

Szczepionki genetyczne

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

W ostatnich latach nastąpił szybki rozwój nowych metod immunizacji, spośród których najbardziej nowoczesną jest niewątpliwie tzw. szczepienie genetyczne. Generalnie, sposób ten polega na bezpośrednim podaniu *in vivo* cząstki kwasu nukleinowego (DNA lub RNA), kodującej antygen szczepionkowy. Antygen ten, syntetyzowany przez komórki gospodarza, jest następnie prezentowany w jego układzie immunologicznym, pobudzając do ekspresji swoistą odpowiedź, typu komórkowego lub humoralnego. Tego typu immunizacja, bezpieczna i skuteczna, wydaje się posiadać ogromną przyszłość. W pracy tej przedstawiono najnowsze informacje dotyczące szczepień z użyciem kwasów nukleinowych, prezentując jednocześnie niezbędne dane o mechanizmach odpowiedzi immunologicznej. Dostępne wyniki badań pochodzą głównie z obszaru medycyny ludzkiej, ale kilka istniejących już prac pozwala mieć nadzieję, iż w niedalekiej przyszłości podobne doświadczenia, z użyciem innych antygenów szczepionkowych będą również prowadzone na większą skalę w weterynarii.

Pierwsze informacje o skutecznym, w sensie uzyskania ekspresji antygenów szczepionkowych po podaniu – jako nośnika informacji genetycznej – oczyszczanego DNA (RNA) pochodzą od Wolffa i wsp. (25). W 1990 r. opublikowali oni pracę, w której dostarczali domięśniowo myszom 100 µg DNA kodującego wytwarzanie enzymu acetylotransferazy chloramfenikolu (CAT). Po 18 godz. od podania kwasu nukleinowego stwierdzono obecność tego enzymu w miejscach iniekcji jak również, chociaż w mniejszych ilościach, w innych mięśniach szkieletowych. Autorzy badali także czas przez jaki wprowadzony do mięśni DNA był w nich obecny i warunkował ekspresję kodowanego białka (enzymu). Stwierdzono, iż wynosił on powyżej 60 dni, tzn. przez taki okres produkt genowy (białko) był wykrywany metodami immunohistochemicznymi. Wykazano również, iż wprowadzony fragment DNA nie łączył się z materiałem genetycznym chromozomu, ale występował w cytoplazmie komórek w postaci kolistych, niereplikujących form. Stwierdzono również, iż poziom enzymu (acetylotransferazy) był najwyższy gdy kodujący je DNA podawano do mięśni szkieletowych a znacznie niższy gdy iniekcje wykonano do innych tkanek.

Te obiecujące wyniki dały podstawę do dalszych badań nad rozwojem szczepionek genetycznych. Już w kilka miesięcy później, Nabel i wsp. (12) donieśli o ekspresji *in situ* rekombinowanej β-galaktozydazy przez komórki mięśniowe ściany tętnicy, do których podano DNA kodujące wytwarzanie tego enzymu. Również i w tym przypadku, po iniekcji do makroorganizmu fragmentów kwasu DNA, następowały normalne procesy wewnątrzkomórkowej transkrypcji i translacji, efektem których była ekspresja genowych białek (enzymów). Celem optymalnej ekspresji mRNA β-galaktozydazy, do wprowadzenia szczepionkowego DNA użyto wektora w postaci genów retrowirusa chłoniaka mysiego Maloney'a oraz obcego promotora uzyskanego z genów kodujących β-aktynę. Badając czas i kinetykę wytwarzania produktu genowego (enzymu) stwierdzono jego obecność po 10 dniach od iniekcji DNA, utrzymującą się jeszcze po 21 tygodniach, z optymalnym poziomem między 2 a 3 miesiącem po podaniu materiału genetycznego. Ekspresję wprowadzonego białka stwierdzono także, gdy zamiast wektora wirusowego zastosowano bezpośrednią iniekcję DNA zawartego w innym, niebiologicznym nośniku – liposomach. W tym przypadku β-galaktozydaza była obecna w miejscu iniekcji po 4 dniach i utrzymywała się przez co najmniej 6 tygodni po transfekcji.

Davis i wsp. (3) porównali skuteczność iniekcji oczyszczonego DNA bezpośrednio do komórek mięśniowych, z podaniem go przy pomocy wektora wirusowego (adeno- lub retrowirus). Stwierdzono, iż ekspresja genów była jednakowa w przypadku użycia samego DNA (w postaci wektora plazmidowego) lub podanego za pośrednictwem nośnika adenowirusowego a znacznie mniej skuteczna gdy materiał genetyczny dostarczano do komórek przy udziale wektora retrowirusowego.

W podobnych badaniach wykonanych przez Williamsa i wsp. (24) wykazano, iż wektor plazmidowy, zawierający geny kodujące wytwarzanie enzymu lucyferazy, kontrolowane przez promotor ludzkiej β-aktyny, może być podawany do innych, niż mięśnie, tkanek (np. skóry) myszy. Materiał genetyczny użyty do badań był opłaszczony na powierzchni cząstek złota koloidalnego, dzięki któremu następowało ułatwione wnikanie DNA do wnętrza komórek. Wytwarzanie enzymu lucyferazy stwierdzono przez 14 dni od iniekcji materiału genetycznego.

Kolejne prace wykonane przez Tanga i wsp. (18) potwierdziły celowość podawania DNA kodującego określony antygen jako skutecznej metody immunizacji. W badaniach tych, myszy immunizowano w skórę ucha mikrocząsteczkami złota opłaszczonymi wektorem plazmidowym, zawierającymi odcinek DNA kodujący ludzki hormon wzrostu (hGH). Wykazano następnie, iż 88% myszy immunizowanych taką szczepionką genetyczną wytwarzało swoje przeciwciała anti-hGH, zwykle w ciągu kilku tygodni po szczepieniu. Poziom przeciwciał był na tyle wysoki, że surowice rozcieńczone 1:5000 wykazywały silną reakcję z oczyszczonym hormonem hGH w teście Western blot. Wykazano również, iż powtórna immunizacja myszy użytym wektorem DNA (boosting) prowadziła do znacznego wzrostu miana swoistych przeciwciał anti-hGH. Stwierdzono także, iż podanie takiego samego materiału genetycznego (kodującego wytwarzanie hGH) do komórek śledziony prowadziło do ekspresji swoistego białka (hormonu), ale bez znaczącej odpowiedzi ze strony układu immunologicznego (brak swoistych przeciwciał).

Na podstawie tych wyników, Ulmer i wsp. (19) rozwinęli dalsze badania, w których do immunizacji użyli wektora plazmidowego, zawierającego geny kodujące fragment białkowy (NP) wirusa grypy typu A (szczep A/PR/8/34), kontrolowane przez heterologiczny promotor (z wirusa cytomegalii). Plazmid taki podano domięśniowo 5-6-tygodniowym myszom linii BALB/c, po 100 µg DNA, w 1-, 2- lub 3-krotnej dawce, w odstępach 3 tygodni. Skuteczność inkorporacji specyficznego DNA szczepionkowego do komórek mięśniowych badano przy pomocy polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR), stwierdzając go u 44 z 48 immunizowanych myszy. Efektem tak przeprowadzonego szczepienia było powstanie obu typów odpowiedzi immunologicznej: humoralnego (przeciwciała) i komórkowego (limfocyty T typu cytotoksycznego, CTL). Swoiste przeciwciała anti-NP (typu IgG) pojawiły się po 2 tygodniach od pierwszego podania wektora plazmidowego, osiągając najwyższy poziom po 5 tygodniach. Stwierdzono jednak, używając testu biernej odporności, iż występująca odporność humoralna nie była wystarczająca do ochrony myszy przed eksperymentalnym zakażeniem wirusem grypy. Z drugiej strony, wytworzona odporność typu komórkowego (limfocyty cytotoksyczne) stanowiła odpowiednio wysoki poziom ochronny przed zakażeniem wirusem grypy, zarówno szczepem homologicznym (A/PR/8/34) jak i heterologicznym (A/HK/68). W przebiegu całego doświadczenia wykazano, iż 90% myszy immunizowanych wektorem plazmidowym, zawierającym geny dla białka NP wirusa grypy, było niewrażliwych na zakażenie, w porównaniu z 0% zwierząt kontrolnych (19).

W dalszych pracach nad użyciem szczepionek genetycznych przeciw grypie wykazano, iż domięśniowe podanie plazmidowego DNA, kodującego wy-

tworzenie hemaglutyniny (HA) wirusa A/PR/8/34, prowadziło do powstania neutralizujących przeciwciał, które chroniły zwierzęta przed eksperymentalnym zakażeniem letalną dawką szczepu homologicznego (4, 11). Podobne wyniki osiągnięto gdy do badań użyto, jako zwierząt doświadczalnych, fretki (23).

Kolejne prace z materiałem genetycznym wirusa grypy wykonali Robinson i wsp. (16). Autorzy przy pomocy wektora plazmidowego kodującego hemaglutyninę wirusa H7, różnymi drogami immunizowali kurczęta: dootrzewnowo, dożylnie i podskórnie, w ilości 100 µg DNA. Po 30 dniach kurczęta szczepiono powtórnie (booster) tym samym materiałem genetycznym. Wykazano, iż 50% ptaków było odpornych na doświadczalne zakażenie 100 dawkami śmiertelnymi (LD100) homologicznego wirusa grypy H7N7. W grupie kontrolnej (kurczęta nieszczepione) próbę challenge przeżyło tylko 2% ptaków.

Dalsze badania nad rozwojem szczepionek genetycznych koncentrowały się nad wyborem i oceną optymalnej drogi podania plazmidowego wektora DNA, celem generacji najbardziej skutecznego poziomu odpowiedzi immunologicznej. Wykazano wcześniej u gryzoni (25), iż mięśnie szkieletowe są 100-1000 razy bardziej efektywne, w porównaniu z innymi tkankami, w przyswajaniu i ekspresji obcego DNA. Fynan i wsp. (6) przeprowadzili szereg doświadczeń, w których materiał genetyczny kodujący hemaglutyninę wirusa grypy podawali różnymi drogami: domięśniowo, podskórnie, dootrzewnowo, śródskórnie i bezpośrednio do układu oddechowego (do tchawicy). Efekt immunizacji oceniano w modelach: mysim (hemaglutynina typu H1) i ptasim (hemaglutynina typu H7). Materiał genetyczny (DNA), kodujący obie hemaglutyniny, dostarczano do tkanek przy pomocy wektora plazmidowego zawierającego promotor z wirusa cytomegalii. Ekspresja tych plazmidów prowadzona była w komórkach bakteryjnych *E. coli* DH5, z których zostały one następnie izolowane i oczyszczone metodą ultrawirowania w gradiencie chlorku cezu. Do badań użyto 6-8-tygodniowych myszy BALB/c, immunizowanych 2 razy (w odstępie 4 tygodni), podanymi wcześniej drogami, w ilości 100 µg DNA zawieszonych w płynie fizjologicznym. Test na 3-tygodniowych kurczętach wykonano w podobny sposób, zwiększając jedynie dawkę kwasu nukleinowego do 200 µg. Próbę challenge, z użyciem 10-100-krotnej dawki LD50 wirusów H1N1 (myszy) lub H7N7 (kurczęta), wykonano po 1-2 tygodniach od drugiej immunizacji. Wykazano, iż użycie każdej z opisanych dróg podania szczepionkowego DNA (oprócz metody immunizacji dootrzewnowej) prowadziło do uzyskania znaczącego odsetka (67-95%) myszy niewrażliwych na eksperymentalne zakażenie wirusem grypy. Najbardziej wyrażone było to w grupie zwierząt szczepionych domięśniowo (95% chronionych przed zakażeniem) i tylko nieco mniej (83%) przy

iniekcji dożylniej. W grupie kontrolnej (szczepionej nieswoistym DNA) tylko 13% myszy przeżyło próbę challenge. W przypadku kurcząt podobnie korzystne efekty ochronne uzyskano przy immunizacji ptaków drogą domięśniową i/lub dożylną.

Badając dodatkowo wpływ różnych metod podawania szczepionkowego DNA, wspomniani autorzy (8) użyli cząstek koloidalnego złota (średnica 0,95 μm), które opłaszczano plazmidowym wektorem DNA z genami dla HA wirusa grypy. Tak sporządzony antygen wprowadzano śródskórnym myszom przy użyciu odpowiedniego instrumentu elektrycznego (Accell[®], Agracetus, USA), stosując tzw. metodę gene-gun. Ten sposób immunizacji okazał się najbardziej efektywny: tylko 0,4 μg DNA było konieczne aby wytworzyć wystarczający poziom odporności, chroniący 95% zwierząt doświadczalnych przed zakażeniem. Badano również poziom swoistych przeciwciał anti-HA u zwierząt wszystkich grup, immunizowanych wspomnianym materiałem genetycznym, tzn. iniekcyjnie (z DNA zawieszonym w płynie fizjologicznym) i metodą gene-gun (z DNA opłaszczonym na cząstkach złota). Wykazano, iż obie metody szczepień prowadziły do minimalnego lub nawet niewykrywalnego wzrostu poziomu przeciwciał w surowicach; poziom ten podnosił się jednak znacząco już po 4 dniach od eksperymentalnego zakażenia (challenge) a obserwowane swoiste immunoglobuliny były typu IgG. Wynik taki świadczy o pierwotnym uczuleniu limfocytów pomocniczych Th oraz limfocytów B przez antygen szczepionkowy (ekspresja HA przez geny wektora plazmidowego), rezultatem czego była szybka wtórna odpowiedź immunologiczna (typu IgG) na homologiczny antygen wirusowy użyty do próby challenge.

Podobne próby z immunizacją genetyczną przy użyciu metody gene-gun wykonali Pertmer i wsp. (13). Autorzy ci, stosując model myszy, wprowadzali wektory plazmidowe z genami kodującymi hormon wzrostowy (hGH) i białko NP wirusa grypy. Wykazano, iż tylko śladowe ilości (16 ng) DNA były konieczne do uzyskania wysokiego poziomu swoistej odpowiedzi immunologicznej (przeciwciała i limfocyty T cytotoksyczne).

Dalsze próby nad użyciem DNA kodującego białko NP wykonali Raz i wsp. (14) podając go śródskórnym w płynie fizjologicznym, bez użycia cząstek złota i aparatu Accell[®]. Wykazano, iż komórki skóry miały zdolność wchłaniania szczepionkowego DNA, rezultatem czego było pobudzenie humoralnej i komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Poziom przeciwciał, zabezpieczający w znacznym stopniu myszy przed challenge, utrzymywał się przez 68-70 tygodni po szczepieniu, bez konieczności stosowania powtórnej immunizacji (booster). Podobnie długi był czas reakcji komórkowej w postaci ekspresji cytotoksycznych limfocytów CTL. Można przypuszczać, iż tak długo utrzymujący się poziom swoistej odpo-

wiedzi immunologicznej był wynikiem ciągłego uwalniania antygeny (ekspresji białka przez obecne geny plazmidowego wektora szczepionkowego) i pobudzenia przez niego układu odpornościowego.

Wykazano następnie, iż oparte na materiale genetycznym DNA szczepionki są zdolne do indukowania odpowiedzi immunologicznej w stosunku do różnych kodowanych antygenów po podaniu innym niż myszy i kurczęta, zwierzętom. Obecność swoistych przeciwciał skierowanych przeciw glikoproteinom bydłowego wirusa herpes 1 stwierdzono u szczepionych cieląt (2). Poziom tych przeciwciał był na tyle wysoki, że zabezpieczał zwierzęta przed eksperymentalnym zakażeniem żywym, homologicznym wirusem. Prowadzone są również próby z użyciem szczepionek genetycznych przeciw gruźlicy (10), malarii (7), wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (4).

Najwięcej jednak prac koncentruje się nad uzyskaniem skutecznej szczepionki zabezpieczającej przed zakażeniem retrowirusami, w tym przede wszystkim wirusem HIV. Wang i wsp. (22) immunizowali domięśniowo myszy (4 dawki w odstępach 2 tygodni) wektorem plazmidowym zawierającym 100 μg DNA kodującego antygen otoczkowy gp160 wirusa HIV-1. Wykazano, iż u wszystkich szczepionych myszy nastąpił rozwój swoistej humoralnej odpowiedzi immunologicznej w postaci przeciwciał neutralizujących w stosunku do gp160, obecnych jeszcze w rozcieńczeniu surowicy do 1:1280. Większość immunoglobulin była typu IgG (86%) wskazując, iż występująca reakcja immunologiczna przebiegała z udziałem limfocytów pomocniczych Th, stymulowanych produktem wprowadzonego materiału genetycznego. Badając odpowiedź immunologiczną typu komórkowego określano zdolność proliferacyjną komórek śledziona pod wpływem specyficznej (gp160) stymulacji antygenowej i wykazano, iż aktywacja limfocytów występowała tylko w obecności homologicznego antygeny. Dane te wskazują, iż możliwe jest uzyskanie odpowiedzi immunologicznej po domięśniowym podaniu myszom materiału genetycznego kodującego glikoproteinę gp160 wirusa HIV. Podobne badania, z użyciem wektora DNA zawierającego geny env wirusa HIV-1 wykonano na małpach (22), które otrzymały 3 iniekcje (w odstępach 2 tygodni) po 100 μg DNA. Po 2 tygodniach od ostatniego szczepienia, uzyskana od zwierząt surowica miała zdolność neutralizacji *in vitro* (w hodowli tkankowej MT-2) wirusa HIV-1.

Jak wspomniano wyżej, często używanym wektorem, wykorzystywanym do wprowadzenia szczepionkowego DNA, są fragmenty materiału genetycznego retrowirusów. Irvin i wsp. (8) użyli u myszy i małp niereplikujący wektor retrowirusowy N2 III-Benv, zawierający geny env i rev wirusa HIV-1. Ekspresja kodowanych białek gp160 i Rev prowadziła do aktywacji typowych dla tego typu białek limfocytów T CD8⁺, a cytotoksyczna odpowiedź

komórkowa utrzymywała się przez szereg miesięcy po immunizacji. Są to bardzo obiecujące wyniki badań nad opracowaniem skutecznej szczepionki przeciw zakażeniom wirusem HIV, zwłaszcza z uwagi na to, iż białko Rev należy do tzw. wczesnych przez co istnieje możliwość eliminacji zakażonych komórek gospodarza, hamując tym samym rozsiew wirusa. Pierwsze próby z użyciem szczepionek genetycznych przeciw zakażeniom HIV są już w trakcie prób klinicznych (9, 20, 21).

Skuteczność i możliwość praktycznego użycia szczepionek genetycznych zależy od szeregu czynników. Podstawowe znaczenie ma konstrukcja wektora plazmidowego zawierającego fragment DNA kodujący ekspresję antygeny szczepionkowego, a zwłaszcza dobór odpowiedniego promotora (20). Istotnym jest również sposób i miejsce podania szczepionki genetycznej a przez to wybór tkanki (narządu) makroorganizmu, w której dochodzi do ekspresji kodowanego antygeny (5). Bardzo duże znaczenie dla uzyskania optymalnej odpowiedzi immunologicznej posiadają także cechy wytwarzanego w komórkach antygeny a zwłaszcza jego zdolność sekrecji i prezentacji komórkom układu odpornościowego (15). Cheng i wsp. (1) badali wpływ różnych promotorów i dróg immunizacji na ekspresję genów szczepionkowych. Cząsteczki złota opłaszczano DNA i dostarczano do tkanek przy użyciu metody gene-gun. Użyto kilku różnych promotorów (m.in. adenowirusa typu 2, wirusów cytomegalii oraz białaczki mysiej) a plazmidowe wektory podawano śródskórnym, domięśniowo, oraz bezpośrednio do wątroby i trzustki. Stwierdzono, iż najbardziej skuteczny, pod względem ekspresji genów szczepionkowych, był promotor wirusa cytomegalii, bez względu na miejsce (tkankę), do którego dostarczono szczepionkę. Inne, użyte w pracy promotory, cechowały się różnego stopnia swoistością tkankową.

Rhodes i wsp. (15) wykazali, iż skuteczność stosowanej immunizacji genetycznej zależy również od tego czy wytwarzany przez komórki makroorganizmu antygen jest w formie sekrecyjnej. Myszy, którym podawano wektory kodujące białko NP wirusa grypy lub gp120 wirusa HIV, wytwarzały antygeny uwalniane z komórek (sekrecyjne), które docierając do obwodowych węzłów chłonnych były prezentowane komórkom układu odpornościowego, prowadząc do powstania swoistych przeciwciał, występujących w mianie powyżej 10 000. W przeciwieństwie do tego, immunizacja myszy z wektorem luc (kodującym ekspresję lucyferazy) prowadziła do wytwarzania antygeny (w ilościach 0,5-5 ng/dzień), ale w formie związanej (nięsekrecyjnej) przez co niemożliwa była odpowiedź immunologiczna (brak wykrywalnego poziomu swoistych przeciwciał).

Z przedstawionych danych wynika, iż immunizacja z użyciem kwasów nukleinowych, a zwłaszcza DNA (szczepienia genetyczne) jest nowym i bardzo

obiecującym sposobem indukowania swoistej odporności. Użycie materiału genetycznego, kodującego interesujące z punktu widzenia skutecznej szczepionki antygeny, eliminuje często trudny i czasochłonny proces oczyszczania antygenów (białek) używanych w „klasycznej immunizacji” czy też konieczność stosowania adiuwantów. Zastosowanie szczepionek genetycznych zmniejsza też lub całkowicie eliminuje ryzyko wystąpienia niekorzystnych odczynów poszczepiennych. Praktyczne zastosowanie immunizacji genetycznych wymaga jednak dalszych prac, zwłaszcza nad oceną stopnia bezpieczeństwa wprowadzenia obcego kwasu nukleinowego do komórek makroorganizmu (17). Z posiadanych obecnie informacji wynika, iż używane wektory plazmidowe, stosowane jako nośniki informacji genetycznej antygenów szczepionkowych, nie mają zdolności replikacji i łączenia się z chromosomem komórek ssaków i tym samym nie prowadzą do powstania mutacji genowych. Należy również brać pod uwagę problem ewentualnego wytwarzania przez organizm gospodarza przeciwciał anti-DNA użytego wektora plazmidowego chociaż wiadomo, iż dwuniciowy DNA stosowany do szczepienia jest zwykle nieimmunogeny i nie powoduje ekspresji swoistych przeciwciał. Celem optymalizacji i standaryzacji używanych metod immunizacji genetycznej konieczne jest także opracowanie skutecznych metod konstrukcji wektorów plazmidowych, doboru odpowiednich promotorów a także sposobów i dróg podania materiału genetycznego.

Piśmiennictwo

1. Cheng L., Ziegelhoffer P. R., Yang N. S.: *J. Virol.* 67, 3409, 1993.
2. Cox G. J. M., Zamb T. J., Babiuk L. A.: *J. Virol.* 67, 5664, 1993.
3. Davis H. L., Demeneix B. A., Quantin B., Coulombe J., Whalen R. G.: *Hum. Gene Ther.* 4, 733, 1993.
4. Davis H. L., Michel M. L., Whalen R. G.: *Hum. Mol. Genet.* 2, 1847, 1993.
5. Davis H. L., Whalen R. G., Demeneix B. A.: *Hum. Gene Ther.* 4, 151, 1993.
6. Fynan E. F., Webster R. G. i wsp.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11478, 1993.
7. Hoffman S. L., Sedegah M., Hedstrom R. C.: *Vaccine* 12, 1529, 1994.
8. Irwin M. J., Laube L. S. i wsp.: *J. Virol.* 68, 5036, 1994.
9. Liu M. A., Vogel F. R.: *AIDS* 8, 195, 1994.
10. Lowrie D. B., Tascon R. E., Colston M. J., Silva C. L.: *Vaccine* 12, 1537, 1994.
11. Montgomery D. L., Shiver J. W. i wsp.: *DNA Cell Biol.* 12, 777, 1993.
12. Nabel E. G., Plantz G., Nabel G. J.: *Science* 249, 1285, 1990.
13. Pertmer T. M., Eisenbraun M. D. i wsp.: *Vaccine* 13, 1427, 1995.
14. Raz E., Carson D. A. i wsp.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9519, 1994.
15. Rhodes G. H., Dwarki V. J. i wsp.: *Vaccines 93*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1993, s. 137-141.
16. Robinson H. L., Hunt L. A., Webster R. G.: *Vaccine* 11, 957, 1993.
17. Smith H.: *Vaccine* 12, 1515, 1994.
18. Tang D. C., De Vit M., Jonston S. A.: *Nature (London)* 356, 152, 1992.
19. Ulmer J. B., Donnelly J. J. i wsp.: *Science* 259, 1745, 1993.
20. Vogel F. R., Sarver N.: *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 406, 1995.
21. Walker M. C., Fast P. E.: *AIDS* 8, 213, 1994.
22. Wang B., Ugen K. E. i wsp.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4156, 1993.
23. Webster R. G., Fynan E. F., Santoro J. C., Robinson H.: *Vaccine* 12, 1495, 1994.
24. Williams R. S., Johnston S. A. i wsp.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2726, 1991.
25. Wolff J. A., Malone R. W. i wsp.: *Science* 247, 1465, 1990.