et al.*, 2007).



Figur 2. Skillnaden mellan interdermal och intramuskulär injektion.

DNA inkapslat i en liposom

En liposom är en vesikel vars väggar består av fosfolipider. Liposomer används kommersiellt för att föra in olika läkemedel då olika hydrofoba eller hydrofila interaktioner inte behövs tas i åtanke. Genom att använda denna teknik behövs ingen injektion utan liposomen kan tas upp av membranerna (Kindt *et al.*, 1999). Okada *et al.* (1997) visade att deras möss tog upp plasmiden endast genom att andas in liposomen. Det har även visats att en liposom med DNA som inducerats intramuskulärt ger 100 gånger högre koncentration av immunoglobulin underklass 1 än om endast DNA användes (Gregoriadis *et al.*, 1997), samt att antikroppskoncentrationen ökade (Lay *et al.*, 2009).

Immunförsvarets respons – en bakgrund

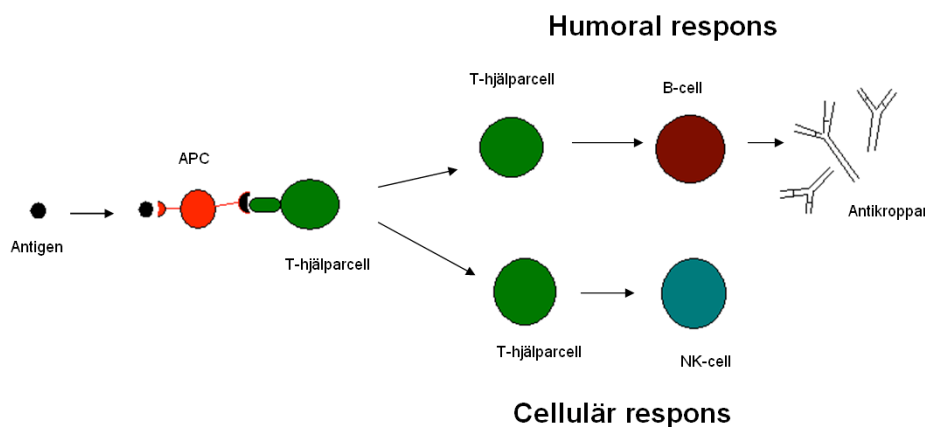
En av de stora fördelarna med DNA-vaccin är att kunna inducera ett stort spektra av immunförsvarets responser. Några av egenskaperna vaccinet har är att skapa antikroppar och att öka de vita blodkropparna samt att försena överkänsliga reaktioner (Williams *et al.*, 2009).

T-hjälparcell

Det första som händer när en antigen kommer in i cellen är att den träffar APC som är en celltyp som presenterar antigener till andra celler. Denna bildar ett komplex med antigenen och känns senare igen av T-hjälparcellen (Figur 3) (Kindt *et al.*, 2007)

T-hjälparceller spelar en central roll i immunförsvaret och ingår i en grupp vita blodkroppar som kallas lymfocyter. En T-hjälparcell har ingen cytotoxisk eller fagocytisk aktivitet och kan inte heller döda infekterade celler eller patogener. T-hjälparcellerna är däremot viktiga för aktivering och riktning av immunförsvarets respons. En T-hjälparcells betydelse kan demonstreras med hjälp av HIV viruset som oskadliggör dessa, när cellerna saknas kan inte immunförsvaret bekämpa andra infektioner och AIDS utvecklas (Kindt *et al.*, 2007).

Det är viktigt att T-hjälparcellerna riktar immunförsvaret rätt och detta visades med en infektion från *Leishmania sp.* som ger en blodsjukdom hos möss. De möss som utvecklade en TH2 (humoral) respons dog medan de som hade en TH1 (cellmedierad) respons blev immuna (Heinzel, 1995).



Figur 3. APC binder till antigenen och presenterar den för T-hjälparcellen som senare inducerar en humoral- eller cellulär respons.

Humoral respons

Det är detta system som använder sig av antikroppar som binder till ett specifikt antigen som finns på utsidan av viruset eller bakterien. Genom att binda till antigenen så skickas signaler att bakterien eller viruset ska förstöras (Kindt *et al.*, 2007).

Det visades tidigt att DNA-vaccination ger en humoral respons som är specifikt för många typer av protein. De första som påvisade en humoral respons mot ett mänskligt tillväxthormon hos möss var Tang *et al.* (1992). Detta har bekräftats av många men då med olika sjukdomar så som influensa FD (Justewicz och Webster, 1996), en viss typ av herpes (Cox *et al.*, 1993) samt Hepatit Bs antigen (Davis *et al.*, 1993).

DNA-vaccinet håller längre och dosen behöver inte fyllas på som de tidigare vaccinen. Det demonstrerades med hjälp av ett influensavirus hos möss, vaccinet inducerades med hjälp av

gene-gun och man såg att antikropparna fanns i benmärgen efter ett år (Justewicz och Webster, 1996). När antikropparna finns i benmärgen ger det ett försvar som är långlivat då nya blodceller bildas i benmärgen. Försök på primater har däremot visat att försvaret inte är lika långlivat som hos möss (Donnelly *et al.*, 1995 och Lu *et al.*, 1996).

Cellulär immunitet

Cellulär respons använder inte antikroppar utan NK-celler, CTL och olika cytokiner som känner igen antigenen. NK-celler förstör intracellulära patogener och stimulerar cytokiner som signalerar till andra celler som är medlemmar i det adaptiva immunförsvaret. CTL inducerar apoptos i de celler som är smittade. Det är viktigt för många sjukdomar att specifika CTL bildas, framförallt vid vaccination mot HIV (Donnelly *et al.*, 1997).

Användning av DNA-vaccin mot olika sjukdomar

Just nu finns inga DNA-vaccin på marknaden för människor men det finns fyra stycken som används för veterinära applikationer. Dessa inkluderar två infektionssjukdomar som West Nile viruset hos hästar samt hematopoes-nekrosvirus i lax och malignt melanom för hundar (Moss, 2009)

Virala sjukdomar

Sjukdomarna orsakas av virus och de är svårt att ge ett långvarigt skydd då viruset muterar snabbt. Många virus stimulerar celler att dela sig och kan orsaka cancer, ett exempel på detta är livmoderhalscancer.

Influenza

Detta är ett RNA-virus som tillhör familjen Orthomyxoviridae. Genom att vaccinera med DNA mot influensa har man sett att både antikroppar och NK-celler bildats (Yankauckas *et al.*, 1993; Rhodes *et al.*, 1994; Pertmer *et al.*, 1996) till skillnad från tidigare metoder då endast antikroppar bildades. Vanligen vaccinerar man mot ytproteiner på viruset, det är de som fäster till membranet innan virusets DNA sprutas in i cellen. Ytproteinerna muteras däremot snabbt och ger olika stammar av influensan, vilket ledet till att man måste vaccinera om sig varje år. Ett sätt att undvika detta är att använda protein från tre olika influensakomponenter. Detta visade sig vara effektivt vid en demonstration på primater då forskarna använde sju olika plasmider (Donnelly *et al.*, 1995). Senare försök gick ut på att vaccinera mot ett protein som är mycket konserverat och finns i dess matrix. Genom att tillverka ett vaccin som innehöll delar av 1989 och 1991 års vaccin kunde de visa att försöksdjuret var immun mot ett influensavirus från 1994 (Donnelly *et al.*, 1997). Det skulle vara en fördel då man slapp vaccinera varje år och är därför ekonomiskt fördelaktigt.

Hepatit

Hepatit är ett samlingsnamn på de sjukdomar som orsakar en leverinflammation. Det finns många orsaker till hepatit men de vanligaste är de virusorsakade. Dessa virus, som inte är släkt med varandra, är Hepatit A, Hepatit B, Hepatit C osv. (World Health Organization, 2009a).

Hepatit B är ett vanligt virus som sprider sig världen över. I nuläget finns fungerande vaccin mot detta men det är dyrt och därför inte tillgängligt för alla. Det finns heller ingen bra behandling mot sjukdomen (World Health Organization, 2009b). Genom att vaccinera mot hepatit B med DNA har de funnit en bättre immunitet i jämfört med tidigare vaccin. Med DNA-vaccin har både humoral- och cellulär respons erhållits (Chow *et al.*, 1997). Det visades

även att modellorganismer fick ett långlivat försvar efter endast en injektion (Mancini *et al.*, 1996 och Davis *et al.*, 1997) och detta kan vara bra då vanliga vacciner behöver fyllas på efter något år för att få fullt försvar.

Forskarna har inte hittat ett vaccin mot Hepatit C då det inte finns några djur som man kan utföra experimenten på. I vanliga fall används primater som modell för mänsklig påverkan men primater smittas inte och utvecklar ingen sjukdom när de utsätts för Hepatit C (World Health Organization, 2009c). För att kliniska prövningar ska fungera måste en ny modellorganism hittas.

Herpes

Även herpes är en sjukdom som spridit sig globalt och det finns stort intresse att hitta vacciner mot herpes. Det har däremot inte hittats än och det beror delvis på virusets livscykel och förmåga att bli latent för att sedan bli aktiverad igen (Alarcon *et al.*, 1999). Men även här har det lyckats att immunisera möss med DNA-vaccin (Manickan *et al.*, 1995). Kliniska prövningar har gjorts på människor och då lyckades man få en immunitet mot herpesvirus 2 som är den version som förknippas med vaginala sjukdomar (Cattamanchi *et al.*, 2008).

HIV

HIV står för "human immunodeficiency virus" och angriper det mänskliga immunförsvaret. Det finns två virusstammar som är kända idag och det är HIV-1 och HIV-2, den första är mer virulent och sprids lättare medan den andra är mer centrerad till Västafrika. Det är HIV-1 som är orsaken till de flesta infektioner. Genom många års forskning på HIV har det framkommit att det är svårt att hitta antikroppar som neutraliserar smittan. Det har visats att viruset har många effektiva mekanismer som skyddar det men få svagheter (Wyatt och Sodroski, 1998). Viruset verkar ha utvecklat flera mekanismer som gör att antikropparna inte kan binda (Johnson och Desrosiers, 2002).

När forskarna lyckades sekvensera viruset så trodde många att det skulle bli lätt att tillverka det skyddande proteinskalet gp120 och tillverka ett vaccin. Vaccin som bygger på detta protein har tillverkats och de har tagit det till prövning på människor men de visades vara ineffektivt vid den tredje prövningen av de fyra prövningar som måste göras för att vaccinet ska godkännas (Desrosiers *et al.*, 2004). Problemet ligger i att få till strukturen på proteinet. Proteinet ändrar nämligen format när det fäster till cellväggens membran (McMichael, 2005)

Ingen immuniseringsstrategi har hittats *in vivo* men forskning på schimpanser har visat sig lovande då de som fått vaccination var skyddade från infektion (Boyer *et al.*, 1997a). Boyer *et al.* (1997a) menar även att det finns belägg för att ett vaccin måste kunna inducera både ett humoralt och ett cellulärt försvar för att kontrollera infektionen. I en annan artikel visade Boyer *et al.* (1997b) att det gick att kontrollera virusets replikation i de djur som blivit infekterade med hjälp av en plasmid. Detta resultat är dock inte så pålitligt då det endast var en schimpans i provgruppen och en i kontrollgruppen men det visar vägen för andra forskare.

Det naturliga immunförsvaret är oförmöget att förhindra att HIV utvecklas till AIDS men det har hittats patienter vars HIV inte har vidareutvecklats. Dessa patienter delar en liknande typ av immunförsvarsfenotyp där både det cellulära och det humoral försvar är starkt (Haynes *et al.*, 1996). Höga halter av CTL är också associerade med långsiktigt överlevande (Pantaleo *et al.*, 1995). Detta har bekräftats med hjälp av prostituerade från Gambia som har utsatts för HIV-1 otaliga gånger men de har inte blivit infekterade då de har höga halter av aktivt CTL (Rowland-Jones *et al.*, 1995). Det finns även belägg för att åldern på patienten har betydelse

för hur immunförsvaret reagerar vid vaccination mot HIV (Gudmundsdotter *et al.* 2009)

Bakteriesjukdomar

De flesta bakteriesjukdomar kan behandlas med antibiotika men många sjukhus har problem med multiresistenta bakterier. Detta skulle kunna undvikas om vaccination med DNA blir aktuellt eftersom antibiotika inte används. Forskarna har lyckats ganska bra att vaccinera möss mot olika sjukdomar så som tuberkulos som är orsaken till många dödsfall (Lowrie *et al.*, 1997). Vaccinet har däremot inte testats på människor än.

Tidigare har det används ett levande vaccin mot tuberkulos från *Bacillus Calmette-Guérin* men att använda ett levande vaccin är långt ifrån idealiskt för stora delar av befolkningen. Många av dem som dör av tuberkulos är nämligen de som utvecklat AIDS och de har dåligt immunförsvaret. Vaccination med DNA hos möss har stärkt immunförsvaret och immunitet mot tuberkulos har utvecklats. Dessa resultat pekar mot att DNA-vaccination kan ersätta de tidigare levande vaccinen (Tascon *et al.*, 1996). Det har däremot inte gjorts några prövningar på människor än.

Infektioner från protozoer

Malaria är en av de sjukdomar som orsakas av en protozo. Sjukdomen kan vara dödlig och den orsakas av encelliga parasiter som tillhör plasmodiumsläktet. Den är främst spridd i tropiska och subtropiska regioner som inkluderar Afrika, Amerika och Asien. År 2006 hade drygt 247 miljoner människor malaria och ungefär en miljon dog av det, de flesta av dem som dog var afrikanska barn (World Health Organization, 2009d). Många av medicinerna mot malaria kan tas i förväg men används sällan av de invånare som bor i de drabbade områdena utan av dem som besöker då medicinen har starka bieffekter vid långvarigt användande. Det finns olika sorters medicin men problemet som finns hos bakteriella sjukdomar finns även här. Detta problem är resistens som gör att medicinen inte fungerar längre.

Tidigare vaccination mot malaria har misslyckats och de första försöken med plasmid misslyckades också. Sedegah *et al.* (1994) såg att immunförsvaret reagerade och att det fanns förhöjda halter av antikroppar men när de senare utsatte musen för sporozoiter (cell hos malaria som har till uppgift att infektera nya värdar) hade de dålig immunitet. Detta togs det lärdom av och plasmiden designades om så till slut var 86 % av mössen immuna mot infektion i levern och 54 % var immuna mot den blodinfektion som orsakas av malaria. Vid försök hos människor har det visats att antikroppar och CTL har frammanats av DNA-vaccin samt att försökspersonerna är immuna mot en typ av malaria. Detta försök gjordes i England och det visar inte hur bra vaccinet fungerar i de drabbade områdena med olika stammar av malaria (Webster *et al.*, 2005).

Eventuella risker och de positiva aspekterna

Det finns flera teoretiska problem som gör att några är rädda för att använda DNA-vaccin (tabell 1). Ett av dessa är rädslan för att plasmiden ska integrera sig i genomet då andra gener kan slås ut. Effekten av att ha en plasmid och antigener i cellen under en längre period är inte fastställd än och det finns en risk att autoimmunitet mot antigenen kan förkomma (Robertson, 1994). Dock har man funnit att DNA har integrerats i en mus på 150 000 och detta ger en mutationfrekvens som är 1000 gånger lägre än den spontana mutationsfrekvensen hos vanligt DNA (Nichols *et al.*, 1995). En annan risk är att kroppen utvecklar antikroppar mot DNA och detta kan ha förödande konsekvenser. Förr trodde man att alla organismers DNA var lika men

på senare tid har man kunnat fastställa att de skiljer sig i bland annat metyleringsfrekvens (Jacob *et al.*, 2008). Att en antikropp mot ens egna DNA bildas är då inte så troligt längre eftersom bakteriellt DNA används och att det har visats att endast dess DNA har provocerat immunförsvaret till en respons (Pisetsky, 1996). Försök med primater har gjorts och DNA-vaccin har inte lyckades producera några anti-DNA antikroppar (Liu *et al.*, 1997). De flesta av dessa risker kan avskrivas då många människor har deltagit i kliniska prövningar och inga av dessa risker infriades.

Några av de positiva aspekterna är att DNA-vaccinen härmar effekterna av de levande vaccinen. Patienten utsätts däremot inte för risken att en patogen ska revetera tillbaka till dess farliga form. Vaccinet är billigare att tillverka då bakterien replikerar plasmiden åt oss, det behöver inte heller kylas och därmed blir transporten lättare. När den ultimata designen på plasmiden är framställd så kommer det gå fortare att få ut vaccinet på marknaden då endast antigenen behöver bytas ut. Det tar ungefär 16 veckor från att plasmiden tagits fram med de rätta antigenerna tills att den kan finnas på marknaden. Det är en betydligt kortare tid än nuvarande äggbaserade vaccin som tar ungefär 22 veckor. Denna skillnad kan göra att en pandemi inte bryter ut (Moss, 2009).

Tabell 1. Fördelar och eventuella risker med användning av DNA-vaccin.

Fördelar	Eventuella nackdelar
Ingen risk för infektion ¹ .	Kan påverka gener som kontrollerar cellväxt ²
Kan rikta immunförsvaret till humoral eller cellulär respons ¹ .	Antikroppar kan bildas mot DNA ²
Lätt att lagra och flytta då inget kylskåp behövs ² .	Tolerans mot antigen kan förekomma ³
Långvarig effektivitet av immunogen ¹	Fungerar endast mot protein och inte mot polysackarider ¹
Immunförsvarsresponsen är endast fokuserad på antigenen av intresse ¹	Långsiktig närvaro av plasmid och antigen i cellen ³

¹Robinson och Pertmer, 2000. ²Moss, 2009. ³Alarcon *et al.*, 1999.

Diskussion

Mycket forskning har gjorts och forskarna försöker använda denna metod för många sjukdomar. Det finns däremot mycket som måste fastställas innan DNA-vaccin kan användas på människor. Forskarna använder olika metoder för att få in plasmiden i värden med olika resultat men överlag så fungerar alla men med olika effektivitet. Det som framkommit är, att beroende på vilken respons från immunförsvaret som behövs, så måste olika metoder användas. Därför har forskningen tagit en ny väg och immunförsvarsresponsen studeras i detalj hos vare patogen. Detta måste studeras för att vi ska komma vidare med de olika metoderna och klargöra vilken som är bäst.

Många av vaccinen som tagits fram för humant bruk har snubblat på mållinjen då nya komplikationer kommer fram. De vaccin som fungerar på icke humana primater har misslyckats med att immunisera människor och många menar att detta beror på storleken på dosen som injiceras då människan är större än till exempel schimpanser som ofta används som försöksdjur. Detta kan diskuteras då ett av vaccinen som finns på marknaden är för hästar. Det krävs mycket kunskap om DNA och dess struktur för att den ultimata designen ska

tas fram samt för att kunna selektera för plasmiden utan att använda antibiotika.

Eftersom DNA-vaccin har genomgått många olika kliniska prövningar så har man kunnat undersöka sidoeffekter på vaccinet. Det har däremot inte rapporterats om några bieffekter utan bara om vaccinet lyckats immunisera eller inte. Då vaccinet inte funnits så länge så ha man inte kunnat undersöka hur det påverkar på lång sikt utan man har bara kunnat undersöka vad om händer efter några år. Långsiktiga prövningar har gjorts på djur som har en kortare livstid än människor. Man behöver därför undersöka mer om de långsiktiga bieffekterna.

För att undvika att vaccinet blir gammalt måste man hitta en del av patogenen som är mycket konserverad och inte har ändrats på länge. Eller så måste man använda flera gener som kommer från olika stammar, detta kan medföra ett problem då generna tar plats och som jag tidigare nämnt så är en liten plasmid mer potent än en stor. För att detta ska ske måste alla typer av viruset sekvenseras, inte bara undertyperna utan även de rekombinanta modellerna. Detta kommer att ge en väldigt stor plasmid och det är inte möjligt i praktiken. Gaschen *et al.*, (2002) menar att man ska vaccinera mot de vanligaste stammarna av patogenen ifråga som finns i det område där patienten bor. Detta är både positivt och negativt, det negativa är att man inte kan resa en längre sträcka utan att vara rädd för att bli smittad. Vi lever i en resande tid och det går fort att ta sig från punkt A till punkt B och mellan dessa punkter är det lätt att bli smittad av en patogen man inte är vaccinerad mot då resandet ofta sker i grupp och på tränga utrymmen. Det positiva är att det är att detta är det enda sättet som fungerar i nuläget. Vi kommer alltså tillbaka till början då vi måste hitta en väldigt evolutionärt stabil del i organismen eller viruset.

Även om forskarna tillverkar en plasmid som fungerar mot den aktuella patogenen så måste den kunna tillverkas kommersiellt och kostnaderna får inte bli för höga då syftet med denna metod är att den ska vara tillgänglig för alla, även till dem som lever i fattiga områden. Vi har kommit långt och jag tror att det kommer att finnas DNA-vaccin för människan på marknaden inom några år.

Tack

Jag tackar Carl Claesson för hjälpen med figurer och Lage Cerenius för råd och tips. Jag tackar även Halgord Abdulla och Therese Gustafsson för återkoppling.

Referenser

- Acsadi G, Jiao SS, Jani A, Duke D, Williams P, Chong W, Wolff JA. 1991. Direct gene transfer and expression into rat heart in vivo. *New Biologist* 3: 71-81.
- Alarcon JB, Waiana GW, McManusa DP. 1999. DNA Vaccines: Technology and Application as Anti-parasite and Anti-microbial Agents, *Advances in Parasitology* 42: 343-410
- Barouch DH, Yang ZY, Kong WP, Koriath-Schmitz B, Sumida SM, Truitt DM, Kishko MG, Arthur JC, Miura A, Mascola JR, Letvin NL, Nabel GJ. 2005. A human T-cell leukemia virus type 1 regulatory element enhances the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccines in mice and nonhuman primates. *Journal of virology* 79: 8828-8834.
- Bichara M, Schumcher S, Fuchs RPP. 1995. Genetic instability within monotonous runs of CpG sequences in *Escherichia coli*. *Genetics* 140: 897-907.
- Bloquel C, Fabre E, Bureau MF, Scherman D. 2004. Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and

- applications. *Journal of gene medicine* 6: 11-23.
- Bos JD. 1997. The skin as an organ of immunity. *Clinical and Experimental Immunology* 107: 3-5.
- Boyer JD, Ugen KE, Wang B, Agadjanyan M, Gilbert L, Bagarazzi ML, Chattergoon M, Frost P, Javadian A, Williams WV, Refaeli Y, Ciccarelli RB, McCallus D, Coney L, Weiner DB. 1997a. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nature* 3: 526-532.
- Boyer JD, Ugen KE, Chattergoon M, Wang B, Shah A, Agadjanyan M, Bagarazzi ML, Javadian A, Carrano R, Coney L, Williams WV, Weiner DB. 1997b. DNA Vaccination as Anti—Human Immunodeficiency Virus Immunotherapy in Infected Chimpanzees. *The Journal of Infectious Diseases* 176: 1501-1509
- Böhm W, Kuhröber A, Paier T, Mertens T, Reimann, J, Schirmbeck R. 1996. DNA vector constructs that prime hepatitis B surface antigen-specific cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice after intramuscular injection. *Journal of Immunological Methods* 193: 29-40
- Cattamanchi A, Posavad CM, Wald A, Baine Y, Moses J, Higgins TJ, Ginsberg R, Ciccarelli R, Corey L, Koelle DM. 2008. Phase I Study of a Herpes Simplex Virus Type 2 (HSV-2) DNA Vaccine Administered to Healthy, HSV-2-Seronegative Adults by a Needle-Free Injection System. *Clinical and Vaccine Immunology* 15: 1638-1643.
- Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu YD, Tao MH. 1997. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin 2. *Journal of Virology* 71: 169-178.
- Cranenburgh RM, Hanak JAJ, Williams SG, Sherratt DJ. 2001. Escherichia coli strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic Acids Research* 29: 26
- Coney L, Wang B, Ugen KE, Boyer J, McCallus D, Srikantan V, Agadjanyan M, Pachuk CJ, Herold K, Merva M, Gilbert L, Deng K, Moelling K, Newman M, Williams WV, Weiner DB. 1994. Facilitated DNA inoculation induces anti-HIV-1 immunity in-vivo. *Vaccine* 12: 1545-1550.
- Cooke JR, McKie EA, Ward JM, Keshavarz-Moore E. 2004. Impact of intrinsic DNA structure on processing of plasmids for gene therapy and DNA vaccines. *Journal of biotechnology* 114: 239-254.
- Cox G, Zamb TJ, Babiuk LA. 1993. Bovine herpesvirus-1-immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *Journal of Virology*. 67: 5664-5667
- Davis HL, Michel ML, Whalen RG 1993. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis surface-antigen and high-levels of circulating antibody. *Human Molecular Genetics*: 1847-1851
- Davis HL, Brazolot CL, Mancini M, McCluskie MJ, Hadchouel M, Comanita L, Tiollais P, Whalen RG, Michel ML. 1997. DNA-based immunization against hepatitis B surface antigen (HBsAg) in normal and HBsAg-transgenic mice. *Vaccine* 15: 849-852.
- Desrosiers RC. 2004. Prospects for an AIDS vaccine. *Nature Medicine* 10: 221-223.
- Donnelly JJ, Friedman A, Martinez D, Montgomery DL, Shiver JW, Motzel SL Ulmer JB, Liu MA. 1995. Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine enhanced protection against antigenic drift in influenza-virus. *Nature Medicine* 1: 583-587
- Donnelly JJ, Friedman A, Ulmer JB, Liu MA. 1997. Further protection against antigenic drift of influenza virus in a ferret model by DNA vaccination. *Vaccine* 15: 865-868.
- Dover LG, Bhatt A, Bhowruth V, Willcox BE, Besra GS. 2008. New drugs and vaccines for drug-resistant Mycobacterium tuberculosis infections. *Expert review of vaccines* 7: 481-497.
- Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. 1997. Different T helper cell types

- and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *Journal of Immunology* 158: 2278-2284.
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 90: 11478-11482.
- Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B. 2002. Diversity Considerations in HIV-1 Vaccine Selection. *Science* 296: 2354-2360
- Gregoriadis G, Saffie R, de Souza JB. 1997. Liposome-mediated DNA vaccination. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters* 402: 107-110.
- Gudmundsdotter L, Nilsson C, Brave A, Hejdeman B, Earl P, Moss B, Robb M, Cox J, Michael N, Marovich M, Biberfeld G, Sandström E, Wahren B. 2009. Recombinant Modified Vaccinia Ankara (MVA) effectively boosts DNA-primed HIV-specific immune responses in humans despite pre-existing vaccinia immunity. *Vaccine* 27: 4468-4474.
- Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA VACCINES: Immunology, Application, and Optimization. 2000. *Annual Review of Immunology* 18: 927-974
- Haynes BF, Pantaleo G, Fauci AS. 1996. Toward an understanding of the correlates of the protective immunity to HIV infection. *Science* 271: 324-328.
- Heinzel FP. 1995. Th1 and Th2 cells in the cure and pathogenesis of infectious diseases. *Current Opinion in Infectious Diseases* 8: 151-155.
- Iho S, Yamamoto T, Takahashi T, Yamamoto S. 1999. Oligodeoxynucleotides Containing Palindrome Sequences with Internal 5'-CpG-3' Act Directly on Human NK and Activated T Cells to Induce IFN- γ Production In Vitro. *The Journal of Immunology* 163: 3642-3652
- Jakob T, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. 1998. Activation of Cutaneous Dendritic Cells by CpG-Containing Oligodeoxynucleotides: A Role for Dendritic Cells in the Augmentation of Th1 Responses by Immunostimulatory DNA 1. *The Journal of Immunology* 161: 3042-3049
- Jiao S, Cheng L, Wolff JA, Yang NS. 1993. Particle bombardment mediated gene transfer and expression in rat brain tissues. *Biotechnology* 11: 497-502.
- Johnson WE, Desrosiers RC. 2002. VIRAL PERSISTENCE: HIV's Strategies of Immune System Evasion. *Annual Review of Medicine* 53: 499-518
- Justewicz DM, Webster RG. 1996. Long-Term Maintenance of B Cell Immunity to Influenza Virus Hemagglutinin in Mice Following DNA-Based Immunization. *Virology* 224: 10-17.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. 2007. *Kuby Immunology* 6:e uppl. W.H Freeman and Company, USA.
- Krieg AM, Yi A-K, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-549.
- Kozak M. 1997. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *The EMBO journal* 16: 2482-2492.
- Lay M, Callejo B, Chang S, Hong DK, Lewis DB, Carroll TD, Matzinger S, Fritts L, Miller CJ, Warner JF, Liang LL, Fairman J. 2009. Cationic lipid/DNA complexes (JVRS-100) combined with influenza vaccine (Fluzone (R)) increases antibody response, cellular immunity, and antigenically drifted protection. *Vaccine* 27: 3811-3820.
- Letvin NL, Montefiori DC, Yasutomi Y, Perry HC, Davies M-E, Lekutis C, Alroy M, Freed DC, Lord CI, Handt LK, Liu MA, Shiver JW. 1997. Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination.

- Proceedings of the National Academy of Sciences 94: 9378.
- Liu MA, McClements W, Ulmer JB, Shiver J, Donnelly J. 1997. Immunization of non-human primates with DNA vaccines. *Vaccine* 15: 909-912.
- Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. 1997. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine* 15: 834-838.
- Lu S, Arthos J, Montefiori DC, Yasu-tomi Y, Manson K, Mustafa F, Johnson E, Santoro JC, Wissink J, Mullins JI, Haynes JR, Letvin NL, Wyand M, Robinson HL. 1996. Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *Journal of Virology* 70: 3978-3991.
- Mancini M, Davis H, Tiollais P, Michel ML. 1996. DNA-based immunization against the envelope proteins of the hepatitis B virus. *Journal of Biotechnology* 44: 47-57.
- Manickan E, Rouse RJ, Yu Z, Wire WS, Rouse BT. 1995. Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4+ T lymphocytes. *Journal of Immunology* 155: 259-265.
- McGlynn P, Guy CP. 2008. Replication forks blocked by protein-DNA complexes have limited stability in vitro. *Journal of molecular biology* 381: 249-255.
- McMichael AJ. 2005. HIV vaccines. *Annual Review of Immunology* 24: 227-255.
- Meyer T, Stockfleth E, Christophers E. 1997. Immune response profiles in human skin. *British Journal of Dermatology* 157: 1-7.
- Moss RB. 2009. Prospects for control of emerging infectious diseases with plasmid DNA vaccines. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines* 7: 3
- Mucke S, Polack A, Pawlita M, Zehnpfennig D, Massoudi N, Bohlen H, Doerfler W, Bornkamm G, Diehl V, Wolf J. 1997. Suitability of Epstein-Barr virus-based episomal vectors for expression of cytokine genes in human lymphoma cells. *Gene Therapy* 4: 82-92.
- Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ. 1995. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 772: 30-39.
- Okada E, Sasaki S, Ishii N, Aoki I, Yasuda T, Nishioka K, Fukushima J, Miyazaki J, Wahren B, Okuda K. 1997. Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens. *The Journal of Immunology* 159: 3638-3647
- Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF, Montefiori D, Orenstein JM, Fox C, Schragar LK, Margolick JB, Buchbinder S, Giorgi JV, Fauci AS. 1995. Studies in Subjects with Long-Term Nonprogressive Human Immunodeficiency Virus Infection. *The New England journal of medicine* 332: 209-216.
- Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR. 1996. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *Journal of Virology* 70: 6119-6125.
- Pisetsky DS. 1994. The immunologic properties of DNA. *Journal of Immunology* 156: 421-423.
- Rhodes GH, Abai AM, Margalith M, Kuwahara-Rundell A, Morrow J, Parker SE, Dwarki VJ. 1994. Characterization of humoral immunity after DNA injection. *Developments in Biological Standardization* 82: 229-236.
- Ribeiro SC, Oliveira PH, Prazeres DMF, Monteiro GA. 2008. High Frequency Plasmid Recombination Mediated by 28 bp Direct Repeats. *Molecular biotechnology* 40: 252-260.
- Robertson JS. 1994. Safety considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine* 12: 1526-1528
- Robinson HL, Pertmer TM. 2000. DNA vaccines for viral infections: Basic studies and applications. *Advances in Virus Research* 55: 1-74.

- Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, Dong T, Gotch F, McAdam S, Whitby D, Sabally S, Gallimore A, Corrah T, Takiguchi M, Schultz T, McMichael A, Whittle H. 1995. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nature Medicine* 1: 59-64
- Sedegah M, Hedstrom R, Hobart P, Hoffman SL. 1994. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 9866-9870.
- Sedegah M, Jones TR, Kaur M, Hedstrom R, Hobart P, Tine JA, Hoffman SL. 1998. Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 7648-7653.
- Tang D, DeVit M, Johnston SA. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154
- Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie B. 1996. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nature Medicine* 2: 888-892.
- Tollefsena S, Tjelleb TE, Schneiderc J, Harboea M, Wikerd HG, Hewinsone G, Huygenf K, Mathiesen I. 2002. Improved cellular and humoral immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation. *Vaccine* 20: 3370-3378.
- Waine GJ, McManus DP. 1995. Nucleic acids: vaccines of the future. *Parasitology Today* 11: 113-116.
- Webster DP, Dunachie S, Vuola JM, Berthoud T, Keating S, Laidlaw SM, McConkey SJ, Poulton I, Andrews L, Andersen RF, Bejon P, Butcher G, Sinden R, Skinner MA, Gilbert SC, Hill AVS. 2005. Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 4836-4841.
- Wells DJ, Goldspink G. 1992. Age and sex influence expression of plasmid DNA directly injected into mouse skeletal muscle. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters* 306: 203-205.
- Williams JA, Carnes AE, Hodgson CP. 2009. Plasmid DNA vaccine vector design: Impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnology Advances* 27: 353-370.
- Williams RS, Johnston SA, Riedy M, De Vit MJ, McElligott SG, Sanford JC. 1991. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 2726-2730.
- Wolff JA, Williams P, Acsadi G, Jiao S, Jani A, Chong W. 1991. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques* 11: 474-485.
- Wolff JA, Dowty ME, Jiao S, Repetto G, Berg RK, Ludtke JJ, Williams P, Slautterback DB. 1992. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *Journal of Cell Science* 103: 1249-1259.
- World Health Organization 2009a. Hepatitis. WWW-dokument: <http://www.who.int/topics/hepatitis/en/> Hämtad: 2009-12-02
- World Health Organization 2009b. Hepatitis B. WWW-dokument aug 2008: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> Hämtad: 2009-12-02
- World Health Organization 2009c. Initiative for Vaccine Research, Hepatitis C. WWW-dokument: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index2.html Hämtad: 2009-12-02
- World Health Organization 2009d. Malaria. WWW-dokument feb 2009: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>. Hämtad: 2009-11-16.
- Wyatt R, Sodroski J. 1998. The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and

Immunogens. *Science* 280: 1884-1888.

Yankauckas MA, Morrow JE, Parker SE, Abai A, Rhodes GH, Dwarki VJ, Gromkowski SH. 1993. Longterm anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. *DNA and Cell Biology* 12: 771-776.