

Univerzita Karlova,
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



**Nanočásticové nosiče pro vakcíny založené na nukleových
kyselinách: přehled literatury**

**Nanoparticle carriers for nucleic acid-based vaccines: a literature
review**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Student: Hana Fóldešová

V Hradci Králové 2024

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne: 28. 8 .2024

Podpis:

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli v realizaci diplomové práce. Zejména děkuji vedoucími práce PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za jeho ochotu, čas a přínosné rady při vypracování. Dále velké díky patří Mgr. Janě Kotulové, Ph.D. z Lékařské fakulty Ostravské univerzity za odbornou konzultaci a věcné připomínky, manželovi, mé rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.

Obsah

Obsah	4
Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Seznam zkratek	7
Úvod a cíl práce	9
Současný stav poznání	10
1.1 Vakcinace	10
1.1.1 Historie vakcinace.....	10
1.1.2 Rozvoj imunitní odpovědi	11
1.1.3 Faktory ovlivňující účinnost vakcín	13
1.2 Vakcíny založené na NA	15
1.2.1 DNA vakcíny	15
1.2.2 RNA vakcíny	18
1.3 Vektory pro dodávání DNA a RNA vakcín	21
1.3.1 Virové vektory	22
1.3.2 Nevirové vektory	24
1.3.2.1 Lipidické NČ	27
1.3.2.2 Systémy NČ na bázi peptidů	40
1.3.2.3 Polymerní NČ.....	46
1.3.2.4 Anorganické NČ.....	54
Závěr	59
Použitá literatura	60

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Student: Hana Fóldešová

Název diplomové práce: Nanočásticové nosiče pro vakcíny založené na nukleových kyselinách: přehled literatury

Vakcíny založené na nukleových kyselinách jsou přelomem ve vývoji vakcín, a to díky možnosti *in situ* exprese antigenu a rozvoji genového inženýrství. Avšak kvůli nízké stabilitě *in vivo* je většina těchto vakcín založena na nosičích, tzv. vektorech, pro zvýšení stability a zajištění specifické distribuce do antigen prezentujících buněk a rozvoji imunitní odpovědi. Vektory obecně dělíme na virové a neviróvé, přičemž se tato práce zabývá neviróvými vektory založených na nanočásticích.

Cílem této práce je vytvořit aktuální přehled nejčastěji používaných nanočásticových systémů pro dodání vakcín založených na nukleových kyselinách – lipidických nanočástic, systémech na bázi peptidů, polymerních nanočásticových systémech a anorganických nanočástic. Bylo zjištěno, že u těchto systémů se vytváří takzvané hybridní nanočásticové systémy vzájemně kombinující své výhody v podobě například kationických nanoemulzí, lipidických polymerních hybridních nanočástic, lipopolyplexů a kombinací polymerů s protaminem. V závěru této práce byly zmíněny anorganické nanočásticové systémy se systémem NanoVac, který je aktuálně zkoumán společností Luna Labs, se slibnými vyhlídkami do budoucna.

Klíčová slova: vakcíny, antigen, DNA, plazmid, RNA, imunitní systém

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Student: Hana Fóldešová

Title of Thesis: Nanoparticle carriers for nucleic acid-based vaccines: a literature review

Nucleic acid-based vaccines represent a groundbreaking advancement in vaccine development, due to the possibility of *in situ* antigen expression and the progress in genetic engineering. However, due to their low *in vivo* stability, most of these vaccines rely on carriers, known as vectors, to enhance stability and ensure targeted delivery to antigen-presenting cells, thereby stimulating an immune response. We generally classify vectors into viral and non-viral types, with this work focusing on nanoparticle-based non-viral vectors.

The aim of this thesis is to provide an up-to-date overview of the most commonly used nanoparticle systems for delivering nucleic acid-based vaccines – lipid nanoparticles, peptide-based systems, polymeric nanoparticle systems, and inorganic nanoparticles. It was found that these systems often form hybrid nanoparticle systems, combining their advantages, such as cationic nanemulsions, lipid-polymer hybrid nanoparticles, lipopolyplexes, and polymer-protamine combinations. The thesis concludes with a discussion of inorganic nanoparticle systems and the NanoVac system, which is currently being researched by Luna Labs and shows promising prospects for the future.

Keywords: vaccines, antigen, DNA, plasmid, RNA, immune system

Seznam zkratek

AdV — adenovirus

Ag — antigen

APB— antigen prezentující buňky

CNT — uhlíkové (carbon) nanotrubičky

CPPs — Cell Penetrating Peptides = peptidy penetrující buňku

ČVČ — „částice v částici“

DB — dendritické buňky

DNA — deoxyribonukleová kyselina

DOPE — dioleoylphosphatidylethanolamin

DOTAP — 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan

DSPC-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin

EPI — epitop

FDA — Food and Drug Administration

HIV — virus lidské imunodeficiency

IVT — *in vitro* transkribované

KNE — kationická nanoemulze

L-PBAE — poly(β -aminoestery)

MHC — hlavní histokompatibilitní komplex = major histocompatibility complex

mRNA — mediátorová ribonukleová kyselina

NA — nukleová kyselina = nucleic acid

NLČ— nanostrukturovaná lipidické částice

NČ — nanočástice

PAMAM — polyamidoamin

pDNA — plazmidová DNA

PEG — polyethylenglykol

PEI — polyethylenimin

PLA — polymléčná kyselina = polylactid acid

PLČ — pevné lipidické částice

PLGA — poly(lactic-co-glycolic acid)

PVA — poly(vinylamin)

RNA — ribonukleová kyselina

saRNA — samoamplifikující RNA

siRNA — „small interfering“ RNA

VLPs — Virus like particles = částice podobné virům

Úvod a cíl práce

Vakcinace je jeden z nejúspěšnějších přístupů ve zdravotnictví v péči o lidské zdraví. Obecně objev, vývoj a zlepšení vakcín bylo usnadněno aplikacemi nových technologií, a to díky stále zlepšujícímu se výzkumu na celém světě. Přelomem ve vývoje vakcín bylo používání vakcín založených na nukleových kyselinách, které mají možnosti *in situ* exprese antigenu.

Vakcinace pomocí nukleových kyselin je relativně nová technologie, která využívá metody genového inženýrství k vyvolání imunitní odpovědi. První objevy ohledně vakcín založených na nukleových kyselinách byly až před více než dvaceti lety. Nevýhodou těchto vakcinačních látek je však nízká stabilita *in vivo*, a proto je většina těchto vakcín založena na nosičích tzv. vektorech pro zvýšení stability a specifické distribuce antigen prezentující buňky. Vektory obecně dělíme na virové a nevirové, přičemž pro tuto práci jsou nejdůležitější nevirové vektory založené na nanočásticích. Právě výzkum, vývoj a optimalizace nanočásticových vektorů je klíčový k dalšímu využívání těchto vakcín pro humánní použití.

Cílem této práce je zpracovat přehled literatury nejčastěji používaných nanočásticových nosičů vakcín založených na nukleových kyselinách. Dále objasnit používání vakcín založených na nukleových kyselinách a ukázat, že nanočásticové systémy mohou být velkým tématem pro další výzkum.

Současný stav poznání

1.1 Vakcinace

Vakcinace, jak již bylo v úvodu zmíněno, je jedním z největších úspěchů v oblasti veřejného zdraví minulého století a zachrání odhadem 2-3 miliony lidských životů ročně. Aktuálně dostupné vakcíny mohou zabránit více než 30 různým infekčním chorobám, z nichž několik lze kombinovat do jednotlivých vakcín. (1-5) Vakcíny tedy slouží jak k prevenci infekčních onemocnění, tak i k redukci spotřeby antibiotik. (6) V preklinických studiích se setkáváme s použitím vakcín nejen u infekčních onemocnění, ale také v léčbě rakoviny a autoimunitních onemocněních. (7)

V následujících podkapitolách bude popsán základní přehled vývoje vakcinačních látek, rozvoj imunitní odpovědi a faktory ovlivňující účinnost vakcín.

1.1.1 Historie vakcinace

Slovo vakcína pochází z roku 1798, kdy Eduard Jenner izoloval virus kravských neštovic proti pravým neštovicím. Lingvisticky je slovo vakcína odvozeno z latinského slova *vacca*, v překladu kráva. (8)

První generace vakcín byla vyvinuta na přelomu 19. století a patří zde živé atenuované (neboli oslabené) vakcíny vztekliny či neštovic. (5) Dále pak celobuněčné vakcíny proti břišnímu tyfu, choleře a vzteklině byly založeny na jejich usmrcených původcích. (9)

Na konci 20. století se začaly vyvíjet vakcíny **druhé generace**. Podjednotkové vakcíny proti antraxu, založené na proteinech, či proti vzteklině, založené na polysacharidech. Díky rozvoji genového inženýrství na konci 20. století vědci vyvinuli vakcínu proti hepatitidě typu B obsahující rekombinantní virový antigen (Ag) (Virus-like). (2,9)

Největší rozvoj **třetí generace** vakcín založených na nukleových kyselinách (NA) nastal v období pandemie COVID-19. (3, 10) Díky vakcíně Comirnaty od společnosti Pfizer dostala povědomí o vakcínách založených na NA i široká veřejnost, kdy byla na svět přivedena první mediátorová ribonukleová (mRNA) vakcína pro humánní použití. Dále svůj rozvoj zaznamenaly vakcíny založené na deoxyribonukleové

kyselině (DNA) i ostatních ribonukleových kyselinách (RNA). (10) V tabulce 1 je shrnut základní přehled vakcín.

Tabulka 1 generace vakcín vytvořeno podle (11)

	typ vakcín	příklad onemocnění
<u>1.generace</u>	živé atenuované	vzteklina, neštovice
	inaktivované vakcíny	břišní tyfus, cholera
<u>2.generace</u>	podjednotkové vakcíny	anthrax, vzteklina
	rekombinantní vakcíny	hepatitida typ B, Rota virus
<u>3.generace</u>	DNA, RNA vakcíny	COVID-19, Ebola

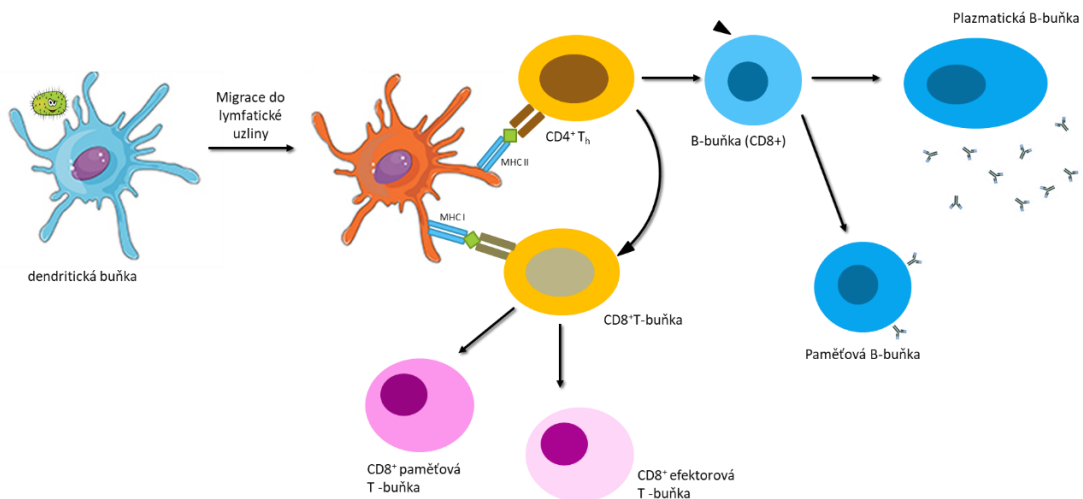
1.1.2 Rozvoj imunitní odpovědi

V rámci imunitní odpovědi je důležité si nejprve objasnit základní pojmy v imunologii. (12) Imunita slouží k obraně těla proti infekcím a obecně infekce patogeny vedou k aktivaci **nespecifické (vrozené) a specifické (získané) imunitní odpovědi**. Nespecifické imunitní odpovědi nevyžadují specifické rozpoznání Ag a zahrnují aktivaci makrofágů, přirozených zabíječských buněk a produkci cytokinů. Specifické imunitní odpovědi jsou závislé na Ag a řadíme sem i očkování. (13, 14) Specifické imunitní odpovědi vyžadují aktivaci lymfocytů k produkci specifických protilátek a Ag-specifických CD4+ a CD8+ T buněk. (12)

V předchozím textu byly zmíněny **Ag**, což je specifický znak daného patogenu, který vyvolává tvorbu protilátek a proti němu se rozvíjí imunitní odpověď organismu. Jako Ag slouží například NA s navázanými proteiny či polysacharidy. (15) Dále **adjuvantní prostředky**, které samy o sobě nevedou k indukci imunitní odpovědi, ale společně s Ag pomáhají indukovat ochranu a dlouhodobou paměť. Mezi adjuvantia patří sloučeniny hliníku, lipopolysacharidy, olejové emulze, lipozomy apod. (14) Protože protilátky nereagují s celou molekulou Ag, existují také Ag determinanty tzv. **epitopy (EPI)**. (16) EPI jsou obvykle deriváty tělu nevlastních proteinů a mohou se vyskytovat jak na povrchu Ag, tak i uvnitř. (17) Díky EPI se Ag naváže na protilátku

a indukuje imunitní odpověď. (16) Právě schopnost indukovat imunitní odpověď se nazývá imunogenicita.

Na obrázku 1 je uveden **rozvoj primární imunitní odpovědi**, kdy specializované antigen prezentující buňky (APB), do nichž patří tzv. dendritické buňky (DB), zachycují Ag a migrují s ním do lymfatické uzliny. Zde přichází do kontaktu s T lymfocyty. T lymfocyty obsahují CD4+ znak rozpoznávající Ag na hlavním histokompatibilitním komplexu (MHC) II. třídy a CD8+ znak rozpoznávající Ag na MHC I. třídy. MHC se nacházející na APB, popř. DB a umožňují rozeznat cizí tkáň od tkáně vlastní. Dochází k rozpoznání Ag systémem MHC a následné vazbě na CD4+, nebo CD8+ u T lymfocytů a indukci protilátkové odpovědi. (18) Vznikají tedy CD8+ paměťové T lymfocyty a CD8+ efektorové T lymfocyty. (3)



Obrázek 1 Rozvoj imunitní odpovědi

Následně je jedním z důležitých mechanismů vyvolat **imunologickou paměť**, kdy vznikají dlouhodobě žijící paměťové lymfocyty. V průběhu interakce imunitního systému s patogenem nesoucí Ag vznikají tzv. klonů B lymfocytů, které se později diferencují do několika typů. (19-21) Část z nich jsou buňky plazmatické zodpovědné za tvorbu protilátek, a další paměťové buňky migrují do kostní dřeně, kde mohou existovat velmi dlouhou dobu. Buňky paměťové žijí desítky let a jsou zodpovědné za reaktivaci specifické **sekundární imunitní odpovědi** při reinfekci. Tyto paměťové lymfocyty při další invazi Ag zajistí velice rychlou reaktivaci protilátkové odpovědi

a likvidaci těchto Ag. (20, 21) Shrnutí rozdílů mezi primární a sekundární imunitní odpovědí je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2 Rozdíly mezi primární a sekundární imunitní odpovědí, vypracováno dle (21,22)

	Primární imunitní odpověď	Sekundární imunitní odpověď
charakteristika	odpověď na první kontakt s Ag	odpověď na druhý a další kontakt s Ag
doba nástupu imunitní odezvy	obvykle 5-10 dní	obvykle 1-3 dny
intenzita imunitní odpovědi	nízká	vysoká
množství protilátek	nízké (obvykle Imunoglobulin M)	vysoké (obvykle Imunoglobulin G)
hladina protilátek	relativně rychle klesá	klesá pomalu

Tímto mechanismem můžeme shrnout hlavní podstatu vakcinace. Můžeme dosáhnout i celoživotní imunity pomocí vhodně voleného imunizačního schématu, kdy právě celoživotní imunita je srovnatelná s imunitou po prodělaném infekčním onemocnění. (20)

U pandemie onemocnění COVID-19 jsme byli svědkem, že dané infekční agens může mít proměnlivou Ag výbavu, tudíž se mohou některé infekce opakovat i po vakcinaci. Problém je, že buňky nerozeznají variantu viru a pacienti znovu onemocní, jako se to dělo a děje v případě onemocnění COVID-19. (20, 23)

1.1.3 Faktory ovlivňující účinnost vakcín

Nejen samotné složení a konstrukce vakcín, ale i další **faktory** mohou ovlivňovat účinnost, bezpečnost a stabilitu vakcín. Mezi nejznámější faktory patří individuální imunitní reaktivita a jednonukleotidové polymorfismy. Významnou roli hrají také epigenetické faktory, mezi něž řadíme faktory výživy či přirozenou mikrobiotu. (24) Věková skladba očkovaných je další významný faktor, kdy je nutné reflektovat progresivní stárnutí populace a zaměřit vývoj konstrukce vakcín na zlepšení odezvy stárnoucího imunitního organismu. (25) Dále pak velmi silnou roli hrají pohlavní hormony, kdy je nejspíše rozdílná citlivost T buněk k estrogenům u žen a mužů. (24, 26) Ženské hormony mají stimulační vliv na aktivní imunizaci, a je také vhodné zvážit podávání vakcíny během těhotenství. (26, 27) Z formulačních faktorů je to zejména

zajištění dostatečné stability NA, tak aby bylo umožněno dosažení APB jako cílové populace buněk.

Právě stabilita, bezpečnost a imunogenicitu jsou hlavní priority v oblasti vývoje třetí generace vakcín a jejich nosičů založených na NA, podrobně rozebraných v této diplomové práci. (11, 28)

1.2 Vakcíny založené na NA

NA vakcíny jsou genové vakcíny, které jsou založené na DNA a RNA kódujících Ag, Ag tedy nepochází z těla původce onemocnění. (28, 29) Výhodou těchto očkovacích látek je rychlý vývoj, výroba a následná syntéza určitého Ag v těle očkovaného. Mezi nevýhody patří především nestabilita vůči vyšší teplotě a omezená imunogenicita vyžadující opakované podání vakcíny. (28, 30)

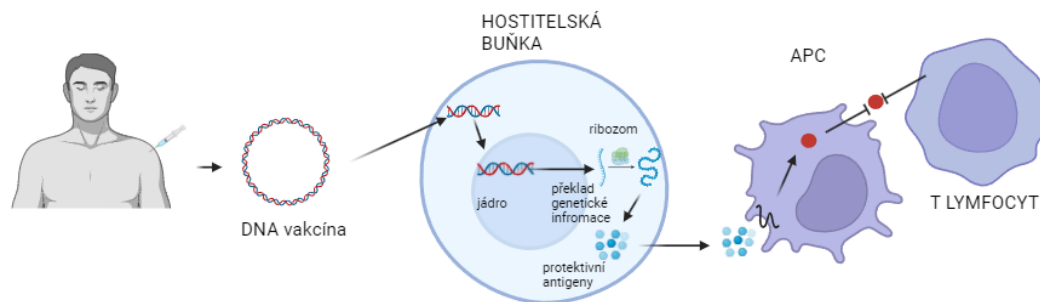
V následující tabulce 3 jsou uvedeny základní rozdíly mezi DNA a RNA vakcínami, které budou u jednotlivých typů rozebírány v dalších kapitolách.

Tabulka 3 rozdíly DNA/RNA vakcín

DNA vakcíny	RNA vakcíny
potřeba transkripce v jádře	není potřeba transkripce v jádře
založené na plazmidu (cirkulární DNA)	založené na mRNA
nízká imunogenicita	vyšší imunogenicita
pouze v klinickém zkoušení	registrovaná mRNA vakcína pro humánní použití

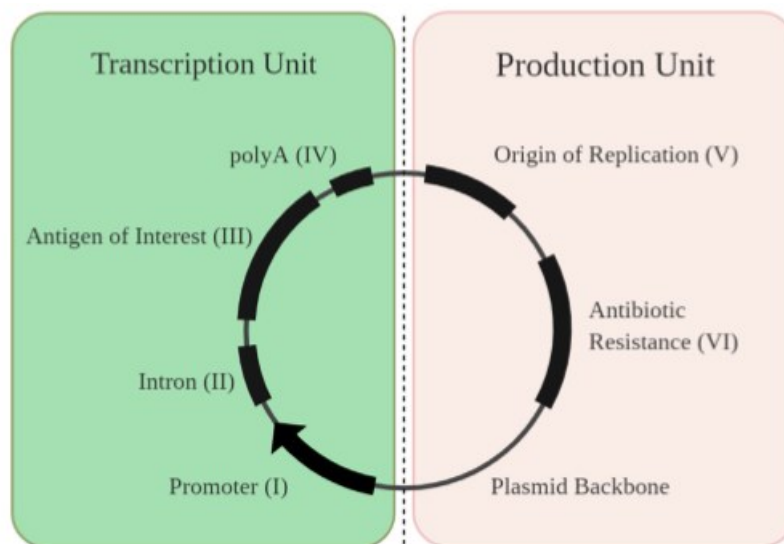
1.2.1 DNA vakcíny

DNA vakcíny řadíme do třetí generace vakcín a byly objeveny v roce 1990 Wolfem a kol. (31) Jak je uvedeno na obrázku 2, tyto vakcíny indukují **imunitní odpověď** tak, že jsou určeny k absorpci DNA vakcíny prostřednictvím endocytózy do hostitelské buňky. Následně dochází k transkripci DNA do mRNA v jádře buňky, a poté k translaci mRNA do struktury protektivních Ag na ribozomu. Ag jsou dále zpracovávány a prezentovány pomocí APB. Dále dochází k rozpoznání Ag pomocným T lymfocytům a indukci specifické imunitní odpovědi, která byla podrobně rozebrána již dříve v kapitole rozvoji imunitní odpovědi. (30-33)



Obrázek 2 mechanismu účinku DNA vakcíny vytvořeno v programu BioRender dle (33)

DNA se ve vakcínách vyskytuje ve **stručce plazmidové DNA (pDNA)**, a to z důvodu lepší imunogenicity a ve srovnání s lineární DNA má pDNA nižší schopnost integrace do hostitelského genomu, což má za následek minimalizaci mutagenese a jiných nežádoucích účinků. (32, 34) pDNA uvedená na obrázku 3 se skládá z transkripční jednotky a výrobní jednotky. Transkripční jednotka se skládá z promotoru (I), intronu (II), Ag (III) a polyadenylované části (IV). Výrobní jednotka se skládá z replikačního počátku (V), ze sekvence genů antibiotické rezistence (VI) a z plazmidové kostry. Plazmidová kostra lze modifikovat sacharózou za účelem zvýšení Ag exprese. (32)



Obrázek 3 schéma pDNA (32)

V následující tabulce 4 můžete porovnat **výhody a nevýhody DNA vakcín**.

Tabulka 4 Výhody a nevýhody DNA vakcín vypracováno dle (1,5,35)

výhody	nevýhody
DNA vakcíny vyvolávají protektivní humorální a buněčnou imunitní odpověď	omezeno na proteinové Ag (nelze použít pro bakteriální Ag)
DNA vakcíny jsou stabilní	vyvolávají tvorbu protilátek proti DNA
mají schopnost enkapsulace (opouzdrění) důležitou pro přenos a protekci genetické informace	DNA vakcíny mohou mít relativně nízkou imunogenicitu oproti RNA vakcínám
jednoduchý vývoj a výroba	mohou vyvolat imunologickou toleranci Ag vyjádřenou uvnitř hostitelské buňky
směs plazmidů by mohla být použita k širokospektrální vakcíně	nutnost použití ochranných polysacharidových Ag
mají málo nežádoucích účinků	riziko integrace do genomu organismu

Kvůli nízké imunogenicitě a riziku integrace DNA do hostitelského genomu nejsou podle dosavadních výzkumů DNA vakcíny úspěšně registrovány pro **použití** u lidí. Avšak Food and Drug Administration (FDA) ve Spojených státech schválila DNA vakcíny pro prevenci a léčbu veterinárních onemocnění. Probíhají pouze preklinické a klinické studie pro několik onemocnění, jejichž základní vývoj zmíním v této kapitole a další příklady budou uvedeny u jednotlivých vektorů. (1, 30, 35, 36)

Dle dosavadních výzkumů by DNA vakcíny mohly být v budoucnu použity v léčbě proti **rakovině** děložního čípku (NCT03185013), prostaty (NCT01341652), prsou (NCT02204098), plic (NCT02179515) a mozku (NCT03491683). Ukazuje se, že ve srovnání s RNA vakcínami exprimují dlouhodoběji nádorově specifické Ag. (35-37) DNA vakcinace je také jeden z nových přístupů vývoje vakcín nové generace proti **malárii**. Zejména kombinovaná DNA vakcína zaměřená na různá stádia původce

onemocnění prvoka *Plasmodium* může být velkým přínosem v léčbě malárie. Avšak stále se jedná o data z preklinického a klinického zkoušení (NCT03341754). (35, 38)

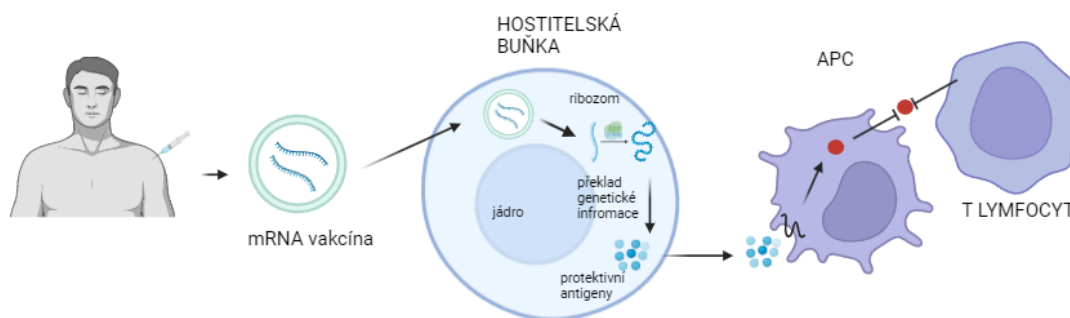
V Česku a celosvětově je velice frekventované onemocnění **chřipka**. Vakcíny proti chřipce musí být také aktualizovány tak, aby byly co nejúčinnější proti nově vznikajícím kmenům, které se budou v dané období na území státu vyskytovat. Příprava a imunologická účinnost DNA vakcíny proti chřipce byla také diskutována, avšak zatím pouze v preklinickém testování na myších modelech a v první fázi klinického zkoušení (NCT00375206). (35, 39) Dále pak celá řada DNA vakcín byla použita v klinických studiích k řešení virových, bakteriálních infekcí a parazitárních onemocnění. (35)

Výzvy u DNA vakcín jsou zejména obtížné dodání genetického materiálu do cílových buněk přesně a bezpečně, či nízká imunogenicita. (1) Vybrané výzvy, jako je problematika dodávání DNA vakcín, jsou blíže popsány v kapitole 1.3.

1.2.2 RNA vakcíny

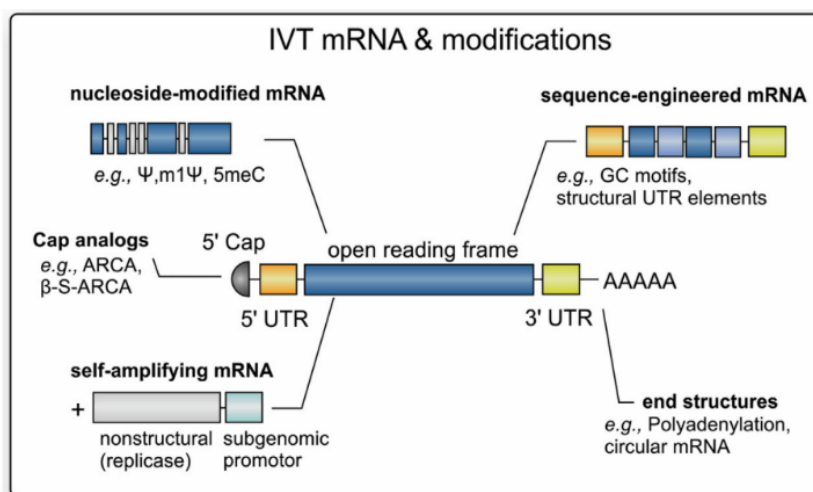
Tyto vakcíny indukují specifickou **imunitní odpověď** prostřednictvím mRNA. První úspěšné dodání mRNA do buňky bylo publikováno v roce 1989 Malonem a jeho kolektivem. Při dodávání by měla mRNA kódující Ag odolávat degradaci RNázami a cílit na APB pomocí vektorů. (40-41)

Na obrázku 4 je uveden zjednodušeně mechanismus účinku mRNA vakcíny. mRNA jsou vychytávány receptorem, zprostředkovanou endocytózou a směřovány přes endolyzomální kompartment. Oproti DNA vakcínám nedochází k transkripci v jádře a přímo se váže na ribozomy, zatímco největší množství molekul mRNA je degradováno. (5) Dále dochází stejně jako u DNA vakcín k translaci mRNA do struktury protektivních Ag na ribozomu, ke zpracování Ag v APB a indukci specifické imunitní odpovědi. (33, 42)



Obrázek 4 Mechanismus účinku mRNA vakcíny vytvořeno v programu BioRender dle (33)

RNA se ve vakcínách vyskytuje ve formě ***in vitro* transkribované (IVT) mRNA**. Na obrázku 5 je uvedeno několik strukturních prvků IVT mRNA, které lze optimalizovat, modifikovat za účelem modulace stability, translační kapacity a imunostimulačního profilu RNA. Otevřený čtecí rámec mRNA může být sekvenčně upravený strukturálními nepřekladatelnými prvky či guanosin-cytosinovými motivy. Dále může být modifikován nukleosidy či může obsahovat samoamplifikující RNA (saRNA). Na 5' konci se nachází tzv. anti-reverse cap modifikace zajišťující účinné navázání 5' konce mRNA na ribozomy. Koncové struktury mohou být modifikovány polyadenylací či kruhovou mRNA. (41)



Obrázek 5 IVT mRNA a její modifikace (41)

V následující tabulce 5 jsou stejně jako u DNA vakcín shrnuty hlavní **výhody** a **nevýhody** RNA vakcín.

Tabulka 5 výhody a nevýhody RNA vakcín vypracováno dle (33, 41, 43)

výhody	nevýhody
kóduje vysoký počet Ag determinant	problematický „endosomal escape“
přímá translace mRNA do struktury Ag (proteinu)	je stále potřeba jejich formulace ke zvyšování jejich stability
nevstupuje do jádra buněk, nehrozí interference s genomy cílových buněk	současné podávání léků může ovlivnit účinnost metabolismu mRNA vakcín
vnitřní adjuvační efekt	

Použití vakcín založených na mRNA je důležitým milníkem, kdy byla zavedena první vakcína založená na mRNA pro humánní použití v rámci terapie pandemie virového onemocnění **COVID-19**. (10) Tyto vakcíny vytváří Ag proti SARS-CoV-2, kdy nejvyšší účinnost ve III. fázi klinického zkoušení vykazovaly vakcíny od společností Pfizer/BioNTech (BNT162b2) (NCT04368728) a Moderna (mRNA-1273) (NCT04283461). (44) Díky účinnosti více jak 95 % v klinickém zkoušení, získala tato vakcína podmíněnou registraci v Evropské unii v roce 2020. (45)

V klinickém testování se také objevují mRNA vakcíny v léčbě **rakoviny** (NCT02316457). Jedná se o mRNA vakcíny, jejichž cílovými buňkami jsou DB. Tyto vakcíny jsou pouze zatím v klinickém testování. Dále jsou DB mRNA vakcíny testovány proti virovým onemocněním, jako je virus lidské imunodeficiency (**HIV-1**) (NCT00833781), kdy pacienti infikovaní HIV obdrželi HIV-1 Ag kódující mRNA vakcínu. V klinickém testování jsou mRNA vakcíny proti **Zika viru** (NCT04064905), **tuberkulóze** (NCT01669096), **Ebole** (NCT02485912) či stejně jako u DNA vakcín proti **chřipce** (NCT03076385). (46)

Slibnou **budoucnost** mají mRNA vakcíny proti rakovině a infekčním chorobám. Avšak, stejně jako u DNA vakcín, vhodné dodávací systémy mohou překonat omezenou stabilitu a efektivitu translace nahé mRNA. (47)

1.3 Vektory pro dodávání DNA a RNA vakcín

Jak již dříve bylo zmíněno je klíčové zvýšit imunogenicitu, stabilitu, biologickou dostupnost u DNA a RNA vakcín. (1, 3, 28, 47) Dále je důležité, aby vakcíny založené na DNA a RNA byly efektivně dodávány do cílové buňky, a také aby docházelo k řízenému uvolňování těchto vakcinačních agens. (28)

Nahé vakcíny založené na NA jsou v lidském těle nestabilní, mohou být enzymaticky degradovány, musí projít buněčnými bariérami, cytoplazmou, a v případě DNA také stěnou jádra. (4) Právě vektory fungují jako nosiče genetické informace do buněk. (48) Díky vhodným vektorům je docíleno řízeného uvolňování NA do cílových buněk, a také hrají klíčovou roli při zvyšování stability NA. (28, 49)

Ideální vektor by měl chránit jádro NA před enzymatickou degradací, usnadňovat buněčné vychytávání a endosomální únik, a také vykazovat minimální toxicitu. (49, 50) Obecně tyto vektory dělíme na virové a nevirové. Zásadní rozdíl je ten, že virové jsou založené na vírech a obecně jsou vysoce imunogenní, avšak nevirové mohou být založené na fyzikálních či chemických vektorech a jsou méně imunogenní. Další rozdíly jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 Rozdíly virové a nevirové vektory vypracováno dle (40, 49, 50)

vlastnost	virové vektory	nevirové vektory
základní rozdíl	založené na vírech	fyzikální/chemické vektory
imunogenicita	vysoce imunogenní	méně imunogenní
tkáňová transdukce	lehká transdukce různými typy buněk a tkání	slabý transdukční potenciál
genetická modifikace	potřebná	nemusí se vyžadovat
chemická modifikace	nezávazná	potřebná
typ buňky	somatické a zárodečné	somatické

Výzkum vektorů vedl k průlomům ve vývoji léčiv založených na NA a v následujících kapitolách jsou probrány jednotlivé typy těchto vektorů. (49)

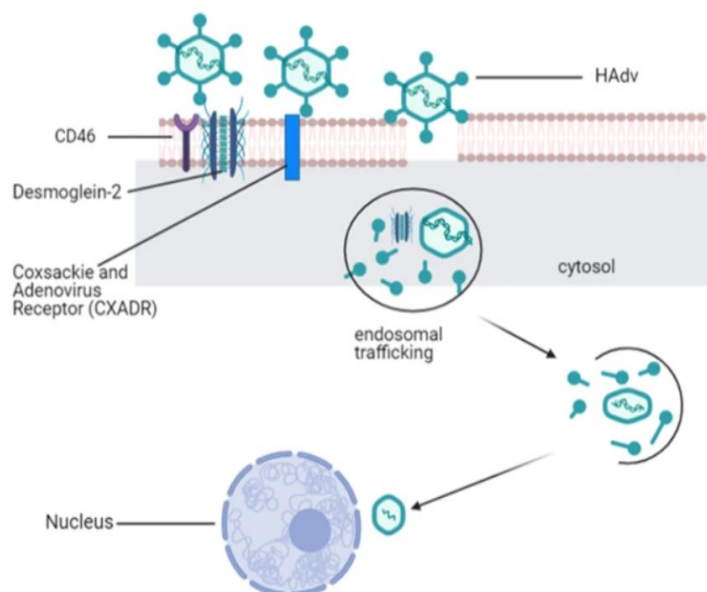
1.3.1 Virové vektory

V této kapitole jsou zmíněny samotné virové vektory, kde na obrázku 6 je uvedeno velmi jeho zjednodušené schéma se zabudovanou DNA. Díky virovým vektorům dochází k procesu zvanému transfekce, kdy virové vektory s NA jsou zaváděny do eukaryotické buňky za účelem změny genetické výbavy buňky. (51)



Obrázek 6 schematicky znázorněný virový vektor s DNA vytvořeno s použitím programu BioRender

Viry s vysoce účinnou transfekcí a používané virové vektory jsou vytvořeny prostřednictvím virové replikace. (40, 50, 51) Hlavním úkolem těchto vektorů je zvýšení exprese Ag *in situ* a bezpečné kódování požadovaného genu. (40, 51, 52) Proto je také důležité zmínit mechanismus účinku těchto vektorů, který je uveden na obrázku 7 na příkladu adenovirového (AdV) vektoru. Tento vektor se váže na příslušné receptory v buňce. Poté se prostřednictvím receptorem zprostředkované endocytózy internalizuje do cytosolu a následně virální DNA vstupuje do jádra. (50)



Obrázek 7 mechanismus AdV vektoru (50)

Virové vektory jsou dodávány do buňky nejen prostřednictvím receptorem zprostředkované endocytózy, ale také prostou fúzí, jak je uvedeno v tabulce č. 7. (53) Zde jsou také srovnány ostatní typy virových vektorů v rámci rozvoje imunitní odpovědi a jejich kapacitou.

Tabulka 7 virové vektory (AAV=Adeno-asociovaný virus, HSV= Herpes simplex virus) (53-55)

	Poxvirus	Retrovirus	AdV	AAV	HSV
mechanismus vstupu	fúzí	fúzí	receptory	receptory	fúzí
imunitní odpověď	výrazná	minimální	výrazná	žádná	výrazná
kapacita (kb)	7,5	8	36	4	30

Bezpečnost a imunogenicitu byla prokázána u AdV vektoru a dále u poxvirovém vektoru v klinických zkouškách. (40, 54-56) Žádná imunitní odpověď byla u Adeno-asociovaném virovém vektoru, naopak výrazná byla pozorována u Herpes simplex virového vektoru. (53-55) Právě bezpečnost a imunogenicitu jsou velice diskutabilními **problémy**, a to hned z několika důvodů. Bylo prokázáno, že virové vektory jsou původně odvozeny z divokých patogenních virů a může u nich dojít k mutaci do původního virulentního stavu. (40) Dalším problémem je, že virové vektory exprimují virové Ag, také jsou tyto vektory zcela imunogenní (tj. vytvářejí reakci proti samotným vektorům), a dokonce mohou být toxické pro hostitelskou buňku. (40, 52) Tento problém se pak řeší právě použitím AdV, který se u lidí běžně nevyskytuje. (40, 56)

Mezi **výhody** patří, že obal viru chrání DNA v něm obsaženou, a dále, že není potřeba chemická modifikace. (40, 50) Virové vektory, jak bylo zmíněno v tabulce 6, cílí na buňky somatické, tak i na buňky zárodečné a dochází k velmi lehké transdukcii (přenosu) mezi různými tkáněmi. (50) Virové vektory mají různé „tvary“ a „formy“. Dále mohou být obalené či neobalené, jednoduché či složité a nést jedno nebo dvou řetězcové NA, DNA a RNA. (57)

S vakcínami založenými na virových vektorech jsme se v minulosti setkali u léčby infekčních onemocnění jako je např. Zika virus, HIV, Ebola virus a malárie. Díky tomu

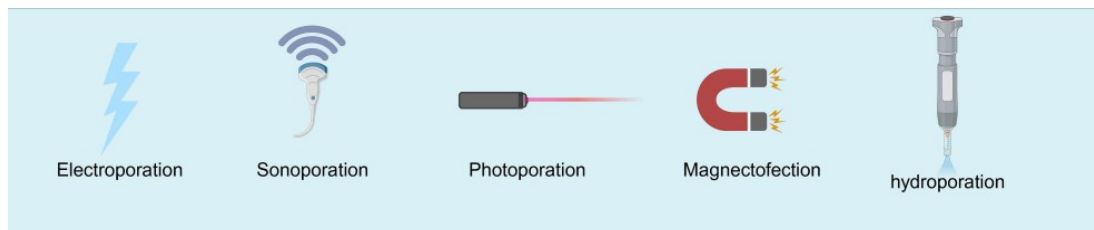
se zefektivnil vývoj NA vakcíny proti onemocnění COVID-19 a dále došlo k urychlení vývoje virových vektorů. (58)

Příkladem DNA vakcín dodávaných pomocí AdV vektoru jsou vakcíny AstraZeneca (NCT043246), Johnson and Johnson (NCT045099) a Gam-COVID-vac (Sputnik V) (NCT044364). AdV vakcíny kódují produkci SARS-CoV-2 spike proteinu, který je primárním cílem pro neutralizaci protilátek generovaných přirozenou infekcí. (44) Právě AdV vektor má u těchto vakcín slibné výsledky jako platforma pro dodávání vakcinačních agens, a to díky velké kapacitě a výrazné imunitní odpovědi. (53, 56) Nevýhoda je však, že AdV vytváří specifickou imunitu, což může omezit účinnost opakovaných booster dávek v důsledku imunitně zprostředkovanou clearance vektoru. (44)

1.3.2 Nevirové vektory

Jak už z názvu vyplývá, neviróvé vektory nepoužívají virus jako nosič genetické informace. (48,59) Tyto vektory využívají dvě hlavní metody v doručování genetické informace do buňky, a to metodu **fyzikální** a **chemickou**. (59)

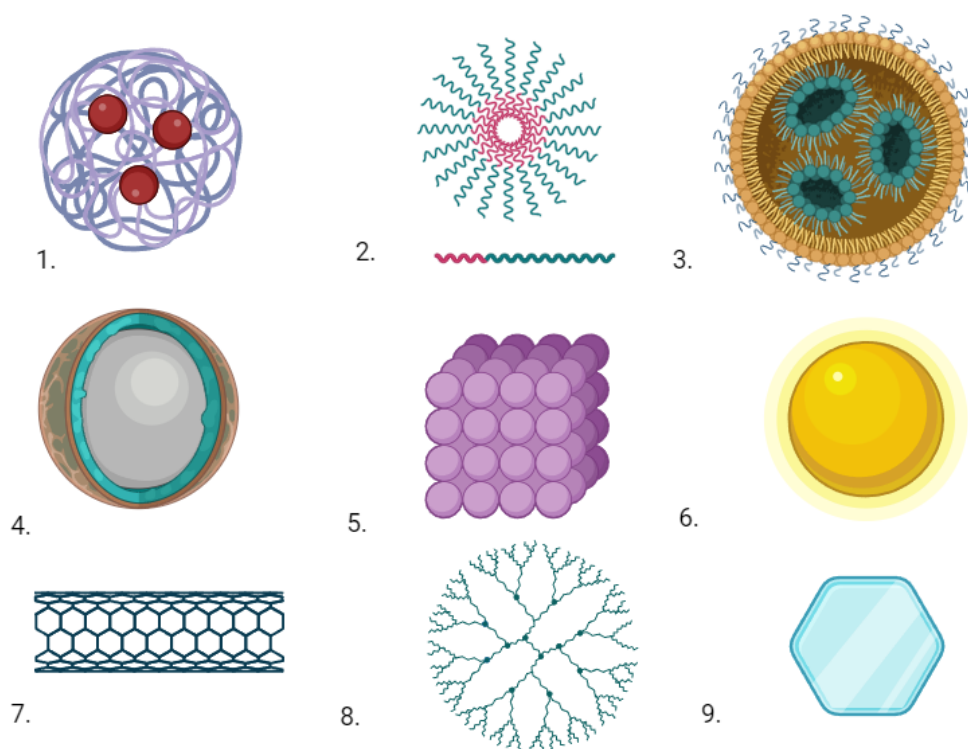
Fyzikální metoda umožňuje dodávat mechanicky genetický materiál přímo do buňky. Tyto metody jsou známé jako elektroporace, sonoporace, fotoporace, magnetofekce, hydroporace a genová zbraň uvedených na obrázku 8. (36,59) Jako příklady vakcín s použitím fyzikálních metod v klinickém zkoušení jako příklady mohou sloužit vakcíny NWRD08 DNA vakcína (NCT05905354), HPV DNA Plasmids Therapeutic vakcína VGX-3100 (NCT03603808) a Hataan DNA vakcína/ Puumala DNA vakcína (NCT04333459). (36)



Obrázek 8 fyzikální metody neviróvé vektorů (36)

Chemické metody využívají přírodních, nebo syntetických materiálů, které jsou kompatibilní s lidským organismem, kde mají velký význam právě nanočásticové (NČ) materiály klíčové pro tuto diplomovou práci.

Nanočástice (NČ) jsou částice s velikostí od 1 nm-100 nm a existuje velké množství typů NČ, jak je uvedeno na obrázku 9. (60) Jsou připravovány metodami Top down a Bottom up. Při metodě Top down dochází k redukci velikosti částic vhodnou metodou například mechanickým mletím. Naopak u metody Bottom up dochází ke zvětšení částic díky vzájemnému spojování částic tzv. nukleaci. (61)



Obrázek 9 Jednotlivé typy NČ: 1. polymerní NČ s inkorporovaným léčivem, 2. micela s monomerní jednotkou, 3. lipidová NČ, 4. nanosféra, 5. nanokrystal, 6. zlatá NČ, 7. uhlíková NČ, 8. dendrimer, 9. ledový krystal; vytvořeno s použitím programu BioRender

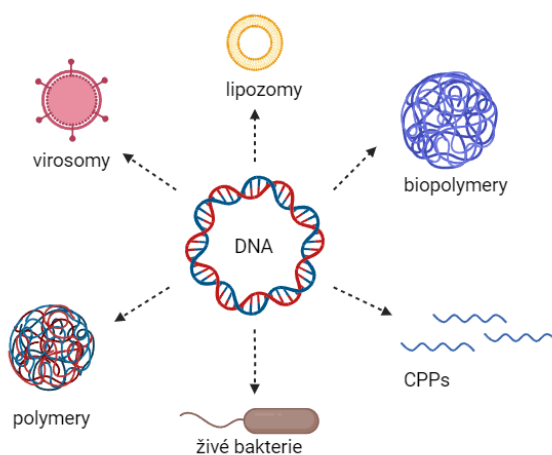
V současné době existuje řada NČ terapeutik, zobrazovacích látek a technologií, které byly schváleny v **medicině** pro klinické použití od FDA ve Spojených státech nebo od Evropské lékové agentury v Evropské unii. (62, 63) NČ obecně zapouzdřují léčiva

a díky tomu jsou schopné řízeně a cíleně dodávat léčivo k nemocným buňkám, a také zvyšují jeho rozpustnost. NČ mají velký poměr objemu k povrchu, modifikovatelný vnější obal, některé biologickou odbouratelnost a nízkou cytotoxicitu. Povrch tvořený NČ zlepšuje účinnost léku a současně snižuje dávkování na optimalizovaný farmakokinetický profil. (4,28,49,63) První FDA schválený „nanopřípravek“ byl v roce 1995 registrován pod názvem Caexyl jiným názvem Doxil, skládajícího se z liposomálního antibiotika doxorubicinu. Dochází zde ke zvýšení distribuce do nádoru, a tím ke snížení systémové toxicity. (62)

NČ hrají také stále významnější roli ve vývoji vakcín, kde zvyšují stabilitu Ag, imunogenicitu, ale také cílené dodávání či zpomalené uvolňování. (4, 28, 44, 63-64) NČ zde fungují jako nosičové systémy vakcín nebo také jako adjuvancia. Byly použity v řadě různých vakcín jako jsou vakcíny proti hepatitidě typu B, Newcastle chorobě a u DNA/mRNA vakcín. (44, 64)

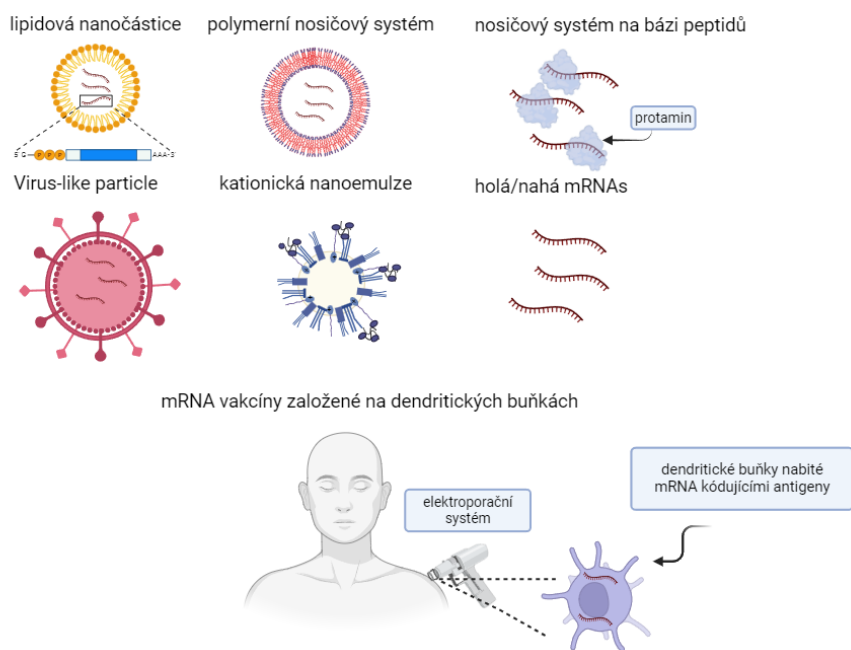
V rámci NA vakcín se zkoumají NČ citlivé na endolysozomální prostředí, aby došlo k zacílení uvolnění NA do endozomálního prostředí. Jak již bylo zmíněno, dodávání NA do buněk je velice obtížné. NA jsou citlivé na endogenní nukleázy a záporné náboje NA brání internalizaci buněk a nespecifické interferonové odpovědi spuštěné v cytoplasmě. (4, 36, 49) Výhodné je, pokud NČ přednostně cílí na APB nebo selektivně migrují do lymfatické tkáně. To bylo docíleno drenáží malých NČ velikostí od 10 nm do 100 nm, aby docházelo k ovlivnění B buněk, T buněk a APB v lymfatické tkáni. (4, 65) U NA zejména využíváme organické nosiče (založené na lipidech, založené na proteinech, polymerní částice) a anorganické nosiče (uhlík, křemičitany, zlaté NČ, atd.) (62)

Na obrázku 10 je uveden základní přehled nosičů pro DNA vakcíny jako jsou polymerní částice, virosomy, lipozomy, biopolymery, peptidy penetrující buňku tzv. Cell Penetrating Peptides (CPPs) a živé bakterie. (32) Živé bakterie se ukázaly jako zajímavé alternativní nosičové systémy samy o sobě nebo v kombinaci s NČ. (66)



Obrázek 10 Nosiče DNA vakcín vytvořeno s použitím programu BioRender

Na obrázku 11 je uveden základní přehled nosičů pro mRNA vakcíny, a to na bázi lipidů, na bázi polymerů, na bázi peptidů, virus-like částic neboli částic podobným virům (VLPs), kationtových nanoemulzí (KNE), nahé mRNA a elektroporační systém s DB s mRNA kódujícími Ag. (46)

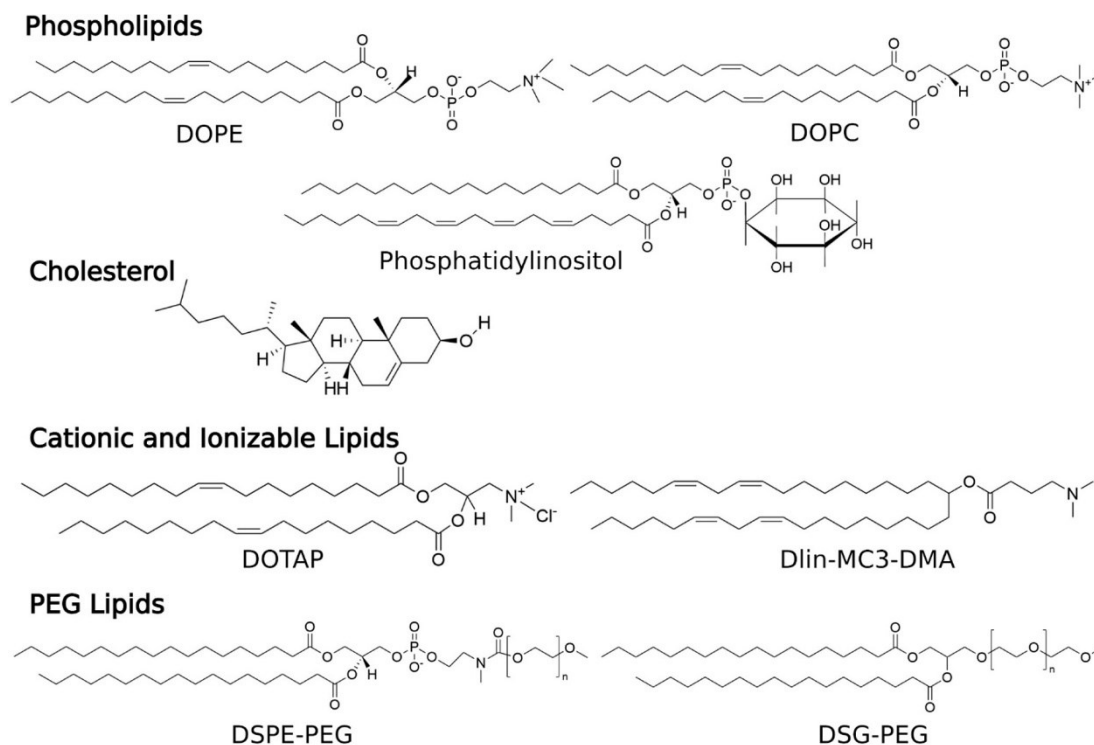


Obrázek 11 Nosiče RNA vakcín; vytvořeno s použitím programu BioRender

1.3.2.1 Lipidické NČ

Velice významné NČ nosiče představují lipidické NČ, které jsou velmi široce využívané pro dodávání NA. (46, 62, 67, 68) Lipidické NČ jsou vysoce přizpůsobivou

třídou nanonosičů, které můžeme obecně charakterizovat velikostí, povrchovým nábojem a morfologií. (69) Lipidické NČ se skládají polyethylenglykolovaných (PEGylovaných) lipidů, fosfolipidů, cholesterolu, esenciálních ionizovatelných aminolipidů a kationtových aminolipidů, jak je uvedeno na obrázku 12. (46, 69)



Obrázek 12 různé složky lipidických NČ: DOPE, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (DOPC) a fosfadidylinositol, cholesterol, kationtové a ionizovatelné aminolipidy 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan (DOTAP), (1,2-dilinoleoxy-3-dimethylaminopropan) (Dlin-MC3-DMA)), a PEG lipidy (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfoethanolamin-*N*-[methoxy(polyethylenglykol)] (DSPE-PEG), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfoethanol-amin-*N*-[succinyl(polyethylen glykol)] (DSG-PEG)). (69)

PEGylované lipidy prodlužují dobu cirkulace lipidických NČ, protože stericky brání vazbě mRNA a plazmatických proteinů. Dále tyto lipidy zvyšují stabilitu, biokompatibilitu a tlumí reaktogenitu. (46, 70) PEGylované lipidy se mohou vázat na fosfolipidy, které společně s cholesterolem stabilizují lipidické NČ. Jako příklad fosfolipidu můžeme zmínit významný fosfolipid dioleoylphosphatidylethanolamin známý jako DOPE. (71, 72) Další složka cholesterol nejenže stabilizuje lipidické NČ,

ale také může zvýšit aktivaci komplementu při vyšším množství membránových lipidů (<70 %). (71, 72)

Esenciální ionizovatelné aminolipidy umožňují mRNA uniknout z endozomu díky interakci negativně nabitých aminolipidů s endozomální membránou. (70) V roce 2018 FDA schválila formulaci ionizovatelného aminolipidu na bázi DLin-MC3-DMA. (73) Ionizovatelné aminolipidy byly optimalizovány tak, aby dodávaly malé interferující RNA intravenózně, a také jsou účinnými systémy pro dodávání mRNA a samoamplifikujících vakcín. To vede k tomu, že řada ionizovatelných aminolipidů formulovaných s mRNA a samoamplifikujícími vakcínami je zkoumána v klinických studiích pro léčbu různých infekčních onemocnění (chřipky, viru Zika, viru vztekliny a lidského cytomegaloviru). (73)

Kationtové aminolipidy používané pro přenos genů sdílejí podobné vlastnosti: hydrofilní hlava s kladně nabitým nábojem se spojuje se záporně nabitými NA a hydrofobní lipidový konec slouží jako spojovník mezi nimi. Účinnost transfekce je vysoká v závislosti na tvaru molekuly, počtu nabitých skupin na molekule, povaze lipidových řetězců a vazbě mezi kladně nabitým nábojem a záporně nabitými NA. (74, 75)

Díky kationtovým lipidům dochází také k doručování mRNA do jater, což má za následek obrovskou produkci proteinů. (74) Existují ale obavy z používání kationtových aminolipidů kvůli informacím, že jsou to zdroje buněčné toxicity. (69, 74, 76)

Nejdůležitější je kationtový aminolipid DOTAP, který byl jedním z prvních zkoumaných kationtových aminolipidů. (69, 74, 76) DOTAP se skládá z aminové hlavní skupiny, ke které jsou připojeni pomocí vazby hydrofobní konce. (74, 76) DOTAP není jediný kationtový aminolipid a v následující tabulce č. 8 jsou přehledně znázorněny další kationtové aminolipidy s jejich výhodami a nevýhodami používaných v klinických zkouškách. (74) Z tabulky č. 8 vyplývá, že existují monokationtové a polykationtové aminolipidy, kdy polykationtové (DOSPER, GL-67) zvyšují účinnost transfekce, ale také s rizikem zánětlivé toxicity. Dále pak cholesterol může být také zabudován do kationických lipidů a je označován jako vložený. (74-75)

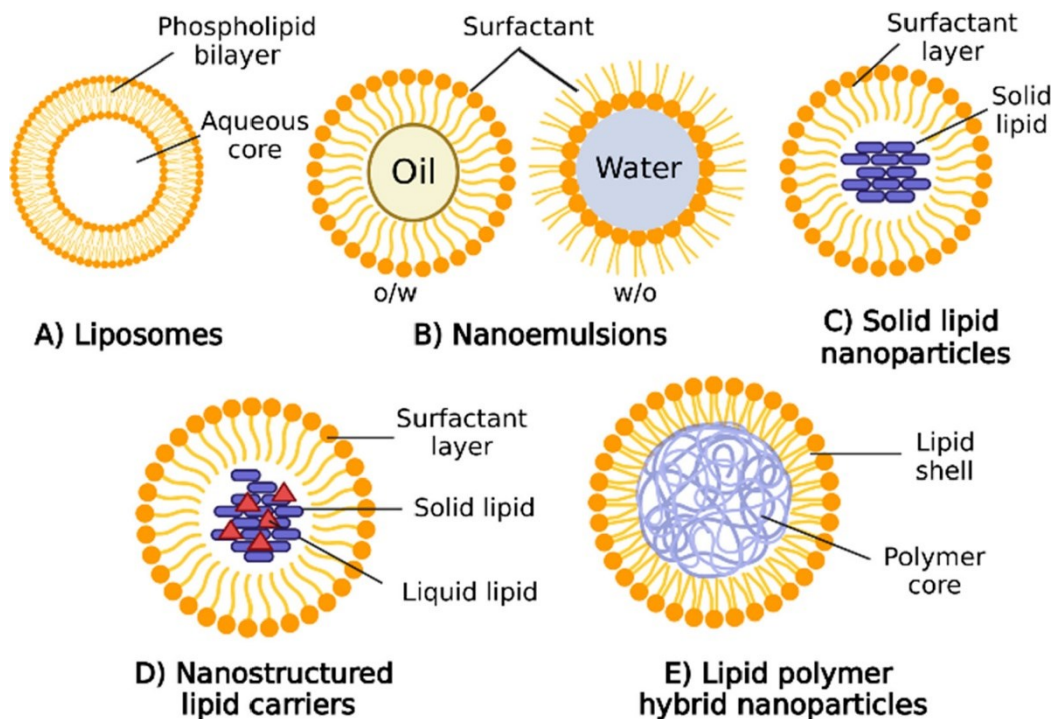
Tabulka 8 kationtové aminolipidy v klinické praxi (72, 74-75, 77)

kationický aminolipid	náboj	cholesterol	výhoda	nevýhoda
DOTAP	monokationtový	nevložený	dobře prostudované, slibný bezpečnostní profil	snížená cílená lokalizace
DOTMA	monokationtový	nevložený		
DMRIE-Chol	monokationtový	vložený	zvyšují stabilitu lipozomu	aktivace komplementu díky cholesterolu
DOTIM-Chol	monokationtový	vložený		
DOSPER	polykationtový	nevložený	zvýšená účinnost transfekce	zvýšená toxicita/zánět
GL-67	polykationtový	vložený		

Fan. a kol. zkoumali kationtovým aminolipidem asociované NČ tzv. KLANy k přenášení a dodávání mRNA vakcín. KLANy se skládají z kopolymeru kationtového aminolipidu a poly(ethylenglykolu)-blokpoly(kyseliny mléčné-ko-glykolové). (4, 78) Dochází zde k výrazné specifické T-buněčné odpovědi a redukci nádoru u vakcíny KLAN/mRNA kódující ovalbumin. KLANy se tudíž jeví jako slibné nosičové systémy pro klinické zkoušení. (79)

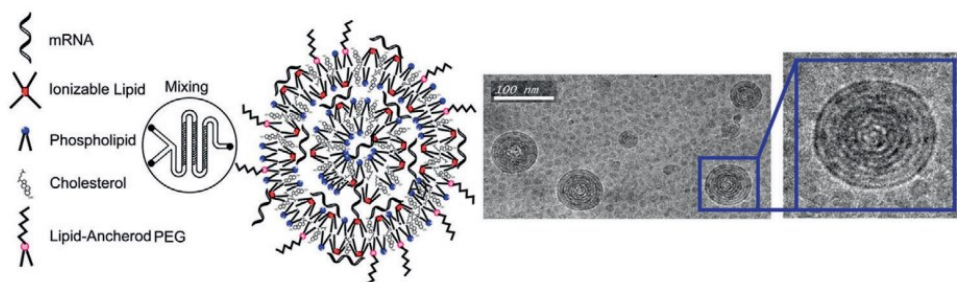
Lipidické NČ mají dvě výhody jako pro vektor mRNA vakcíny. První výhoda je, že lipidické NČ chrání mRNA před degradací enzymy z endozomu a jejich struktura zaručuje vysokou účinnost zapouzdření NA. (46, 80) Druhá výhoda je, že mají lipidické NČ dobrou biokompatibilitu prostřednictvím řady biologických procesů pro dodání mRNA pro expresi Ag. Proto probíhají nejen preklinické studie, ale i klinické studie fáze I. a II., kdy se hodnotí vakcíny mRNA na bázi lipidických NČ. (46)

Jak je uvedeno na obrázku 13 mezi Lipidické NČ patří lipozomy, lipidické nanoemulze, pevné lipidické částice (PLČ), nanostrukturované lipidické částice (NLČ) a lipidické polymerní hybridní NČ, které jsou jednotlivě probrány v této kapitole.



Obrázek 13 typy lipidických NČ (69)

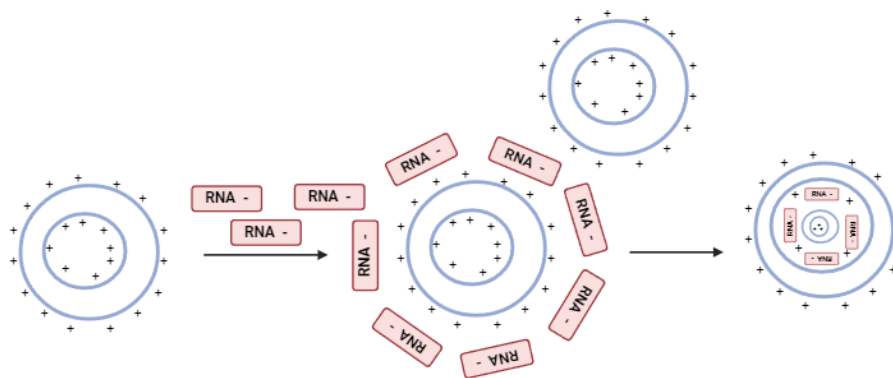
Lipozomy jsou dobře prozkoumané nanonosiče pro cílené dodávání léků. (72) Jedná se o vezikuly s alespoň jednou lipidovou dvojvrstvou. V lipozomálních formulacích jsou NA rozptýleny v celé dvojvrstvě, jak je uvedeno na obrázku 14. (4)



Obrázek 14 Design lipozomálních NČ pro buněčný příjem a endozomální únik (4, 81)

Lipozomální vektory mohou být navrženy tak, aby na ně reagovaly na kyselé prostředí uvnitř nádoru nebo v buněčných endozomech k uvolnění terapeutika. (4) Vlevo na obrázku 14 jsou ionizovatelné lipozomální komplexy s negativně nabitou mRNA na nízké úrovni pH. To usnadňuje endocytózu a endozomální únik. Fosfolipid poskytuje strukturální integritu dvojvrstvám a zároveň podporuje endozomální únik mRNA do cytosolu. (4, 81) Tyto fosfolipidy jsou v lipozomálních formulacích netoxické a biodegradovatelné. (64, 82) Cholesterol pomáhá stabilizovat lipozomální NČ

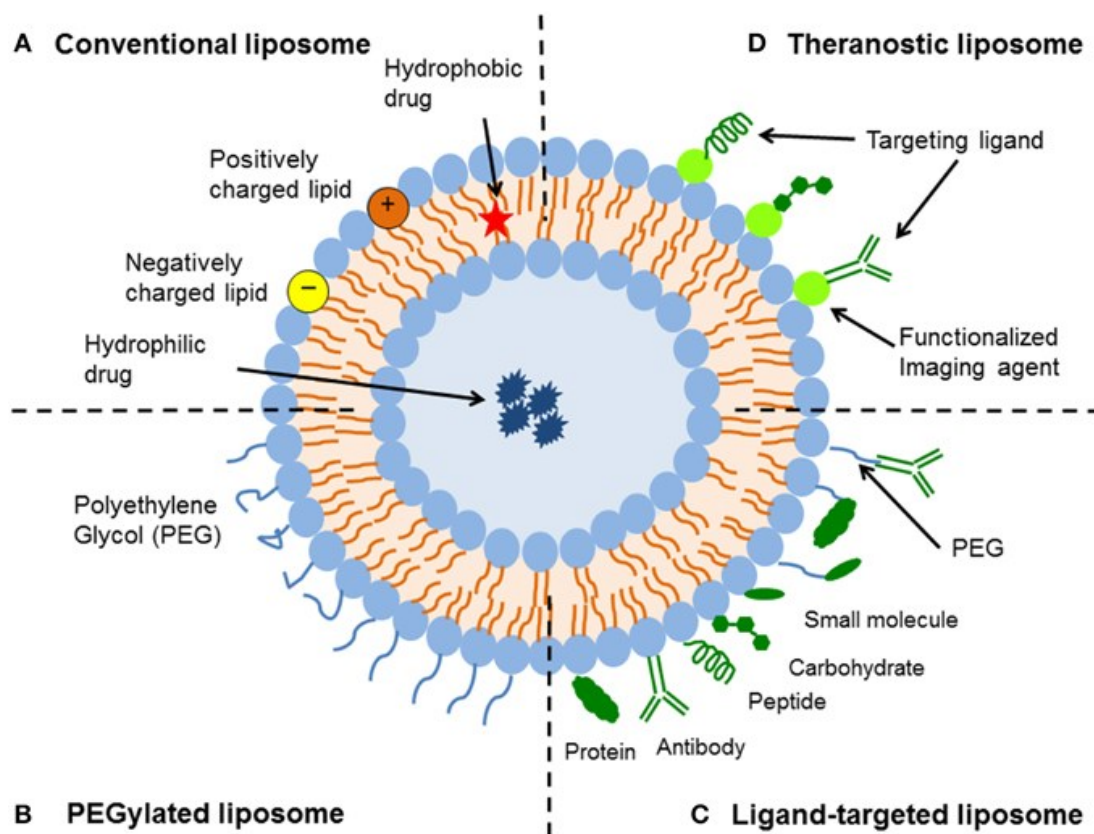
a podporuje fúzi membrán. PEG ukotvený v lipidech zabraňuje agregaci lipozomálních NČ a snižuje nespecifické interakce. Vpravo je snímek sférických lipozomálních NČ s multilamelární strukturou vytvořený pomocí elektronové mikroskopie. (4, 81)



Obrázek 15 Schéma enkapsulace RNA do lipozomu vytvořeno s použitím programu BioRender

Na obrázku 15 je uvedeno schéma enkapsulace RNA do lipozomu, kdy dvoulamelární lipidová částice s kladně nabitým povrchem a vnitřním jádrem elektrostaticky interaguje se záporně nabitou RNA. Záporně nabitá RNA pokrývá povrch bilamelární lipidové částice, která elektrostaticky interaguje s novou kladně nabitou bilamelární lipidovou částicí. Toto vytváří multilamelární částice, kde je RNA zachycena mezi dvěma vrstvami lipidových částic. (74)

Obecně lipozomy samy o sobě nejsou imunogenní a kombinují se s imunostimulačními ligandy známými jako adjuvancia k dodávání vakcín. (82) Lipozomy modifikované maleimidem jsou schopné tvořit vezikuly se zesítenou dvojrůstvou, které se zejména hodí pro postupné uvolňování Ag. (4, 64) Nejenom maleinimidem lze modifikovat lipozomy, ale i dalšími molekulami lze modifikovat lipozomální systémy, jak je uvedeno na obrázku 16.



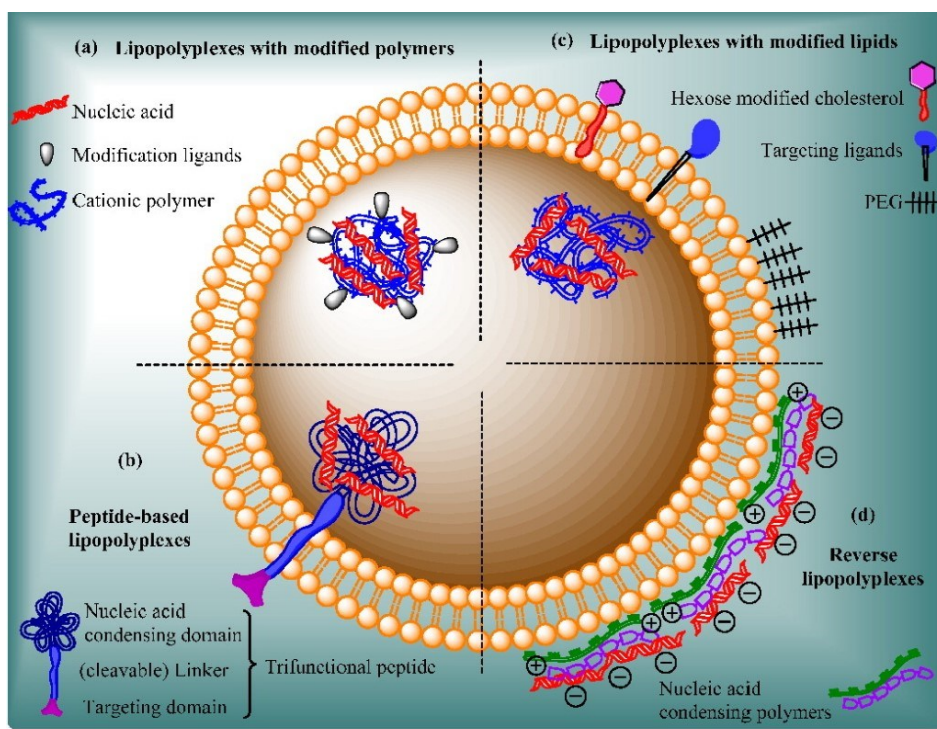
Obrázek 16 schématické znázornění lipozomálních systémů (72) a) Konvenční lipozomy jsou nejstarší generací lipozomálních nosičů. (72) b) Jak již bylo zmíněno dříve hydrofilní PEGylované lipozomy stéricky stabilizují lipozomální strukturu a zabraňují jejich agregaci. (4, 72, 81) c) Lipozomy lze také modifikovat pro specifické cílení, a to díky připojení ligandů (např. protilátek, peptidů a sacharidů) na jejich povrch nebo na terminální konec připojeného řetězce PEG. (72) d) Teranostický lipozom se skládá z jednoho systému NČ, zaměřovacího prvku, zobrazovací složky a terapeutické složky. (70)

Lipozomální systémy jako doručovací systémy u vakcín jsou také schválené a zavedené pro použití u člověka u vakcín Inflexal[®] R a Epaxal[®]. (64, 84) Dále se lipozomální systémy používají u DNA vakcín ve výzkumu. Zde se zkoumá kombinace modifikovaného DOTAPu a kationtového polymeru nejčastěji protaminu s DNA jako tzv. NČ lipozom-polykation-DNA. (64, 83)

Vzhledem k velkému množství preklinických toxikologických údajů pro některé nanolipozomy, mohou tyto látky poskytovat přímější cestu pro vývoj jako vehikula pro dodávání RNA v klinické praxi u lidí. (4) Lipozomální NČ mají hned několik výhod jako doručovací systémy pro mRNA vakcíny. Mezi nejdůležitější patří, že jsou biologicky odbouratelné, snadno se připravují, chrání mRNA před působením nukleázami, vstupují do buňky endocytózou a mRNA končí neporušená v cytoplasmě.

(85) Díky tomu mají tyto lipozomální systémy důležitou roli ve vakcíně od Moderna proti SARS-CoV-2 viru (NCT04470427), kdy dochází k výrazné produkci protilátek proti tomuto viru a bezpečné aplikaci u lidí. (86) Dále Oberli a kol. formuloval lipozomální NČ pro dodání mRNA vakcíny k imunoterapii rakoviny, kdy schéma této lipozomální NČ je uvedeno na obrázku 14. (4)

Lipopolyplexy (LPP) jsou velmi složité lipozomální struktury, které také můžeme zařadit k hybridním vektorů. Hybridní vektory jsou shluky více materiálů, které vzájemně kombinují své výhody. (47) LPP se skládají z polymeru s mRNA v jádře takzvaného polyplexu, který je zapouzdřen do lipidového obalu takzvaného lipoplexu. (87) V rámci doručování NA vědci zkoumají více možných modifikací těchto LPP a výzkum se zaměřuje především na zvyšování bezpečnosti při doručování NA vakcín. Dále je rozdělují do základních 4 typů uvedených na obrázku 17. (88)



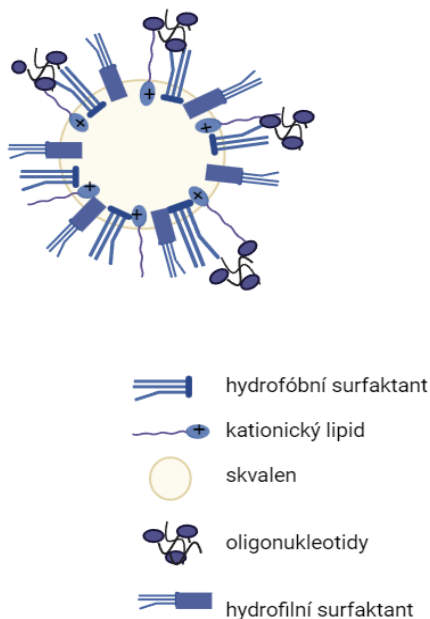
Obrázek 17 typy LPP s ukotvenými NA (88) a) LPP s modifikovanými polymery (NA se naváže na kationický polymer s modifikovanými ligandy) b) LPP založené na peptidech s „triofunkčním“ peptidem c) LPP s modifikovanými lipidy (NA se taky naváže na kationický polymer, ale lipoplex je modifikován cholesterolem, cílicími ligandy a PEGylován) d) reverzní LPP (NA je navázaná vně na kondenzační peptidy)

V preklinických studiích byly ošetřeny myši nesoucí plicní metastatické nádory B16-OVA exprimující Ag ovalbuminu s LPP mRNA a bylo pozorováno více než 90% snížení nádorových uzlin. (47, 87) V klinickém zkoušení LPP/mRNA vakcína proti melanomu se vyvinula proto, aby poskytovala dostatečnou ochranu molekul mRNA před degradací plazmatickými a tkáňovými enzymy. Tato vakcína s jádrem a obalem strukturované mRNA vstupuje do DB makropinocytózou. (87) Jako další problematika se zkoumá využití LPP u krátkých vlásenkových RNA a siRNA vakcín. (88) LPP také nachází uplatnění v enkapsulaci DNA vakcín, kdy díky kombinaci výhod polyplexu a lipolexu vykazují vynikající koloidní stabilitu, sníženou toxicitu a vysokou účinnost transfekce. (89)

Nanoemulze byly široce používány ve farmaceutickém průmyslu pro dodávání léčiv špatně rozpustných ve vodě o velikosti menší, než je 200 nm. Nanoemulze se skládají se dvou nemísitelných fází olejové (o) a vodní (v) a můžeme je rozdělit na hydrofilní (o/v) a hydrofobní (v/o). U hydrofilních emulzí je vnitřní fází olejová s triacylglyceroly, diacylglyceroly či monoacylglyceroly a u hydrofobních je vnitřní fáze vodní s polárními rozpouštědly či kosolventy. (69, 90) Ve vývoji vakcín jsou optimalizované právě hydrofilní emulze s olejovou vnitřní fází. (91)

U nanoemulzí se můžeme setkat také s hybridním vektorem **KNE**, která stejně jako u LPP obsahuje shluky více materiálů, které vzájemně kombinují své výhody. (47) KNE je složena z kationtového lipidu DOTAP fixovaného kladným nábojem a se složkami emulze adjuvans MF59. (90) Právě DOTAP slouží k fixaci NA v KNE díky elektrostatickým interakcím. (90-93) MF59 je komerční adjuvans skládající se ze skvalenu, Spanu 85 a Tweenu 80. (94) Mechanismus účinku MF 59 byl rozsáhle studován. MF59 vyvolává buněčný infiltrát, který je důležitý pro jeho adjuvantní aktivitu. Zajímavé je, že bylo prokázáno, že počet infiltrujících leukocytů vyvolaných KNE a injekcemi MF59 byl srovnatelný. (91)

Dalšími složkami jsou hydrofobní a hydrofilní surfaktanty sloužící ke stabilizaci emulze. Schéma KNE je uvedeno na obrázku 18. (91)



Obrázek 18 Schématický nákres KNE; vytvořeno s použitím programu BioRender

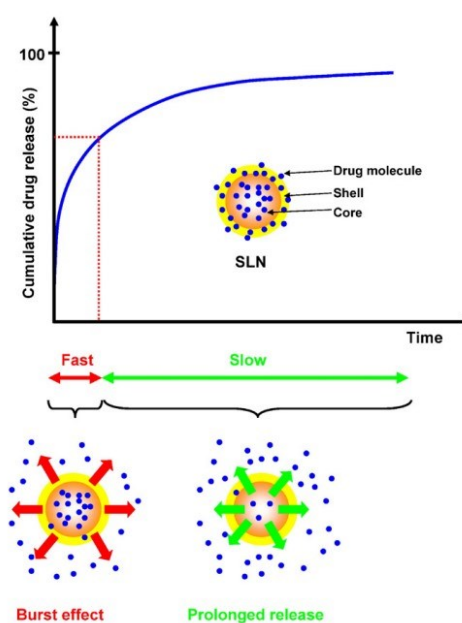
Mezi výhody pro dodávání NA pomocí KNE patří relativně nízké náklady na průmyslovou výrobu, stabilita během skladování, vysoká biokompatibilita a dále schopnost vyšší transfekce a nižší toxicitu než mají samotné lipozomy. (47, 91, 92, 95) I přes nižší cytotoxicitu než u lipozomů se výzkumníci snaží o snížení množství cytotoxických kationtových aminolipidů u NA vakcín založených na KNE. (95)

KNE jsou vyvinuty pro saRNA vakcíny. Tento nevirový nosičový systém je založen na systému Novartis proprietárním adjuvans MF59, který je založený na klinicky bezpečném profilu a dobré toleranci u dětí, dospělých a seniorů. (47) Již ve velice malých dávkách indukují velmi silnou imunitní odpověď a exprese proteinu je podobná s virovým vektorem nebo pDNA dodávanou elektroporací. (91) Také jsou popsány KNE jako slibný vektor pro pDNA. (47) Je dokázáno, že buněčná imunitní reakce vyvolaná KNE se saRNA byla výraznější než u VLPs. (46) Zatím probíhá klinické zkoušení např. u vakcíny saRNA VEEV-TC 83 proti viru Venezuelské koňské encefalidity. Na závěr mají KNE velmi optimistické vyhlídky do budoucna. (91)

Pevné lipidické částice (PLČ) byly původně formulovány jako malé kulovité částice s pevným lipidovým jádrem při pokojové teplotě a následný pokrok vedl k vývoji plochých elipsoidních nebo diskovitých tvarů. (69, 96-97) PLČ vykazují velikost mezi

50 nm až 100 nm. (97, 99) V rámci PLČ může být účinná látka inkorporována do lipidového jádra, lipidového obalu nebo dispergována v celé lipidové matici. (69)

Pevné lipidové jádro je novější metoda pro zlepšení stability částic ve srovnání s lipozomy. (97) Oproti lipozomům poskytují také lepší řízené uvolňování léčiva, jak je uvedeno na obrázku 19. (98) Začlenění kationtových lipidů může zvýšit buněčnou internalizaci částic a tím ulehčit zacílení na některé buněčné struktury například nádory, penetraci hematoencefalickou bariérou a účinnost genové transfekce. (99) Vnější obal PLČ může být modifikován makromolekulami, jako jsou oligosacharidy, proteiny, specifické ligandy a protilátky. Tato modifikace vede ke zvýšení specifity na požadované terapeutické cíle. (69, 99)



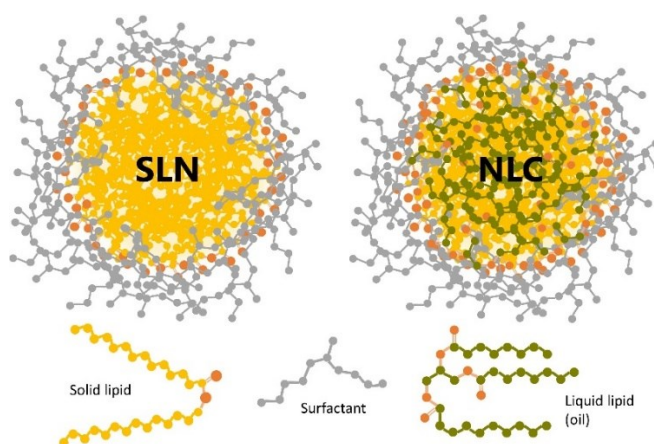
Obrázek 19 uvolňování léčiva ze PLČ (99)

Mezi hlavní výhody PLČ patří nízká toxicita, vylepšená farmakokinetika a účinnost léčiv potažmo vakcín. (99-101) Stále je však třeba zlepšovat jejich poměr mezi náklady a efektivitou, cílené uvolňování a fyzikálně-chemickou a mikrobiální stabilitu. (100-101)

PLČ nesou několik terapeutických látek včetně antioxidantů, proti rakovinových látek, NA, antibiotik, cytokinů a dalších hydrofobních léčiv. (69, 98, 101) V klinickém testování je vakcína „small interfering“ mRNA (siRNA) založená na PLČ cílejí na amyloidózu. (69) Dále pak v preklinických studiích se používají pro doručování

pDNA na myších modelech k ochraně plazmidu či u siRNA k jejímu pozvolnému uvolňování ze PLČ. (101-103)

Nanostrukturovaná lipidická částice (NLČ) je podobná PLČ s tím rozdílem, že obsahuje nejen pevný lipid, ale i kapalný lipid, jak je uvedeno na obrázku 20. (86) Poměr mezi pevným lipidem (např. cetylpalmitát) a kapalným olejem (např. triglycerid kyseliny kaprylové) a povrchově aktivní látkou (např. polysorbát 80) hraje klíčovou roli při určování účinnosti zachycení a stability terapeutických činidel *in vivo*. (69, 104)

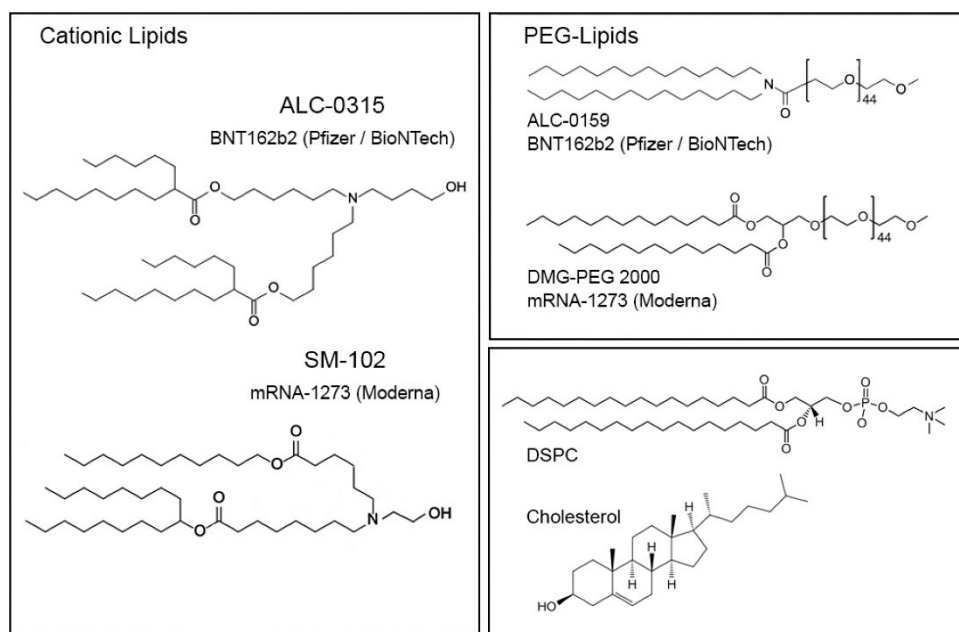


Obrázek 20 srovnání PLČ(SLN) a NLČ(NLC) (100)

Také se jim přezdívá takzvaná druhá generace, protože jsou jejich vylepšenou formou. (102, 105) Oproti PLČ mají NLČ nižší krystalinitu. Nižší krystalinita potlačuje vypuzování léčiva z matrice a zvyšuje kapacitu pro léčivo. (86, 106) NLČ nabízí řízené uvolňování a zvýšenou stabilitu léčiva. Jsou biokompatibilní a biologicky odbouratelné, což z nich dělá ideální nosiče léků. K řešení těchto problémů a ukázání plného potenciálu NLČ v terapii je ale zapotřebí další výzkum. (69)

NLČ jsou účinné nosiče RNA a pDNA genové terapie a modulují genovou expresi, a tím dodávají terapeutické proteiny. Tímto mechanismem taky nabízí všestrannou platformu pro terapii založenou na NA k léčbě genetických onemocnění a rakoviny. NLČ se ukázaly jako slibné v klinických studiích pro různá léčiva včetně mRNA vakcín u onemocnění COVID-19. Vakcíny založené na NLČ s saRNA, mRNA 1273 a BNT162b2 mRNA jsou zatím v klinickém testování. (69, 105, 107-108)

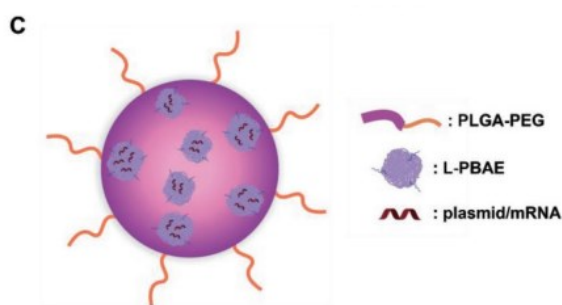
Vakcína mRNA 1273 od Moderny a vakcína BNT162b2 od společnosti Pfizer/BioNTech jsou veřejně známé. Vakcína mRNA 1273 od Moderny se skládá z pomocných lipidů (cholesterol, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (DSPC)), PEGylovaného lipidu (DMG-PEG 2000) a kationického lipidu (SM-102). Vakcína BNT162b2 od společnosti Pfizer/BioNTech se skládá z rovněž z pomocných lipidů (cholesterol, DSPC), PEGylovaného lipidu (ALC-0159) a kationického lipidu (ALC-0315). Na obrázku 21 jsou uvedeny jednotlivé struktury obsažené v těchto dvou vakcínách. (86)



Obrázek 21 jednotlivé struktury lipidů ve vakcínách BNT162b2 a mRNA-1273 (86)

Lipidické polymerní hybridní nanočástice jsou hybridní NČ lipidových polymerů, které jsou dalším typem lipidických NČ. Spojují výhody lipidů a polymerů pro biomedicínské aplikace. (69, 109) Jedná se o relativně novou třídu lipidem modifikovaných polymerních poly(β -aminoesterů) (L-PBAE) prostřednictvím enzymaticky katalyzované esterifikace a další formulace L-PBAE s poly(d,l-laktidoglykolidem)-b-poly(ethylenglykol), což vede k samovolnému sestavení do nanostruktury „částice v částici“ (ČVČ) pro dodání genu jak je uvedeno na obrázku 22. (110) Toto jedinečné strukturální složení nabízí optimální biokompatibilitu a fyzikální stabilitu, což z nich činí ideální prostředek pro dodání léčiv pro další výzkum. (69) Lipidické polymerní hybridní NČ avšak čelí několika problémům, a to

potencionální toxicita polymerních složek, a potíže s konzistentní velikostí a tvarem částic. (98)



Obrázek 22 schematicky znázorněná Lipidické polymerní NČ - L-PBAE (110)

Z 24 kandidátů ČVČ je nejvýkonnější NČ PNČ/C12-PBAE, která účinně dodává jak DNA, tak mRNA *in vitro* a *in vivo*, přičemž vykazuje zvýšenou účinnost transfekce. Polymerní vakcíny ČVČ COVID-19 zapouzdřené spike kódovanou plasmidovou DNA a mRNA úspěšně vyvolávají specifické protilátky u imunizovaných myší i po 12 měsících lyofilizovaného skladování při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tento nově vyvinutý lipid-polymerní hybridní ČVČ NČ systém demonstruje novou strategii pro dodávání pDNA i mRNA se schopností dlouhodobého lyofilizovaného skladování. (110)

1.3.2.2 Systémy NČ na bázi peptidů

Peptidy jsou přirozené struktury přítomné ve všech biologických systémech. (4) Samy o sobě se používají jako očkovací látky nebo také usnadňují dodávání vakcín založených na NA. (111)

Peptidy používané pro dodání NA jsou kladně nabitě díky inkluzi lyzinových a argininových zbytků a elektrostaticky váží záporně nabitě NA za vzniku nanokomplexů. (4, 112) Tyto nanokomplexy lze považovat za NČ. Jejichž pozitivně negativní poměr ovlivňuje tvorbu komplexu pozitivně nabitého peptidu s negativně navázanou NA. (4)

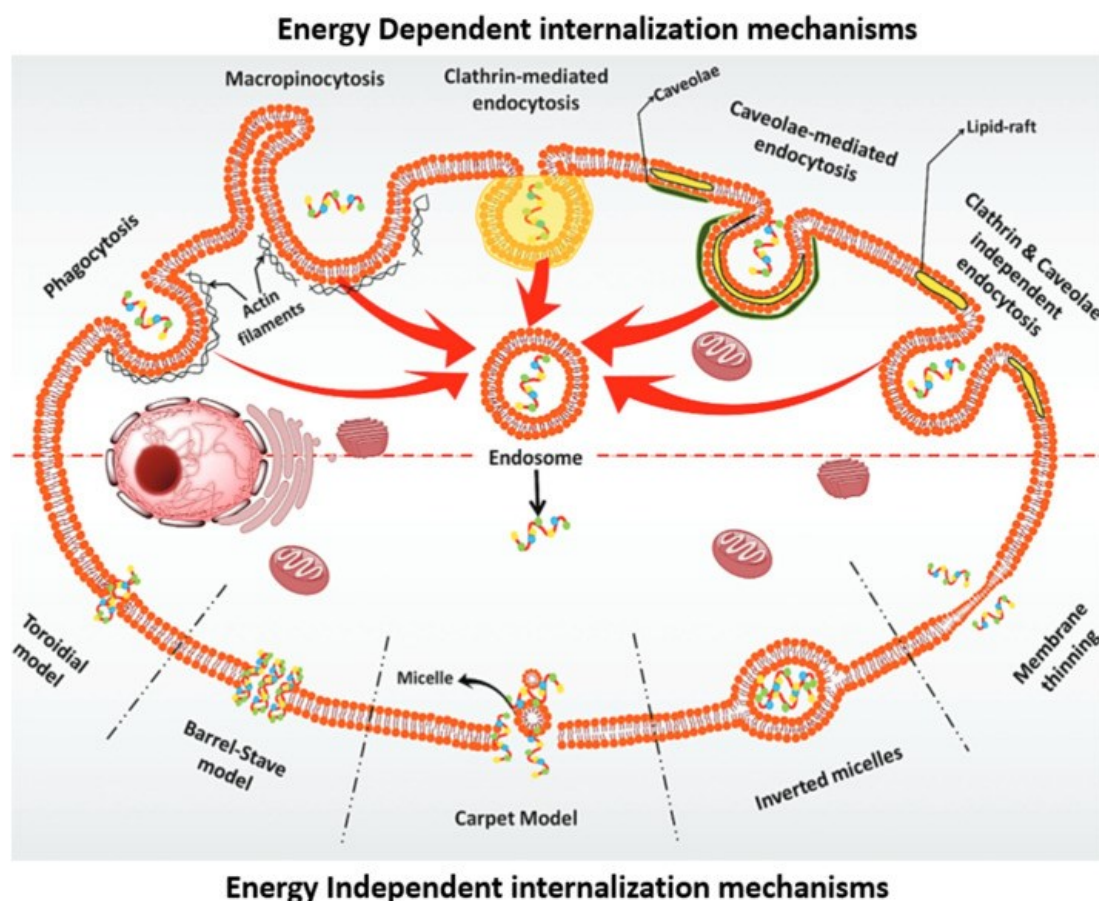
Mezi hlavní výhody peptidů patří jejich biodegradovatelnost, biokompatibilita a snadná biosyntéza v savcích či bakteriálních buňkách. Pouze u uměle syntetizovaných peptidů je situace jiná, zde je jejich syntéza náročná. (113)

Velkou nevýhodou je, že běžně používané peptidy bohaté na arginin vykazují nefrotoxicitu a při aplikaci těchto sloučenin by měly být vždy zváženy benefity

a rizika s nimi spojená. (114) Preklinické studie na myších se zaměřují na výzkum peptidů v DNA vakcínách proti kolorektální rakovině, malárii, schistosomózy a infekcích způsobené lidským papilomavirem. (115) Jelikož jsou peptidy nedávno vyvinuté systémy, je nutná jejich optimalizace, chemická modifikace, skladování a testování na větších zvířatech a dále i klinické zkoušky. (4, 116)

Do peptidických NČ můžeme zařadit CPPs, protaminy, polypeptidy a VLPs. Tyto NČ jsou jednotlivě rozebrány níže.

Cell Penetrating Peptides tzv. **peptidy penetrující buňku (CPPs)** jsou skupina malých peptidů obsahující 9-30 aminokyselin. (114) Tyto peptidy jsou právě důležité k narušení buněčné membrány a k doručení NA do buňky. (46) K porušení membrány může dojít dvěma způsoby, a to energeticky závislými či nezávislými, uvedených na obrázku 23. (113)



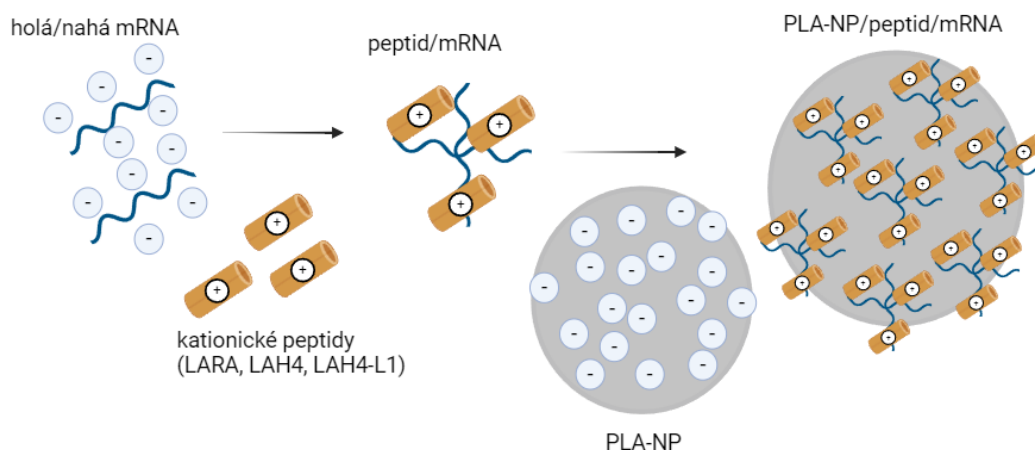
Obrázek 23 mechanismy porušení membrány (113)

CPPs lze kombinovat s polymerními, lipidovými či anorganickými složkami a tím vytvářet komplexy NA prostřednictvím elektrostatických interakcí. (117) CPPs můžeme na základě fyzikálně chemických vlastností dále rozdělit na základě náboje na amfipatické a kationtové. Dále CPPs můžeme rozdělit na hydrofobní a hydrofilní. (113) Bylo prokázáno zlepšení imunogenicity po podání DNA vakcín s CPPs proti virovým infekcím. (118)

Dále pak Udhayakumar a kol. demonstroval použití CPPs s amfipatickým peptidem RALA pro dodání mRNA vakcíny. RALA je amfipatický peptid zobrazující kladně nabitě argininové zbytky na jedné straně a na straně druhé leucinové zbytky. RALA dokázal kondenzovat mRNA do nanokomplexů se schopností membrány uniknout z endozomů v závislosti na kyselém pH. Byla také provedena vakcinace mRNA zprostředkovaná RALA v porovnání s lipozomální mRNA s kationtovým lipidem DOTAP a fúzogenním lipidem DOPE. Tato studie ukázala, že RALA a další CPPs jsou velmi příznivá vehikula pro mRNA. (4)

Mezi další CPPs patří R9-K-GALA. R9-K-GALA je hydrofobní amfipatický syntetický peptid a díky velkému množství argininu u něho mírně převládá kladný náboj. Právě díky argininu dochází k navázání DNA/siRNA. Mezi hlavní výhody patří vysoká transfekční aktivita a nízká toxicita. Hlavní nevýhoda je ovšem ve složité výrobě. (113)

Existují také hybridní komplexní částice kationických peptidů s polymerem poly (mléčné kyseliny) (PLA), jak je uvedeno na obrázku 24. Bylo prokázáno, že PLA zapouzdřuje nebo adsorbuje různé Ag, imunostimulanty a jsou účinně přijímány DB. Jak povrch PLA-NČ, tak biomolekuly mRNA jsou negativně nabitě, proto byly použity kationické CPPs jako látky zprostředkující enkapsulaci mRNA na PLA-NČ. (4) Coolen a spolupracovníci vyvinuli platformy mRNA-PLA NČ pomocí tří různých CPP jako kationtové meziproducty pro mRNA na vektor PLA-NČ. (46) Přípravky PLA-NČ/peptid vykazovaly nejvyšší expresi proteinů *in vitro* prostřednictvím fagocytózy, což je nejdůležitější pro vstup PLA-NČ. (119)

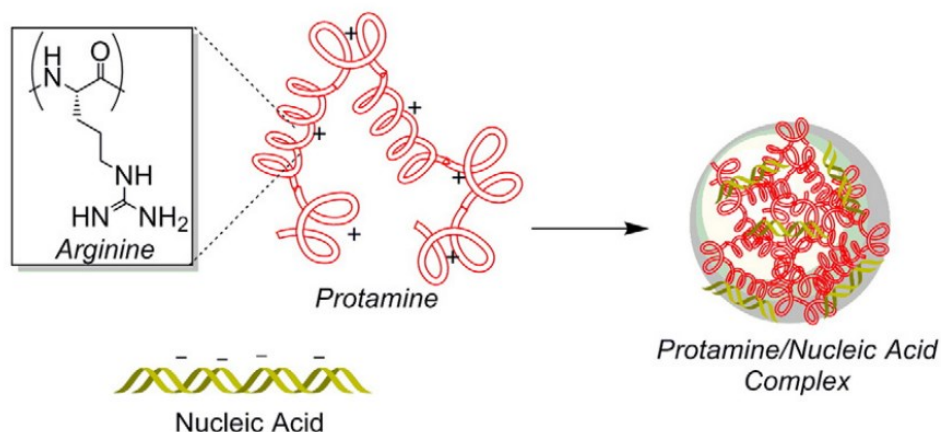


Obrázek 24 Vektorizace mRNA pomocí PLA-NČ (na obrázku se jedná o PLA-NP) s kationtovými peptidovými meziprodukty; vytvořeno pomocí programu BioRender

Vektorizace mRNA probíhá tak, že záporně nabitá mRNA se spojuje s kationtovými a amfipatickými peptidy za vzniku polyplexů peptid/mRNA. Komplexní jsou, až dojde k adsorpci na PLA-NČ za vzniku nanokomplexu PLA-NČ/peptid/mRNA. (46, 119)

Další výzkumy s CPPs mohou zahrnovat další modifikace lipozomů, polymerních NČ a anorganických nanočástic pro synergický účinek. (4, 119)

Protaminy jsou rodina malých peptidů (cca 4 kDa) odvozených od spermií ryb. Jedná se o molekuly bohaté na arginin, které tvoří komplexy se záporně nabitými DNA k jejich kondenzaci. (120) Prostřednictvím elektrostatických interakcí vytváří protaminy komplexy s DNA, jak je uvedeno na obrázku 25. Protamin byl zkoumán v roce 1961 jako jeden z prvních materiálů pro transfekci dlouhých RNA. (93) Protamin může vytvářet komplexy s mRNA za tvorby pevně vázaných NČ o velikosti přibližně 300nm. Protamin:mRNA bývají většinou v poměru 2:1. (93, 121) Ve své protamin v kondenzované formě chrání mRNA proti degradaci ribonukleázou a je známo zvýšení imunitní odpovědi jak *in vitro*, tak *in vivo* ve srovnání s nahou mRNA. (122)



Obrázek 25 Protamin/NA komplex (93)

Jedním příkladem terapie mRNA v komplexu s protaminem je technologie RNActive© od CureVac. Vakcína mRNA, která se připravuje ze směsi nahých mRNA a komplexů protamin/mRNA. (121) Při intradermálním podání umožňuje nahá mRNA kódující Ag expresi, zatímco komplex protamin/mRNA také působí jako adjuvans. Tato vakcína nahé mRNA a mRNA v komplexu s protaminem byla popsána proti infekčnímu onemocnění proti chřipce u myši, fretok a prasat. (93, 123)

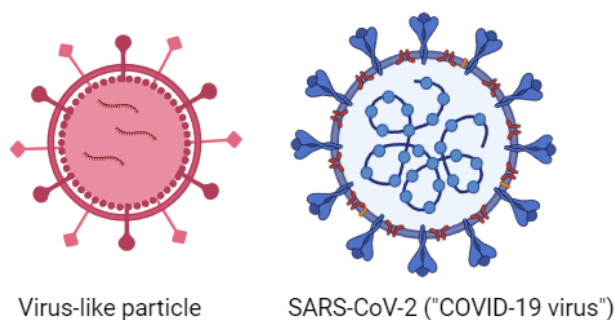
Podobně tomu, jak bylo popsáno u lipopolyplexů či u KNE k tvorbě hybridních formulací, je výhodné kombinovat různé materiály. U tohoto systému je výhodné zkombinovat NA s protaminem a lipidickými či polymerními NČ. Kationické sloučeniny v lipidických či polymerních NČ slouží k neutralizaci náboje na mRNA a poskytují nukleázovou ochranu a následné dodání komplexu na místo určení. (93) Prokázal se potenciál tohoto přístupu pro intravenózní podání formulace lipid/protamin/mRNA vakcíny s 10 μ g modifikované mRNA kódující gen herpes simplex viru 1-thymidin kinázy pro cílenou nádorovou terapii u myši (124). Bylo popsáno, že mRNA dodaná touto hybridní formulací inhibuje růst nádoru. Kromě toho, že dříve popsané NČ byly většinou kationtového charakteru, aby se spárovali s negativně nabitou mRNA, je možné dodat elektroneutrální komplexy mRNA/protamin s vyrobenými NČ z neutrálně nabitého polymeru, jako je polykaprolakton. Toto by rozšířilo typy polymerů, které by bylo možné použít jako materiály pro přenos mRNA. (93)

Syntetické polypeptidy byly jedny z prvních používaných polymerních peptidických NČ systémů z poly-L-lysinu, které se používají ve výzkumu pro DNA vakcíny. (115) Syntetické polypeptidy dosahují velikosti až do 1000 nm a hrají důležitou roli jako vektory NA. (125)

K syntetickým polypeptidům řadíme polyplexy, které spontánně vznikají z polykationtu a polyaniontu (např. poly-L-lysinu). (125) M. Plebanski a kol. kondensovaly pDNA kuřecího vejce ovalbuminu s poly-L-lysinem obalenými polystyrenovými NČ. Tento systém indukoval OVA specifické Ag u myši jako dobrý inhibitor růstu tumoru. (126) H. Sasaki a kol. vytvořili aniontový obal díky poly(γ -glutamové) kyselině u polyethylenimin (PEI)/DNA komplexu DNA vakcíny (NCT04049864). (4, 127) Tento poly(γ -glutamový) obal redukoval vysokou hepatotoxicitu kationtového PEI. Tento komplex DNA vakcíny inhiboval růst nádoru recidivujícího neuroblastomu. (4, 115, 127)

Systémy nanočástic na bázi Virus Like Particles (VLPs) jsou často nejvíce přirozenějším nosičem pro vakcinaci. VLPs jsou virové strukturální proteiny. Jedná se o spontánně agregované proteiny izolované z viru a zbavené virové genetické informace. (4, 128) Zbavení virové genetické informace je činí neinfekčními Ag NČ, které vyvolaly velký zájem a rozvoj. (64)

VLPs mohou být odvozeny od různých virů s rozmezím velikostí od 20 nm do 800 nm, které mohou být vyráběny různými technologiemi. V historii docházelo k výrobě *in vivo*, kde dochází k sestavení kapsidových proteinů do VLPs, poté je částice vyčištěna od kontaminantů. Nově se objevuje metoda sestavování VLPs prostřednictvím bezbuněčného zpracování *in vitro*. Dosud komercializované VLPs jsou založeny na sestavování proteinů odvozených z cílového viru. (64) VLPs mohou být funkcionalizovány peptidy, fragmenty protilátek nebo PEG pro cílenou distribuci nebo pro prodloužení doby cirkulace. (129) Na obrázku 26 je uvedeno srovnání VLPs a virion SARS-CoV-2.



Obrázek 26 Srovnání VLP s virionem SARS-CoV-2: VLP struktura je podobná s virionem SARS-CoV-2 s rozdílem, že VLP je synteticky vytvořený vektor bez virálního genomu; vytvořeno s použitím programu BioRender

VLPs vakcíny na bázi NČ jsou jedny z prvních NČ, které se dostaly na trh už v roce 1986 u vakcíny proti hepatitidě B. (64) V nanovakcínách mají VLPs nejslibnější využití pro bezpečné použití u lidí. (64, 129) VLP jsou u ostatních vakcín ideální „nanovakcínový“ systém, protože využívají vyvinutou virovou strukturu, která přirozeně interaguje s imunitním systémem, ale vyhne se infekčním složkám. (64) Díky optimalizaci NČ VLPs indukují silně imunitní odpovědi, a to dokonce i v nepřítomnosti adjuvans (130)

VLPs mohou vyvolat imunitní reakce na sebe, a to je velký problém pro použití VLPs jako vakcinačního vektoru pro nesení cizí DNA. To je pak jedna z velkých výzev pro další výzkum VLPs jako NČ nosič pro NA vakcíny. (131) Jako další nevýhoda je velmi složitý výrobní proces VLPs. (46)

Kombinace DNA vakcín a VLPs jsou v klinických výzkumech u HIV A HPV infekcí (NCT05334706). (132) V rámci RNA vakcín založených na VLPs se setkáváme ve výzkumu virových onemocnění, bakteriálních onemocnění a rakoviny. (46) V budoucnu se dá očekávat velký nárůst vakcín na bázi VLPs oproti virovým vektorům, a to díky nepřítomnosti virálního genomu. (36)

1.3.2.3 Polymerní NČ

Významný terapeutický potenciál ukázaly polymerní NČ pro řízené dodávání léčiv. (133) Polymerní NČ představují vynikající volbu jako nosičové systémy pro NA vakcíny. Jednotliví zástupci mají velmi rozdílné chemické a fyzikální vlastnosti. Mohou účinně chránit NA před degradací a dále umožňují strukturální modifikace za

účelem úpravy fyzikálně-chemických vlastností. Většina polymerů také vykazují biokompatibilitu a biologickou rozložitelnost. (4) Polymerní NČ lépe obalují NA bez jejich možné degradace oproti lipidických NČ. Avšak polymerní NČ jsou méně klinicky zkoumány ve srovnání s lipidickými NČ. (46)

Polymery obecně dělíme na přírodní (chitosan, polysacharidy, proteiny) a syntetické (polypeptidy, degradovatelné polyestery, ostatní polyestery, polymer PEI, vinylové polymery a dendrimery).

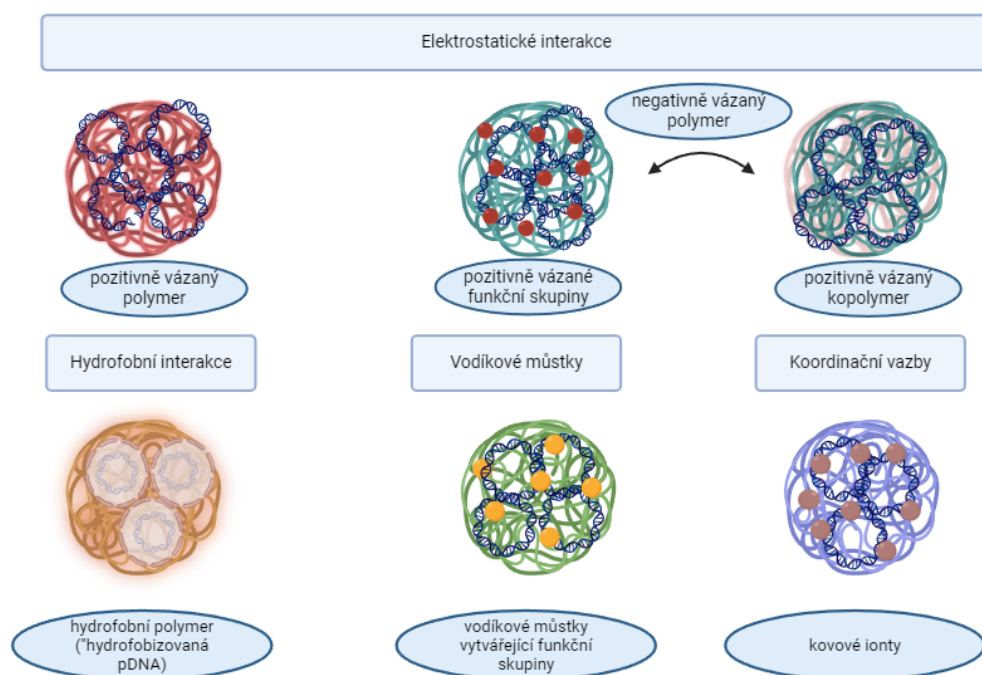
Přírodní polymery takzvané biopolymery jsou polymery přirozeně vytvořené živými organismy a nedávno se ukázaly jako vhodné materiály pro nosiče NA a významně zvýšily potenciál formulací NA vakcín. Dále lze biopolymery definovat jako syntetické polymery vyrobené z monomerních jednotek získaných z živých organismů (korýšů, mořských řas a kukuřice). (32, 134)

Biopolymery vykazují řadu **výhod**, a to vysokou fyzikálně-chemickou všestrannost a nízkou toxicitu. Poskytují ochranu před enzymy, které mohou interferovat se strukturou vakcíny a umožňují nákladově efektivní výrobu. Jsou pevnější a stabilnější než lipozomy. (32) Další výhodou je, že biopolymery mohou poskytovat různé nanostruktury s různou velikostí a povrchovými vlastnostmi. (64) Mezi další výhody patří biologická rozložitelnost a často i snadná výroba pomocí bakterií a enzymů. (32, 64)

Mezi **nevýhody** patří nadále nedostatečná imunitní odpověď u lidí při podávání NA. Výzkum se bude muset zaměřit na předkládání slibných výsledků preklinických studií prováděné u malých savců a primátů do účinné lidské terapie. Což je velmi obtížné kvůli odlišné struktuře imunitního systému u lidí a zvířat. (32)

Biopolymerní jádro může být **modifikováno** funkčními skupinami nebo kopolymery pro zlepšení dodávek vakcíny. (32) Pokročilé systémy zahrnují biopolymery s kovovými jádry nebo se také používají lipozomy či hydrogely. (136-138) Tyto modifikace funkčními skupinami či kopolymery v rámci spojení NA a biopolymerního materiálu jsou klíčové pro sestavení úspěšného systému dodávání NA. (32)

Účinná vazba je důležitá k ochraně NA a zajistí efektivní příjem buněk. V případě nestabilní vazby NA může dojít k jejímu předčasnému uvolnění, což má za následek nižší transfekční účinnost, a tudíž slabší imunitní odpověď. Nejrozšířenější je opět strategie kladného náboje na biopolymeru s negativně nabitými NA na základě elektrostatické interakce. (139) Na obrázku 27 jsou uvedeny jednotlivé strategie imobilizace NA na příkladu pDNA. Imobilizace probíhá buď na základě elektrostatické interakce negativně nabitých fosfátových skupin NA a pozitivně vázaným polymerem obsahující vnitřní kladný náboj, přidáním polymeru s pozitivně vázanými funkčními skupinami, či s pozitivně vázaným kopolymerem. Případně lze pDNA hydrofobizovat např. cetrimonium bromidem a pDNA je vázaná na základě hydrofobní interakce. Dále pak lze imobilizovat NA prostřednictvím vodíkových interakcí. Poslední strategií je možnost imobilizace fosfátových skupin NA pomocí iontů (zinečnatých, nikelnatých, berylnatých atd.) za vzniku koordinační vazby. (32)



Obrázek 27 Strategie imobilizace pDNA; vytvořeno v programu BioRender

Dále je důležité **zvýšení stability biopolymerních NČ**, které ochotně agregují v biologických médiích. Aby se zabránilo agregaci biopolymerů je důležitý povrch s hydrofilními polymery jako jsou např. PEG, poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), polydopamin, želatina, polyspermin, chondroitin sulfát, polyarginin a bovinní sérový

albumin. Pokud jde o chemickou stabilitu pDNA musí být dobře chráněna před působením enzymů DNázy. Jeden způsob je enkapsulovat pDNA do jádra NČ a blokovat přístup enzymů. Dále pak degradace enzymu může být minimalizována absorpcí pDNA na povrch nosiče. (32)

Jedním z nejdůležitější biopolymerů je lineární **polysacharid chitosan** vzniklý deacetylací z chitinu. Chitosan je obecně gelotvorná látka a používáme ho v případě NČ vektorů ve formě nanogelu. Nanogely mají celou řadu výhod, a to je jejich velká plocha, flexibilní velikost a vysoký obsah vody. (64, 115) Chitosan obsahuje velké množství aminoskupin interagujících s DNA do polyplexů. Je také znám pro svoji velmi dobrou mukoadhezivitu. Což je výhodné pro nasální podání vakcíny s DNA a prodlouženou clearance polyplexu. (115) Mezi další výhody patří dobrý bezpečnostní profil a levná produkce. Mezi nevýhody patří nízká transfekční aktivita a rozpustnost. (32) Chitosan byl zkoumán u intranasálních DNA vakcín proti respiračnímu syncytiálnímu viru a vykazoval protektivní imunitní reakci na myších. Byl taky modifikován manózou pro cílení na receptor APBs. Další příležitost je v navázání alginátu na chitosan pro perorální podání DNA vakcín. (115) Chitosan byl také kombinován se zlatem za vzniku zlaté chitosanové NČ jako vektor pro DNA vakcínu. Zde dochází ke zvýšení imunitní odpovědi. (3, 136) Dále se chitosan využívá u RNA vakcín proti chřipce a melanomu. Tyto chitosanové doručovací systémy s RNA ukázaly účinnou indukci imunitní odpovědi *in vivo*. (140)

Ostatní polysacharidy jsou v klinickém zkoušení u DNA vakcín proti Hepatitidě B či Herpes viru a v tabulce 9 jsou uvedeny jejich výhody a nevýhody. (115)

Tabulka 9 výhody/nevýhody ostatních polysacharidů (32)

	Alginát	Dextran	Chondroitin sulfát	Hyaluronová kyselina	Pullulan	Pektin
+	enkapsuluje DNA	prevence akumulace v krvi	cílí na CD44 receptory	schopná DNA kondenzace	rozpustný v širokém rozmezí pH	použití v potravinářském průmyslu
	mukoadheze	různé chemické modifikace	využití v biomedicínských aplikacích	gelová forma s vodou	používá se jako farmaceutický povlak	pro cílené uvolňování se používá s arabinozovými či galaktózovými postranními řetězci
-	nárazové uvolnění DNA	enzymatická degradace	nutná modifikace pro DNA kondenzaci	rychlá degradace	nutná modifikace pro DNA kondenzaci	velmi složitá struktura

Proteinové biopolymery stejně jako u ostatních polysacharidových polymerů je jejich přehled výhod a nevýhod uveden tabulce 10.

Tabulka 10 výhody/nevýhody proteinových biopolymerů (32)

	Želatina	Albumin	Protamin	Listeriolysin	DB cílicí protein	Epsilon poly-L-lyzin
+	využívá se v potravinovém průmyslu	stabilní v různém pH a teplotě	schopný DNA kondenzace	narušuje endozomální membránu	cílí DNA do DBs	schopný DNA kondenzace
	gelovatí	redukuje agregaci s krevními komponenty	protektivní vůči DNA endonukleázám	adjuvantní aktivita pro prozánětlivé cytokiny	schopný DNA kondenzace	používaný v potravinářství
-	nutná modifikace pro DNA kondenzaci	nutná modifikace pro DNA kondenzaci	agregace s krevními komponenty	nutná modifikace pro DNA kondenzaci	není univerzální	agregace s krevními komponenty

V příštích letech by se mohl objevit další výzkum oblasti DNA vakcín na bázi biopolymerů ke zvýšení jejich *in vivo* účinnosti, a nakonec by mohly biopolymery umožnit aplikaci v klinickém výzkumu. (32)

Syntetické polymery taky vytváří hydrogelové NČ (nanogely), které vytváří hydrofilní trojdimensionální strukturu. (36) Tyto syntetické polymery jsou stejně jako u LNC většinou kationtové povahy pro lepší enkapsulaci záporně nabitých NA. Dochází zde k elektrostatické interakci mezi záporně nabitými fosfátovými skupinami na NA a pozitivně nabitým polymerem do struktury polyplexu. Tento polyplex chrání NA před degradací nukleázou. (141-142) Mezi kationtové polymery patří PEI, poly(vinylamin) (PVA), poly(beta-amino estery), poly (amino co-estery), polyamidoamin (PAMAM) a poly(disulfid amin). Do kategorie aniontových polymerů řadíme i tzv. degradovatelné polyestery. Dále pak existuje speciální skupina vinylových polymerů do kterých patří poly(metyl methakrylát), poly(2-(dimethyloktyl)amonium methyl methakrylát brom) a poly(2-aminoethylakrylát). (46, 115, 143)

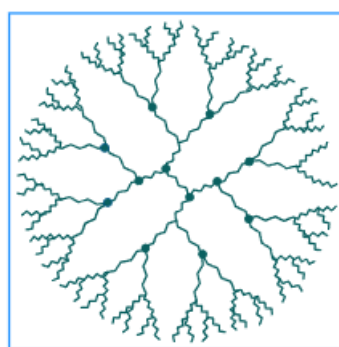
Polyethylenimin snadno tvoří komplexy s nukleovými kyselinami v důsledku elektrostatické interakce mezi negativně nabitou fosfátovou NA a pozitivně nabitou aminovou skupinou PEI. (4) Je to takzvaný zlatý standart v polymerních nosičích NA. (115) PEI má pozoruhodné vlastnosti, které pomáhají tvorbě NA komplexů, včetně vysoké pufovací kapacity v širokém rozsahu hodnot pH. (4) Tento nosičový systém s velkou transfekční účinností vytváří atraktivní nosič DNA vakcín. (115) Současný výzkum se zaměřuje na využití tohoto nosiče pro vysokou transfekční účinnost ale také i díky nízké cytotoxicitě. (143) Použití PEI u DNA vakcíny proti chřipce zlepšilo imunitní odpověď v preklinickém výzkumu. (144) DNA-PEI polyplex vakcína proti neuroblastomu je aktuálně v I. fázi klinického zkoušení. (4,145) Dále pak společnost BioNTech pracuje na využití PEI u saRNA vakcín, kde studie v preklinickém zkoušení přinesla slibné výsledky pro další výzkum. (143)

Mezi další kationtový polymer patří **PVA**. PVA charakterizuje nejvyšší obsah aminů mezi kationtovými polymery a vykazuje podobné vlastnosti jak již zmíněný PEI. Tian a kol. použil Xelorex™ RS 1100, komerčně dostupný PVA, k dodání siRNA a miRNA pro léčbu rakoviny *in vitro* u myši. Dále bylo zjištěno, že PVA dosahuje mírně lepší transfekční účinnosti než u PEI a jeho používání *in vivo* je nyní hodně diskutováno. PVA dosahuje totiž nižší cytotoxicity než PEI. Tian a kol. však jako první optimalizovali nemoifikovaný PVA a porovnali jej s PEI *in vivo*. Je zapotřebí provést

více studií *in vivo*, aby bylo možné lépe pochopit, jak můžeme srovnávat různé typy PVA a PEI v doručování NA. (143)

Za zmínku stojí také nedávný výzkum, který se zaměřil na další kationtové polymery, a to na poly(beta-amino estery) a jejich vylepšenou formu poly (amino co-estery). Tyto kationtové polymery se používají ve výzkumu jako nosiče pro vakcíny založených na siRNA a mRNA. Tyto kationtové polymery by mohly těmto vakcínám umožnit intranasální, intravenózní, ale i inhalační podání při vakcinaci a léčbě rakoviny. V současné době jsou označovány jako nová generace kationtových polymerů. (143)

Dendrimery reprezentují další rodinu kationtových polymerů, které jsou zkoumány jako robustní nosiče NA. (3) Díky kationtovému náboji opět lépe váží NA k efektivní transfekční aktivitě. (115) Mezi dendrimery patří poly(propyl ether imin), který stimuluje produkci neutralizační protilátek u myši proti vzteklině a PAMAM modifikovaný lyzinem. (146-147) PAMAM větve jsou založeny na methylakrylátu, ethylendiaminu a na koncích jsou aminové a karboxylové funkční skupiny. PAMAM dendrimery jsou hydrofilní, biokompatibilní vysoce rozvětvené kationtové polymery s jedinečnou 3D strukturou, která umožňuje funkcionalizaci, a také konjugaci/zachycování terapeutika s NA. (4) Jak je uvedeno výše, PAMAM má dost výhod, ale také nevýhod. V porovnání s PEI má vyšší molekulovou hmotnost a s tím související vyšší cytotoxicita a vyšší rychlost transfekce. (143) PAMAM dendrimery byly zkoumány u DNA vakcín proti infekci *S. japonica*. (147). Chahal a kol. modifikoval dendrimer PAMAM k vytvoření modifikované dendrimerové NČ saRNA vakcíny, který chrání myši před smrtelnou virovou infekcí chřipky H1N1 nebo virem Ebola. (3-4) V současné době se však dendrimery příliš nepoužívají kvůli omezeným údajům *in vivo* a je snaha je nahradit bezpečnějšími ionizovatelnými látkami. (143) Na obrázku 28 je uveden schematicky dendrimer.



dendrimer

Obrázek 28 Dendrimer; vytvořeno s použitím programu BioRender

Novinkou u kationtových polymerů je **poly(disulfid amin)**, který by se při dalším výzkumu mohl stát významným nosičovým systémem u saRNA a u siRNA vakcín. (143)

U **degradovatelných polyesterů** je nejvýznamnější kyselina PLGA, která je známá pro svou bezpečnost a je již několik desetiletí schválena pro humánní použití. (115, 141) Dřívější studie ukazovaly použití PLGA mikrosféry enkapsulující DNA plazmid pro cílení na APB k indukci imunitní odpovědi. Mikrosféry použité jako DNA vakcíny byly podány orálně a parenterálně a indukovaly systémovou protilátkovou odpověď. Tato formulace je efektivním neviróvým vektorem například při doručování profylaktické DNA vakcíny proti viru slintavky a kulhavky. (143) Nevýhoda degradovatelných polyesterů je nízká transfekční účinnost kvůli možné degradaci *polyesterů in vivo* při doručování DNA vakcín, ale také RNA vakcín. Kvůli této nestabilitě se používají kationické lipidy (např. již dříve zmíněný DOTAP), aby zvýšili stabilitu DNA, popř. RNA vakcín a transfekční účinnost. (141, 143, 148) Mezi ostatní polyestery patří poly(ortho estery), které také vytváří robustní Ag odpověď u DNA vakcín v preklinickém výzkumu. Výhoda je, že poly(ortho estery) můžeme zpracovávat do různých forem mikročástic a nanočástic. Dále byly tyto systémy doporučeny pro tvorbu hybridních vektorů. Robustní Ag odpověď je docílena zrychlené degradací těchto poly (ortho esterů) a uvolněním DNA vakcíny v reakci na kyselé prostředí v APB. (115)

Vinylové polymery jsou ideální polymerní nosičové systémy pro DNA vakcíny. Mezi vinylové polymery patří poly(metyl methakrylátu), poly(2-(dimethyl)oktyl)amonium

methyl methakrylát brom) a poly(2-aminoethylakrylát).(115) V roce 2004 J.M. J. Fréchet a kolektiv připravili acidolabilní zesíťované vinylové polymery, které byly použity pro kondenzaci DNA. (149) Další vinylové polymery připravili Caputo a kolektiv pro HIV DNA vakcínu inkorporovanou do NČ prostřednictvím elektrostatických interakcí, kdy vnitřní jádro bylo z poly(metyl methakrylátu) a vnější plášť z poly(2-(dimethyloktyl)amonium methyl methakrylát brom) a PEG. U myši došlo k významné specifické humorální a buněčné odezvy a zvýšení T buněk proti HIV. (150) Potencionální nevýhoda vinylových polymerů jako prakticky využitelných nosičů DNA jsou jejich uhlíkové řetězce, které nejsou biologicky rozložitelné. Zbývá proto prozkoumat možnost syntetizovat biologicky odbouratelné vinylové polymery. (115)

1.3.2.4 Anorganické NČ

Anorganické NČ byly široce zkoumány pro dodávání NA. Anorganické NČ mají obecně menší velikost než polymerní, lipidické nebo lipozomální NČ. Úzká distribuce velikosti a charakteristický povrch je vhodný pro konjugaci ligandu. (4, 141) Anorganické NČ vhodné pro konstrukci NA vakcín jsou zlaté NČ, mezoporézní NČ oxidu křemičitého, uhlíkové NČ a NČ fosforečnanu vápenatého.

Zlaté nanočástice jsou velmi stabilní anorganické NČ a vzbudily pozornost k jejich biomedicínským aplikacím při dodávání NA. Dále jsou široce používány ve výzkumu a vývoji pro jejich snadné chemické povrchové modifikace mnoha typy ligandů. Mají velmi dobře kontrolovatelnou velikost (2-150 nm) i tvar (nanosféry, kubické, tyčinky atd.). (4, 141, 151) Na obrázku 29 jsou uvedeny typy zlatých NČ a jejich široké využití například v terapii rakoviny, genové terapii a mnoha dalších odvětvích. (151)



Obrázek 29 Příklady zlatých NČ a jejich široké využití (151)

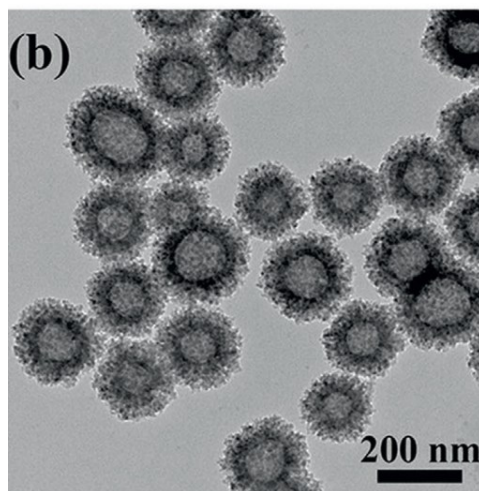
Mezi **výhody** zlatých NČ patří stabilita, upravitelný povrch a nízká toxicita. (141, 151) Mezi jejich **nevýhody** patří problémy s doručením NA. Bylo prokázáno, že zlaté NČ jsou schopné konjugace s ligandy a vytvoření komplexu s DNA vakcínou pro úspěšnou prevenci růstu nádoru. Stále není dostatek informací o tom, jak konjugované ligandy mohou ovlivnit farmakokinetiku, biodistribuci a jaké to může mít vedlejší účinky. Ukázalo se totiž, že kationtové ligandy zvyšují toxicitu. Další nevýhodou je, že nejsou biodegradovatelné. (151, 152)

Zlaté nanotyčinky byly použity ve výzkumu pro konstrukci vakcíny proti respiračnímu syncytiálnímu viru, nebo jako adjuvans pro HIV vakcínu. (4)

Větší zlaté NČ (10-16 nm) zůstávají v cytoplazmě, což je činí výhodnými nositeli pro RNA vakcíny, a menší (2-6 nm) mohou vstoupit do jádra, což je výhodné pro DNA vakcíny. (151) Subkutánní podávání DNA vakcíny proti melanomu u myši založené na zlaté NČ ukázalo dlouhotrvající protinádorovou imunitu. (4) Zlaté NČ se také ukázaly i jako vhodná adjuvancia do DNA vakcín. (3, 64)

Další typem anorganických NČ pro přenos NA vakcín či léčiv jsou **mezoporézní křemičité NČ** (153) Jejich velikost je v průměru od 100 nm do 250 nm a vážou se na NA pomocí slabých nekovalentních interakcí. (152) Jedná se o biologicky odbouratelné a chemicky stabilní nanostrukturní materiály s jedinečně velkou pórovitostí. Tato pórovitost nám umožňuje dostatečně velkou plochu pro chemickou modifikaci mezoporézní křemičité NČ a navázání léčiva eventuelně vakcíny. (154-

156) Mikroporézní mezoporézní křemičité NČ jsou typické pro dodávání malých NA (siRNA) a klasické mezoporézní pro větší množství NA např. pDNA a rychlejší rychlost uvolňování. (152) Povrch mezoporézní NČ může být modifikován již zmíněnými kationtovými molekulami jako jsou PEI, PAMAM a kationtovými lipidy za účelem adsorpce a doručení NA. (152) Na obrázku 30 je uveden snímek Transmisní elektronové mikroskopie mezoporézní křemičité NČ. (4)



Obrázek 30 mezoporézní křemičité NČ (Transmisní elektronová mikroskopie) (4)

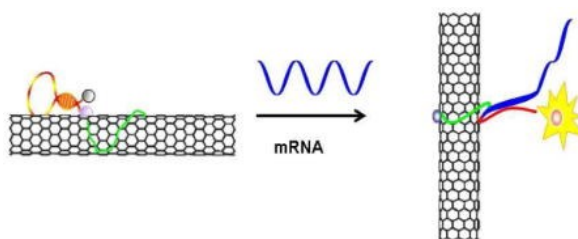
Mezoporézní křemičité NČ navrhují tak, aby napodobovaly virové částice akumulující se v APBs. Očkování myši s mezoporézní křemičitou NČ generovaly Ag specifické cytotoxické T buňky a humorální odpověď, která zvýšila protinádorovou účinnost a minimalizovala systémové šíření a snižování toxicity vyvolané vakcínou. Jedná se o pDNA vakcínu, která je navázána vně na mezoporézní křemičitou NČ, a to díky modifikaci kladným nábojem aminové skupiny. (4, 157)

Pokud jde o mezoporézní křemičité NČ je zde jeden hlavní problém, který je endozomální zachycení částic, což vede k nízké účinnosti cytoplazmatického doručení a snížený účinnosti NA. (4)

Vyšší imunitní odpověď se zjistila u pDNA vakcíny při porovnávání holé experimentální vakcíny pDNA a mRNA proti MERS-CoV. Dále se porovnávala holá mRNA a mRNA vázaná na MSNČ zde byla popsána vyšší imunitní odpověď u zformulované mRNA vakcíny než u holé mRNA vakcíny. Pro další možný vývoj

těchto nosičů je klíčové preklinické testování. Zatímco u pDNA s MSNČ nedošlo ke zlepšení imunitní odpovědi. (158)

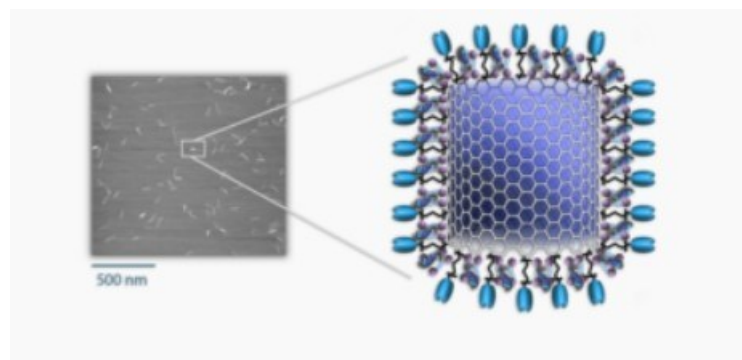
Uhlíkové NČ představují platformu pro dodání Ag, kde v rámci experimentálních vakcín můžeme vidět slibné výsledky. (4) Jsou známé pro svoji biokompatibilitu a mohou být připravovány do formy nanotrubiček a mezoporézních koulí. Průměr uhlíkových (karbonových) nanotubic (CNT) používaných jako nosiče je obecně 0,8-2 nm o délce 100-200 nm, přičemž velikost mezoporézních uhlíkových koulí je kolem 500nm. (64,159) Na obrázku 31 je schématicky znázorněná mRNA navázaná na CNT.



Obrázek 31 CNT s navázanou mRNA (160)

Mezoporézní uhlíkové NČ byly studovány hlavně pro orální aplikaci vakcín. (64, 159) V rámci testování holé DNA vakcíny a CNT-DNA vakcíny u očkování ryb. Byly u ryb s CNT-DNA sledována vyšší produkce sérových protilátek, enzymové aktivity a imunitně související genová exprese. (161)

Jsou také studie o preklinických zkouškách mRNA vakcínách založených na CNT proti HIV. Luna Labs vyvíjí platformu pro dodávání krátkých CNT NanoVac, která dokáže účinně doručit mRNA se zanedbatelnou toxicitou. Obecná struktura CNT je uvedena na obrázku 32. (162,163) Povrch NanoVac byl optimalizován tak, aby řídil hustotu a prezentaci Ag/mRNA pomocí PEI. Bylo navrženo několik formulací pro intramuskulární i intranazální podávání. NanoVac prokázal imunogenicitu u králíků a vyvolal buněčné a humorální reakce u humanizovaných myší. Až 33 % humanizovaných myší infikovaných HIV-1 bylo zbaveno virové infekce do 8 týdnů po infekci. Nakonec NanoVac stabilizoval mRNA proti degradaci v chladničce po dobu alespoň tří měsíců, čímž se snížila zátěž pro uchovávání CNT. V budoucnu budou pokračovat studie toxicity se zvláštním zaměřením na intranazální formulace NanoVac. (162) Na obrázku 32 je uveden systém NanoVac.



Obrázek 32 systém NanoVac (162)

NČ fosforečnanu vápenatého lze vytvořit kombinací chloridu vápenatého, hydrogenfosforečnanu sodného a citrátu sodného za specifických podmínek nízké teploty a průměrné velikosti částic větších než 1,2 μm . (64, 164) Jsou netoxické a mohou se tvořit do velikosti od 50nm do 100nm. Tyto NČ jsou užitečnými adjuvans pro DNA vakcíny a slizniční imunitu a vykazují vnikající biokompatibilitu. (64) Hlavními nevýhodami je drahá výroba a slabá interakce s Ag. (165)

U DNA vakcín proti rakovině byly NČ fosforečnanu vápenatého v preklinických studiích kombinovány s adenositrifosfátem jako efektivní systém dodávání NA. (166) Jsou také zmínky v preklinických studiích na myších o využití těchto NČ u mRNA a siRNA vakcín proti rakovině. (165)

Studie proveditelnosti tzv. proof-of-concept u anorganických NČ nutně naznačují, že je zapotřebí další optimalizace anorganických NČ pro poměry NA/ligandů. Dále je důležité testování na větších zvířatech, klinické zkoušky a zlepšování designu pro budoucí škálovatelnost. (4) Postupně anorganické NČ také nacházejí více využití v DNA/mRNA nosičových systémech. (64)

Závěr

V práci byl uveden základní přehled vakcín založených na nukleových kyselinách a jejich nosičů v podobě virových a nevirových vektorů. Bylo prokázáno, že je nutné se zajímat o tyto nosičové systémy pro možné další využívání těchto vakcín, a to hlavně kvůli bezpečnému doručení do cytoplazmy potažmo jádra. Byl zjištěn velký význam ve využití nanočásticových systému oproti virovým vektorům z pohledu lepší bezpečnosti a velkého množství typů těchto systémů.

V rámci lipidických nanočásticových systémů bylo zmíněno klíčové používání kationtových lipidů do jejich struktury pro lepší inkorporaci nukleových kyselin. Byly popsány lipozomální nanočástice, nanoemulze, pevné lipidické částice, avšak poslední studie naznačují, že výzkum spíše směřuje k využívání specifických hybridních lipidických nanočásticových systémů jako vektorů pro nukleové kyseliny.

U peptidických nanočásticových systémů byly popsány peptidy penetrující buňku, protaminy, polypeptidy a virus like particles, Stejně jako u lipidických systémů byla prokázána důležitost hybridních nanočásticových systémů.

Polymerní nanočásticové systémy byly rozděleny na přírodní a syntetické. U přírodních byla diskutována hlavně činnost mukoadhezivního polysacharidu chitosanu a včetně jeho srovnání s ostatními biopolymerů. U syntetických byl zmíněn zlatý standart polyethylenimin a dále bylo zjištěno u dendrimerů, že kvůli nedostačujícím údajům *in vivo* je pozastaven jejich vývoj.

Bylo popsán zvyšující se zájem o anorganické nanočástice, které jsou aktuálně horkým tématem v rámci nosičových systémů pro vakcíny založených na nukleových kyselinách. Byly popsány zlaté nanočástice, mezoporézní křemičité nanočástice, uhlíkové nanočástice a nanočástice fosforečnanu vápenatého.

Na závěr této práce je třeba zdůraznit, že nanočásticové systémy založených na nukleových kyselinách jsou v současné vědecké komunitě jedním z nejstudovanějších témat a v následujících letech se dá očekávat dynamický rozvoj v této oblasti. Největší potenciál spatřuji ve výzkumu hybridních materiálů a u anorganických nanočásticových systémů pro rozvoj moderních vakcín.

Použitá literatura

1. KHAN, Kishwar Hayat. DNA vaccines: roles against diseases. *GERMS*. zařadit CPPs, protaminy, polypeptidy a VLP. 2013;3(1):26-35. Dostupné z: <https://doi.org/10.11599/germs.2013.1034> [cit. 2024-05-06].
2. DELANY, Isabel; RAPPUOLI, Rino a GREGORIO, Ennio De. Vaccines for the 21st century. Online. *EMBO Molecular Medicine*, 2014, roč. 2014, č. 6(6), s. 708-720. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/emmm.201403876>. [cit. 2024-08-7].
3. PATI, Rashmirekha; SHEVTSOV, Maxim a SONAWANE, Avinash. Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases. Online. *Frontiers in Immunology*. 2018, roč. 2018, č. 9, s. 2224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02224>. [cit. 2024-08-07].
4. HO, William, GAO, Mingzhu, LI, Fengqiao, et al. Next-Generation Vaccines: Nanoparticle-Mediated DNA and mRNA Delivery. Online. *Advanced healthcare materials*. Roč. 2021, č. 2001812, s. 1-17. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adhm.202001812>. [cit. 2024-05-06].
5. VETER, Volker, DENIZER, Gulhan, FRIEDLAND, Leonard R., et al. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. Online. *Annals of Medicine*. Roč. 2018, č. 50(2), s. 110-120. Dostupné z: [10.1080/07853890.2017.1407035](https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1407035). [cit. 2024-05-06].
6. COSTANZO, Vincenzo a ROVIELLO, Giovanni N. The Potential Role of Vaccines in Preventing Antimicrobial Resistance (AMR): An Update and Future Perspectives. Online. *Vaccines (Basel)*. 2023, roč. 2023, č. 11(2), s. 333. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/vaccines11020333>. [cit. 2024-06-07].
7. ZHANG, Gang, TANG, Tianyu, CHEN, Yinfeng, et al. mRNA vaccines in disease prevention and treatment. Online. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023, roč. 2023, č. 365, s. 8. Dostupné z: <https://doi.org/doi.org/10.1038/s41392-023-01579-1>. [cit. 2024-06-07].
8. GERSHON, Anne A, GERSHON, Michael D. Widespread Use of Varicella Vaccine Does Not Reduce Immunity to Zoster of Others. Online.

- The Journal of Infectious Diseases*. Roč. 2022, č.225(3), s.361-363. Dostupné z: 10.1093/infdis/jiab501.. [cit. 2024-05-06].
9. PLOTKIN, Stanley. History of vaccination. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Roč. 2014, č. 111 (34), s. 12283-12287. Dostupné z: 10.1073/pnas.1400472111. [cit. 2024-05-06].
 10. VETER, Volker, DENIZER, Gulhan, FRIEDLAND, Leonard R., et al. Vaccines and vaccination: history and emerging issues. Online. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. Roč. 2021, č. 17(12), s. 5255-5268. Dostupné z: 10.1080/21645515.2021.1977057. [cit. 2024-05-06].
 11. TAHAMTAN, Alireza, CHAROSTAD, Javad, HOSEINI SHOKOUH, Seyyed Javad et al. An Overview of History, Evolution, and Manufacturing of Various Generations of Vaccines. Online. *J Arch Mil Med*. Roč. 2017, č. 5(3), s. e12315. Dostupné z: 10.5812/jamm.12315. [cit. 2024-05-06].
 12. JÍLEK, Petr. *Základy imunologie. 2.*, přeprac. vyd. Praha: Anyway, 2008. ISBN 978-80-254-2422-3. s.8–9
 13. SCHAT, Karel A. a XING, Zheng. Specific and nonspecific immune responses to Marek's disease virus. Online. *Developmental & Comparative Immunology*. 2000, roč. 2000, č. 24, s. 201-221. Dostupné z: [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00073-7](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00073-7). [cit. 2024-06-07].
 14. URBÁNKOVÁ RATHOUSKÁ, Jana a JÍLEK, Petr. *Imunofarmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2024. ISBN isbn978-80-271-3849-4.s.111
 15. JÍLEK, Petr. *Základy imunologie. 2.*, přeprac. vyd. Praha: Anyway, 2008. ISBN 978-80-254-2422-3. s.25
 16. JÍLEK, Petr. *Základy imunologie. 2.*, přeprac. vyd. Praha: Anyway, 2008. ISBN 978-80-254-2422-3. s.26
 17. HOŘEJŠÍ, Václav a BARTŮŇKOVÁ, Jiřina. *Základy imunologie. 4. vyd.* Praha: Triton, 2009. ISBN isbn978-80-7387-280-9. s.24
 18. CHAPEL, Helen, HAENEY, Mansel, MISBAH, Siraj A. a SNOWDEN, Neil. *Základy klinické imunologie: 6. vydání*. Přeložil Vojtěch THON. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, [2018]. ISBN isbn978-80-7553-396-8.p.22-23

19. HOŘEJŠÍ, Václav, BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, BRDIČKA, Tomáš et al. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.s.279
20. JÍLEK, Petr. *Základy imunologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Anyway, 2008. ISBN 978-80-254-2422-3. s.49
21. ABBAS, Abul K., LICHTMAN, Andrew H. a PILLAI, Shiv. *Basic immunology Function and disorders of the immune system*: 7. vydání. Philadelphia: Elsevier, 2024. ISBN 978-0-443-10519-7. s. 144-148
22. URBÁNKOVÁ RATHOUSKÁ, Jana a JÍLEK, Petr. *Imunofarmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2024. ISBN 978-80-271-3849-4.p.116
23. STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV. *COVID-19: reinfekce*. Online. 2022, 29. 8. 2022. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1064-covid-19-reinfekce>. [cit. 2024-06-11].
24. RATHOUSKÁ, Jana, Asistent profesora Katedry Biologických a Lékařských věd, *Očkování*. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, 20. března 2023 (přednáška)
25. URBÁNKOVÁ RATHOUSKÁ, Jana a JÍLEK, Petr. *Imunofarmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2024. ISBN 978-80-271-3849-4.s.118
26. HOŘEJŠÍ, Václav, BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, BRDIČKA, Tomáš, et al. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.s.234
27. CHAPEL, Helen, HAENEY, Mansel, MISBAH, Siraj A., et al. *Základy klinické imunologie*: 6. vydání. Přeložil Vojtěch THON. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, [2018]. ISBN 978-80-7553-396-8.s.143
28. URBÁNKOVÁ RATHOUSKÁ, Jana a JÍLEK, Petr. *Imunofarmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2024. ISBN 978-80-271-3849-4.s.112
29. MEDICAL TRIBUNE. *Výhody genetických vakcín oproti „klasickým“*. Online. 2021. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/archiv/vyhody-genetickych-vakcin-oproti-klasickym/>. [cit. 2024-05-07].
30. ABBAS, Abul K., LICHTMAN, Andrew H. a PILLAI, Shiv. *Basic immunology Function and disorders of the immune system*: 7. vydání. Philadelphia: Elsevier, 2024. ISBN 978-0-443-10519-7. s. 184-185

31. GHAFFARIFAR, Fatemeh Plasmid DNA vaccines: Where are we now? Online. *Drugs Today (Barc)* 2018, 54(5): 315-33 Dostupné z DOI: 10.1358/dot.2018.54.5.2807864
32. FRANK, Christopher O., FANSLAU, Luis a POPOV, Andrea. Bistrovic. Biopolymer-based Carriers for DNA Vaccine Design. Online. *Angewandte Chemie International Edition Volume*. Roč. 2021, č. 60(24), s. 13225-13243. Dostupné z: doi.org/10.1002/anie.202010282. [cit. 2024-05-07]
33. URBÁNKOVÁ RATHOUSKÁ, Jana a JÍLEK, Petr. *Imunofarmakologie*. Praha: Grada Publishing, 2024. ISBN isbn978-80-271-3849-4. s. 113
34. HOKELLO, Joseph, SHARMA, Adhikarimayum Lakhikumar a TYAGI, Mudit. An Update on the HIV DNA Vaccine Strategy. Online. *Vaccines*. 2021, roč. 2021, č. 9(6), s. 605. Dostupné z: <https://doi.org/doi.org/10.3390/vaccines9060605>. [cit. 2024-06-13].
35. LEE, Jihui, KUMAR, Shreedevi Arun, JHAN, Yong Yu, et al. Engineering DNA vaccines against infectious diseases. Online. *Acta Biomaterialia*. Roč. 2018, č. 80, s. 31-47. Dostupné z: [10.1016/j.actbio.2018.08.033](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.033). [cit. 2024-05-07]
36. LU, Bowen, LIM, Jing Ming, YU, Boyue, et al. The next-generation DNA vaccine platforms and delivery systems: advances, challenges and prospects. Online. *Frontiers in Immunology*. 2024, roč. 2024, č. 15, s. 1-24. Dostupné z: <https://doi.org/doi.org/10.3389/fimmu.2024.1332939>. [cit. 2024-06-13].
37. RICE, Jason; OTTENSMEIER, Christian H a STEVENSON, Freda K. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. Online. *Nat Rev Cancer*. 2008, roč. 2008, č. 8(2), s. 108-20. Dostupné z: 10.1038/nrc2326. [cit. 2024-06-13].
38. CAO, Yi, HAYASH, Clifford T. H., ZAVALA, Fidel, et al. Effective Functional Immunogenicity of a DNA Vaccine Combination Delivered via In Vivo Electroporation Targeting Malaria Infection and Transmission. Online. *Vaccines (Basel)*. 2022, roč. 2022, č. 10(7), s. 1134. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/vaccines10071134>. [cit. 2024-06-13].

39. WERNINGHAUS, Ina Charlotta, HINKE, Daniëla Maria, FOSSUM, Even, et al. Neuraminidase delivered as an APB-targeted DNA vaccine induces protective antibodies against influenza. Online. *Original article*. 2023, roč. 2023, č. 31(7), s. 2188-2205. Dostupné z: <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.03.012>. [cit. 2024-06-13].
40. ULMER, Jeffrey B., MASON, Peter W., GEALL, Andrew, et al. RNA-based vaccines. Online. *Vaccine*. Roč. 2012, č. 30, s. 4414-4418. Dostupné z: [10.1016/j.vaccine.2012.04.060](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.060). [cit. 2024-05-07].
41. VERBEKE, Rein, LENTACKER, Ine, SMEDT, Stefaan c. De, et al. Three decades of messenger RNA vaccine development. Online. *Nano Today*. Roč. 2019, č. 28, s. 1748-0132. Dostupné z: [10.1016/j.nantod.2019.100766](https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.100766) 1748-0132. [cit. 2024-05-07].
42. GEALL, Andrew J.; MANDL, Christian W. a ULMER, Jeffrey B. RNA: The new revolution in nucleic acid vaccines. Online. *Seminars in Immunology*. 2013, roč. 2013, č. 25(2), s. 152-159. Dostupné z: doi.org/10.1016/j.smim.2013.05.001. [cit. 2024-06-13].
43. LIU, Margaret A. A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. Online. *Vaccines (Basel)*. Roč. 2019, č. 7(2), s. 37. Dostupné z: [10.3390/vaccines7020037](https://doi.org/10.3390/vaccines7020037). [cit. 2024-05-07].
44. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. Online. *Nature Reviews Immunology*. Roč. 2021, č. 21, s. 195-197. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00526-x>. [cit. 2024-05-08]
45. SÚKL. *Vakcína Comirnaty od firem Pfizer a BioNTech získala podmínečnou registraci*. Online. 2020. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/sukl/evropska-agentura-pro-lecive-pripravky-doporucila-udelit-1>. [cit. 2024-05-08]
46. WANG, Yang, ZHANG, Ziqi, LUO, Jingwen, et al. MRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. Online. *Molecular cancer*. Roč. 2021, č. 20(33), s. 13-23. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01311-z>. [cit. 2024-05-08].

47. TAN, Lu a SUN, Xun. Recent advances in mRNA vaccine delivery. Online. *Nano research*. Roč. 2018, č. 11(10), s. 5338-5354. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2091-z>. [cit. 2024-05-08].
48. ARYAL, Sagar. *Vector – Definition, Features, Types, Examples, Applications, Limitations*. Online. 2022. Dostupné z: <https://microbenotes.com/vector-molecular-biology/>. [cit. 2024-05-08].
49. QIN, Yuyang, OU, Liyuan, ZHA, Lili, et al. Delivery of nucleic acids using nanomaterials. Online. *Molecular Biomedicine*. 2023, roč. 2023, č. 4(48), s. 1-25. Dostupné z: <https://doi.org/doi.org/10.1186/s43556-023-00160-0>. [cit. 2024-06-17].
50. DOGBEY, Dennis Makafui, TORRES, Valeria Esperanza Sandoval, FAJEMISIN, Emmanuel, et al. Technological advances in the use of viral and non-viral vectors for delivering genetic and non-genetic cargos for cancer therapy. Online. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 2023, roč. 2023, č. 13, s. 2719–2738. Dostupné z: <https://doi.org/doi.org/10.1007/s13346-023-01362-3>. [cit. 2024-06-17].
51. GARCÍA-ÁLVAREZ, Rafaela a VALLET-REGÍ, María. Bacteria and cells as alternative nano-carriers for biomedical applications. Online. *Expert Opin Drug Deliv.* Roč. 2022, č. 1, s. 103-118. Dostupné z: [10.1080/17425247.2022.2029844](https://doi.org/10.1080/17425247.2022.2029844). [cit. 2024-05-08].
52. HOŘEJŠÍ, Václav, BARTUŇKOVÁ, Jiřina, BRDIČKA, Tomáš, et al. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3. s.199
53. HOWARTH, Joanna L., LEE, Youn Bok, UNEY, James B. Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). Online. *Cell Biol Toxicol.* 2009, roč. 2010, č. 26(1), s. 1-20. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10565-009-9139-5>. [cit. 2024-07-08].
54. SASSO, Emanuele, D'ALISE, Anna Morena a ZAMBRANO, Nicola, et al. New viral vectors for infectious diseases and cancer. Online. *Seminars in Immunology*. 2020, roč. 2020, č. 50, s. 101430. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101430>. [cit. 2024-07-08].

55. MOSS, Bernard. Membrane fusion during poxvirus entry. Online. *Semin Cell Dev Biol.* 2016, roč. 2017, č. 60, s. 89-96. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.015>. [cit. 2024-07-08].
56. ROLLIER, Christine S, REYES-SANDOVAL, Arturo, COTTINGHAM, Matthew G, et al. Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. Online. *Current Opinion in Immunology.* 2011, roč. 2011, č. 23 (3), s. 377-382. Dostupné z: <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.coi.2011.03.006>. [cit. 2024-07-08].
57. HANKE, Tomáš. New vector and vaccine platforms: mRNA, DNA, viral vectors. Online. *Current Opinion in HIV and AIDS.* 2022, roč. 2022, č. 17(6), s. 338-344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000763>. [cit. 2024-07-08].
58. DENG, Shaofeng, LIANG, Hui, CHEN, Pin, et al. Viral Vector Vaccine Development and Application during the COVID-19 Pandemic. Online. *Microorganisms.* Roč. 2022, č. 10(7), s. 1450. Dostupné z: [10.3390/microorganisms10071450](https://doi.org/10.3390/microorganisms10071450). [cit. 2024-05-08].
59. *Vectors: Tools for Gene Delivery.* Online. 2020. Dostupné z: <https://www.thegenehome.com/how-does-gene-therapy-work/vectors>. [cit. 2024-07-11].
60. JARVIE, Helen, KING, Stephen, a DOBSON, Peter. Nanoparticle. Online. *Encyclopedia Britannica.* Roč. 2024. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/nanoparticle..> [cit. 2024-05-08]
61. OLIVEIRA, Paulo F. M. de, TORRESI, Roberto M., EMMERLING, Franziska, et al. Challenges and opportunities in the bottom-up mechanochemical synthesis of noble metal nanoparticles. Online. *Journal of Materials Chemistry A.* Roč. 2020, č. 8, s. 16114-16141. Dostupné z: [10.1039/D0TA05183G](https://doi.org/10.1039/D0TA05183G). [cit. 2024-05-08]
62. ANSELMO, Aaron C. a MITRAGOTRI, Samir. Nanoparticles in the clinic. Online. *Bioengineering & Translational Medicine.* Roč. 2016, č. 1, s. 10-29. Dostupné z: [10.1002/btm2.10003](https://doi.org/10.1002/btm2.10003). [cit. 2024-05-08].
63. SHAH, Muhammad Ali A; HE, Nongyue a LI, Zhiyang, et al. Nanoparticles for DNA vaccine delivery. Online. *J Biomed Nanotechnol.*

- 2014, roč. 2014, č. 10(9), s. 2332-49. Dostupné z: 10.1166/jbn.2014.1981. [cit. 2024-07-11].
64. ZHAO, Liang, SETH, Arjun, WIBOWO, Nani et al. Nanoparticle vaccines. Online. *Vaccine*. Roč. 2014, č. 32, s. 327-337. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>. [cit. 2024-05-08].
65. ZHU, Motao, WANG, Rongfu a NIE, Guangjun. Applications of nanomaterials as vaccine adjuvants. Online. *Hum Vaccin Immunother*. 2014, roč. 2014, č. 10(9), s. 2761-2774. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/hv.29589>. [cit. 2024-07-11].
66. KIM, Tae Kyung a EBERWINE, James H. Bacteria and cells as alternative nano-carriers for biomedical applications. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Roč. 2010, č. 397, s. 3173–3178. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>. [cit. 2024-05-08].
67. SHIN, Matthew D., SHUKLA, Sourabh, CHUNG, Young Hun, et al. COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward. Online. *Nature Nanotechnology*. 2020, roč. 2020, č. 15, s. 646-655. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41565-020-0737-y>. [cit. 2024-07-12].
68. LIU, Ji, CHANG, Jin, JIANG, Ying, et al. Fast and Efficient CRISPR/Cas9 Genome Editing In Vivo Enabled by Bioreducible Lipid and Messenger RNA Nanoparticles. Online. *Advanced materials*. 2019, roč. 2019, č. 31 (33), s. 1902575. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adma.201902575>. [cit. 2024-07-12].
69. MEHTA, Meenu, BUI, Thuy Anh, YANG, XiNČu, et al. Lipid-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery: An Overview of the Production Techniques and Difficulties Encountered in Their Industrial Development. Online. *ACS Mater. Au*. Roč. 2023, č. 3(6), s. 600-619. Dostupné z: 10.1021/acsmaterialsau.3c00032. [cit. 2024-05-09].
70. RAMISHETTI, Srinivas, HAZAN-HALEVY, Inbal, PALAKURI, Ramesh, et al. A Combinatorial Library of Lipid Nanoparticles for RNA Delivery to Leukocytes. Online. *Advanced materials*. 2020, roč. 2020, č.

- 32 (12), s. 1906128. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adma.201906128>. [cit. 2024-07-12].
71. SAMARIDOU, Eleni; HEYES, James a LUTWYCHE, Peter. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. Online. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020, roč. 2020, č. 154-155, s. 37-63. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.002>. [cit. 2024-07-12].
72. SERCOMBE, Lisa, VEERATI, Tejaswi, MOHEIMANI, Fatemeh, et al. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. Online. *Frontiers in Pharmacology.* 2015, roč. 2015, č. 6, s. 286. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>. [cit. 2024-07-12].
73. LOU, Gustavo, ANDERLUZZI, Giulia, SCHMIDT, Signe Tandrup, et al. Delivery of self-amplifying mRNA vaccines by cationic lipid nanoparticles: The impact of cationic lipid selection. Online. *Journal of Controlled Release.* 2020, roč. 2020, č. 325, s. 370-379. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.027>. [cit. 2024-07-12].
74. SAYOUR, Elias J., MENDEZ-GOMEZ, Hector R., a MITCHELL, Duane A. Cancer Vaccine Immunotherapy with RNA-Loaded Liposomes. Online. *International journal of molecular science.* Roč. 2018, č. 19, s. 2890. Dostupné z: [10.3390/ijms19102890](https://doi.org/10.3390/ijms19102890). [cit. 2024-05-09].
75. FANCA, H, SIMÕES, S a LIMA, M C Pedrosa de. Evaluation of lipid-based reagents to mediate intracellular gene delivery. Online. *Biochim Biophys Acta.* 2002, roč. 2002, č. 1567(1-2), s. 23-33. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00545-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00545-x). [cit. 2024-07-12].
76. SIMBERG, Dmitri, WEISMAN, Sarah, TALMON, Yeshayahu, et al. DOTAP (and other cationic lipids): chemistry, biophysics, and transfection. Online. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2004, roč. 2004, č. 21(4), s. 257-317. Dostupné z: <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v21.i4.10>. [cit. 2024-07-12].
77. ZHI, DeFu, ZHANG, ShuBiao, WANG, Bing, et al. Transfection Efficiency of Cationic Lipids with Different Hydrophobic Domains in Gene Delivery. Online. *Bioconjugate Chem.* 2010, roč. 2010, č. 21(4), s.

- 563–577. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bc900393r>. [cit. 2024-07-12].
78. LUO, Ying-Li, XU, Cong-Fei, LI, Hong-Jun, et al. Macrophage-Specific in Vivo Gene Editing Using Cationic Lipid-Assisted Polymeric Nanoparticles. Online. *ACS Nano*. 2018, roč. 2018, č. 12(2), s. 994-1005. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07874>. [cit. 2024-07-12].
79. FAN, Ya-Nan, LI, Min, LUO, Ying-Li, et al. Cationic lipid-assisted nanoparticles for delivery of mRNA cancer vaccine. Online. *Biomaterials science*. 2018, roč. 2018, č. 11, s. 3009–3018. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/C8BM00908B>. [cit. 2024-07-12].
80. TANG, Bo, QIAN, Yu, a FANG, Guihua. Development of Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles for Improving Oral Absorption of Enoxaparin. Online. *Pharmaceutics*. 2020, roč. 2020, č. 12(7), s. 607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070607>. [cit. 2024-07-12].
81. OBERLI, Matthias A, REICHMUTH, Andreas M, DORKIN, J Robert, et al. Lipid Nanoparticle Assisted mRNA Delivery for Potent Cancer Immunotherapy. Online. *Nano Lett*. 2016, roč. 2017, č. 17(3), s. 1326-1335. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b03329>. [cit. 2024-07-12].
82. GIDDAM, Ashwini Kumar, ZAMAN, Mehruz, SKWARCZYNSKI, Mariusz, et al. Liposome-Based Delivery System for Vaccine Candidates: Constructing An Effective Formulation. Online. *Nanomedicine*. 2012, roč. 2012, č. 7(12), s. 1877–1893. Dostupné z: <https://doi.org/10.2217/nnm.12.157>. [cit. 2024-07-12].
83. LI, S a HUANG, L. In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid–protamine–DNA (LPD) complexes. Online. *Gene Therapy*. 1997, roč. 1997, č. 4, s. 891-900. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300482>. [cit. 2024-07-12].
84. WATSON, Douglas S., ENDSLEY, Aaron N. a HUANG, Leaf. Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. Online. *Vaccine*. 2012, roč. 2012, č. 30(13), s. 2256-2272.

- Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.070>. [cit. 2024-07-12].
85. GREGORIADIS, Gregory. Liposomes and mRNA: Two technologies together create a COVID-19 vaccine. Online. *Med Drug Discov.* 2021, roč. 2021, s. 100104. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2021.100104>. [cit. 2024-07-12].
86. TENCHOV, Rumiana, BIRD, Robert, CURTZE, Allison E, et al. Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. Online. *ACS Nano.* 2021, roč. 2021, č. 15(11), s. 16982-17015. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>. [cit. 2024-07-12].
87. PERSANO, Stefano, GUEVARA, Maria L., LI, Zhaoqi, et al. Lipopolyplex potentiates anti-tumor immunity of mRNA-based vaccination. Online. *Biomaterials.* Roč. 2017, č. 125, s. 81-89. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.019>. [cit. 2024-05-09].
88. REZAEI, Mehdi, OSKUEE, Reza Kazemi, NASSIRLI, Hooriyeh, et al. Progress in the development of lipopolyplexes as efficient non-viral gene delivery systems. Online. *Journal of Controlled Release.* 2016, roč. 2016, č. 236, s. 1-14. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.023>
89. CHEN, Wei, LI, Huh, LIU, Zhenguo, et al. Lipopolyplex for Therapeutic Gene Delivery and its Application for the treatment of Parkinson's Disease. Online. *Frontiers in Aging Neuroscience.* Roč. 2016, č. 8. Dostupné z: [10.3389/fnagi.2016.00068](https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00068). [cit. 2024-05-10].
90. ASWATHANARAYAN, Jamuna Bai a VITTAL, Ravishankar Rai. Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. Online. *Frontiers in Sustainable food systems.* 2019, roč. 2019, č. 3, s. 95. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00095>. [cit. 2024-07-12].
91. BRITO, Luis A, CHAN, Michelle, SHAW, Christine A, et al. A Cationic Nanoemulsion for the Delivery of Next-generation RNA Vaccines. Online. *Molecular Therapy.* Roč. 2014, č. 22(12), s. 2890. Dostupné z: www.moleculartherapy.org. [cit. 2024-05-09]

92. *Cationic Nanoemulsion*. Online. Creative-biolabs. 2024. Dostupné z: <https://mrna.creative-biolabs.com/cationic-nanoemulsion.htm>. [cit. 2024-07-16].
93. KAUFFMAN, Kevin J., WEBBER, Matthew J. a ANDERSON, Daniel G. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. Online. *Journal of Controlled Release*. Roč. 2016, č. 240, s. 227-234. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.032> 0168-3659. [cit. 2024-05-11].
94. TSAI, Theodore F. Fluad® -MF59® -Adjuvanted Influenza Vaccine in Older Adults. Online. *Infection & Chemotherapy*. Roč. 2013, č. 45(2), s. 159-174. Dostupné z: <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.2.159>. [cit. 2024-05-09].
95. CHOI, Woo-Jeong, KIM, Jin-Ki, CHOI, Sung-Hee, et al. Low toxicity of cationic lipid-based emulsion for gene transfer. Online. *BIOMATERIALS*. 2004, roč. 2004, č. 25(27), s. 5893-5903. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.031>. [cit. 2024-07-16].
96. POLCHI, Alice, CHOI, Sung-Hee, MAZURYK, Jaroslaw, et al. Rapamycin Loaded Solid Lipid Nanoparticles as a New Tool to Deliver mTOR Inhibitors: Formulation and in Vitro Characterization. Online. *Nanomaterials*. 2016, roč. 2016, č. 6(5), s. 87. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nano6050087>. [cit. 2024-07-16].
97. SHAH, Rohan M., MATA, Jitendra P., BRYANT, Gary, et al. Structure Analysis of Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: A Combined USANS/SANS Study. Online. *Particle*. 2018, roč. 2019, č. 36(1), s. 1800359. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ppsc.201800359>.
98. PURI, Anu, LOOMIS, Kristin, SMITH, Brandon, et al. Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. Online. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2009, roč. 2009, č. 26(6), s. 523-580. Dostupné z: <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v26.i6.10>. [cit. 2024-07-16].

99. GESZKE-MORITZ, Małgorzata a MORITZ, Michał. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. Online. *Materials Science and Engineering: C*. 2016, roč. 2016, č. 68, s. 982-994. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.119>.
100. MONTOTO, Sebastián Scioli, MURACA, Giuliana a RUIZ, María Esperanza. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. Online. *Frontiers in Molecular bioscience*. Roč. 2020, č. 7, s. 587997. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.587997>. [cit. 2024-05-09].
101. RAZA, Kaiser, SINGH, Bhupinder, SINGAL, Parteek, et al. Systematically optimized biocompatible isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) for topical treatment of acne. Online. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013, roč. 2013, č. 105, s. 67-74. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.043>.
102. POZO-RODRÍGUEZ, Ana del, DELGADO, Diego, SOLINÍS, Maria Ángeles, et al. Solid lipid nanoparticles as potential tools for gene therapy: In vivo protein expression after intravenous administration. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, roč. 2010, č. 385, s. 157-162. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.020>.
103. LOBOVKINA, Tatsiana, JACOBSON, Gunilla B., GONZALEZ-GONZALEZ, Emilio, et al. In Vivo Sustained Release of siRNA from Solid Lipid Nanoparticles. Online. *ACS Nano*. 2011, roč. 2011, č. 5(12), s. 9977–9983. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/nn203745n>.
104. IZZA, Ni'matul, SUGA, Keishi, OKAMOTO, Yukihiro, et al. Systematic Characterization of Nanostructured Lipid Carriers from Cetyl Palmitate/Caprylic Triglyceride/Tween 80 Mixtures in an Aqueous Environment. Online. *Langmuir*. 2021, roč. 2021, č. 37(14), s. 4284–4293. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00270>

105. CHAUHAN, Iti, YASIR, Mohd, VERMA, Madhu, et al. Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery. Online. *Adv Pharm Bull.* 2020, roč. 2020, č. 10(2), s. 150-165. Dostupné z: <https://doi.org/10.34172/apb.2020.021>.
106. MEHNERT, Wolfgang a MÄDER, Karsten. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2001, roč. 2001, č. 47(2-3), s. 165-196. Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00105-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00105-3).
107. BADEN, Lindsey R., SAHLY, Hana M. El, ESSINK, Brandon, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. Online. *The New England Journal of Medicine.* 2021, roč. 2021, č. 384(5), s. 403-416. Dostupné z: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>.
108. POLACK, Fernando P., THOMAS, Stephen J., KITCHIN, Nicholas, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. Online. *The New England Journal of Medicine.* 2020, roč. 2020, č. 383(27), s. 2603-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>.
109. HADINOTO, Kunn, SUNDARESAN, Ajitha a CHEOW, Wean Sin. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. Online. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2013, roč. 2013, č. 85(3), s. 427-443. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.002>.
110. LI, Zhongyu, ZHANG, Xue-Qing, HO, William, et al. Lipid-Polymer Hybrid "Particle-in-Particle" Nanostructure Gene Delivery Platform Explored for Lyophilizable DNA and mRNA COVID-19 Vaccines. Online. *Advanced functional materials.* Roč. 2022, č. 32(40), s. 2204462. Dostupné z: [10.1002/adfm.202204462](https://doi.org/10.1002/adfm.202204462). [cit. 2024-05-09].
111. LI, Weidang, JOSHI, Medha D., SINGHANIA, Smita, et al. Peptide Vaccine: Progress and Challenges. Online. *Vaccines (Basel).* 2014, roč. 2014, č. 2(3), s. 515-536. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/vaccines2030515>. [cit. 2024-07-18].
112. GRAU, Morgan, WALKER, Paul R. a DEROUAZI, Madiha. Mechanistic insights into the efficacy of cell penetrating peptide-based

- cancer vaccines. Online. *Cell Mol Life Sciences*. 2018, roč. 2018, č. 75(16), s. 287-2896. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2785-0>. [cit. 2024-07-18].
113. SOMVANSHI, Pranjali a KHISTRY, Shefali. Peptide-based DNA delivery system. Online. *Medicine in Novel Technology and Devices*. 2021, roč. 2021, č. 11, s. 100091. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.medntd.2021.100091>. [cit. 2024-07-18].
114. LEHTO, Taavi, EZZAT, Kariem, WOOD, Matthew J.A, et al. Peptides for nucleic acid delivery. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, roč. 2016, č. 106, s. 172-182. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.008>. [cit. 2024-07-18].
115. ZHANG, Mingming, HONG, Yanhang, CHEN, Wenjuan, et al. Polymers for DNA Vaccine Delivery. Online. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. Roč. 2017, č. 3, s. 108-125. Dostupné z: [10.1021/acsbomaterials.6b00418](https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.6b00418). [cit. 2024-05-10].
116. MANDHANE, Apurva, TRIPATHY, Chandra Sekhar a BEHERA, Santosh Kumar. Chapter 9 - Peptide and protein in vaccine delivery. Online. *Peptide and Protein Drug Delivery Using Polysaccharides*. 2024, roč. 2024, č. 1, s. 217-234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18925-8.00011-8>. [cit. 2024-07-18].
117. TAYLOR, Rebecca E. a ZAHID, Maliha. Cell Penetrating Peptides, Novel Vectors for Gene Therapy. Online. *Pharmaceutics*. 2020, roč. 2020, č. 12(3), s. 225. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030225>. [cit. 2024-07-18].
118. HASANNEJAD-ASL, Behnam, POORESMAEIL, Farkhondeh, TAKAMOLI, Shahla, et al. Cell penetrating peptide: A potent delivery system in vaccine development. Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2022, roč. 2022, č. 13, s. 1072685. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1072685>. [cit. 2024-07-18].
119. COOLEN, Anne-Line, LACROIX, Céline, MERCIER-GOUY, Perrine, et al. Poly(lactic acid) nanoparticles and cell-penetrating peptide potentiate mRNA-based vaccine expression in dendritic cells triggering

- their activation. Online. *Biomaterials*. 2019, roč. 2019, č. 195, s. 23-27. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.12.019>. [cit. 2024-07-18].
120. SCHEICHER, B., SCHACHNER-NEDHERER, A.-L. a ZIMMER, A. Protamine–oligonucleotide-nanoparticles: Recent advances in drug delivery and drug targeting. Online. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015, roč. 2015, č. 75, s. 54-59. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.04.009>. [cit. 2024-07-18].
121. KALLEN, Karl-Josef, HEIDENREICH, Regina, SCHNEE, Margit, et al. A novel, disruptive vaccination technology Self-adjuvanted RNActive® vaccines. Online. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2013, roč. 2013, č. 9(10), s. 2263-2276. Dostupné z: <https://doi.org/10.4161/hv.25181>. [cit. 2024-07-18].
122. SCHEEL, Birgit, TEUFEL, Regina, PROBST, Jochen, et al. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. Online. *European Journal of Immunology*. 2005, roč. 2005, č. 35(5), s. 1557-1566. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/eji.200425656>. [cit. 2024-07-18].
123. PETSCH, Benjamin, SCHNEE, Margit, VOGEL, Annette B, et al. Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. Online. *Nature Biotechnology volume*. 2012, roč. 2012, č. 30, s. 1210-1216. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nbt.2436>. [cit. 2024-07-18].
124. WANG, Yuhua, SU, Hsing-hao, YANG, Yang, et al. Systemic Delivery of Modified mRNA Encoding Herpes Simplex Virus 1 Thymidine Kinase for Targeted Cancer Gene Therapy. Online. *Molecular Therapy*. 2013, roč. 2013, č. 21(2), s. 358-367. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/mt.2012.250>. [cit. 2024-07-18].
125. STEPANOVA, Mariia, NIKIFOROV, Alexey, TENNIKOVA, Tatiana, et al. Polypeptide-Based Systems: From Synthesis to Application in Drug

- Delivery. Online. *Pharmaceutics*. 2023, roč. 2023, č. 15, s. 2641. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15112641>. [cit. 2024-07-19].
126. MINIGO, Gabriela, SCHOLZEN, A, TANG, C, et al. Poly-l-lysine-coated nanoparticles: A potent delivery system to enhance DNA vaccine efficacy. Online. *Vaccine*. 2007, roč. 2007, č. 25(7), s. 1316-1327. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.09.086>[cit. 2024-07-19].
127. KUROSAKI, Tomoaki, KODAMA, Yukinobu, MURO, Takahiro, et al. Secure splenic delivery of plasmid DNA and its application to DNA vaccine. Online. *Biol Pharm Bull*. 2013, roč. 2013, č. 36(11), s. 1800-1806. Dostupné z: <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00489>.. [cit. 2024-07-19].
128. SALVADOR, Aiala, IGARTUA,, Manoli a HERNÁNDEZ,, Rosa Maria. An Overview on the Field of Micro – and Nanotechnologies for Synthetic Peptide-Based Vaccines. Online. *Journal of Drug Delivery*. 2011, roč. 2011, s. 101646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2011/181646>. [cit. 2024-07-19].
129. ROHOVIE, Marcus J, NAGASAWA, Maya a SWARTZ, James R. Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. Online. 2017, roč. 2017, č. 2(1), s. 43-57. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/btm2.10049>.. [cit. 2024-07-19].
130. ZHANG, Li Fang, ZHOU, Jian, CHEN, Shao, et al. HPV6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man. Online. *Vaccine*. 2000, roč. 2000, č. 18(11-12), s. 1051-1058. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00351-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00351-5). [cit. 2024-07-19].
131. TAKAMURA, S, NIIKURA, M, LI, T-C, et al. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. Online. *Gene Therapy*. Roč. 2004, č. 8, s. 628-635. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302193> [cit. 2024-05-10].
132. UDDIN, Mohammad, HENRY, Brittany, CARTER 1, Kewann D, et al. A Novel Formulation Strategy to Deliver Combined DNA and VLP Based HPV Vaccine. Online. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*.

- Roč. 2019, č. 22, s. 536-547. Dostupné z: <https://doi.org/10.18433/jpps30768>. [cit. 2024-05-10]
133. CHAN, JM, VALENCIA, PM, ZHANG, L, et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery. Online. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2010, roč. 2010, č. 624, s. 163-175. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2_11. [cit. 2024-07-19].
134. AHMED, Tarek A a ALJAEID, Bader M. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. Online. *Drug Des Devel Ther.* 2016, roč. 2016, č. 10, s. 483-507. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S99651>. [cit. 2024-07-19].
135. CHAN, Jinyu Han, VALENCIA, Dandan Zhao, ZHANG, Dan Li, et al. Polymer-Based Nanomaterials and Applications for Vaccines and Drugs. Online. *Polymers (Basel)*. 2018, roč. 2018, č. 10(1), s. 31. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym10010031>. [cit. 2024-07-19].
136. ZHOU, Xianfeng, ZHANG, Xizhen, YU, Xianghui, et al. The effect of conjugation to gold nanoparticles on the ability of low molecular weight chitosan to transfer DNA vaccine. Online. *Biomaterials*. 2007, roč. 2008, č. 29(1), s. 111-117. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.09.007>. [cit. 2024-07-19].
137. LI, Pan, CHEN, Simu, JIANG, Yuhong, et al. Dendritic cell targeted liposomes-protamine-DNA complexes mediated by synthetic mannosylated cholesterol as a potential carrier for DNA vaccine. Online. *Nanotechnology*. 2013, roč. 2013, č. 24(29), s. 295101. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/29/295101>. [cit. 2024-07-19].
138. DUONG, Huu Thuy Trang, THAMBI, Thavasyappan, YIN, Yue, et al. Degradation-regulated architecture of injectable smart hydrogels enhances humoral immune response and potentiates antitumor activity in human lung carcinoma. Online. *Biomaterials*. 2019, roč. 2020, č. 230, s. 119599. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119599>. [cit. 2024-07-19].

139. GRIGSBY, Christopher L. a LEONG, Kam W. Balancing protection and release of DNA: tools to address a bottleneck of non-viral gene delivery. Online. *J R Soc Interface*. 2009, roč. 2010, č. 7(1), s. 67-82. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0260>. [cit. 2024-07-19].
140. GONG, Xiaochen; GAO, Yuan a SHU, Jianhong, et al. Chitosan-Based Nanomaterial as Immune Adjuvant and Delivery Carrier for Vaccines. Online. *Vaccines (Basel)*. 2022, roč. 2022, č. 10(11), s. 1906. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/vaccines10111906>. [cit. 2024-08-21].
141. NIKITENKO, N. A. a PRASSOLOV, V. S. Non-Viral Delivery and Therapeutic Application of Small Interfering RNAs – PDF (English). Online. *Acta Naturae*. 2013, roč. 2013, č. 5(3), s. 35-53. Dostupné z: <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-3-35-53>. [cit. 2024-07-19].
142. WU, Zong-Wei, CHIEN, Chih-Te, LIU, Chia-Yeh, et al. Recent progress in copolymer-mediated siRNA delivery. Online. *Journal of Drug Targeting*. 2012, roč. 2012, č. 20(7), s. 551-560. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.699057>. [cit. 2024-07-19].
143. FRIESEN, Josh J. a BLAKNEY, Anna K. Trends in the synthetic polymer delivery of RNA. Online. *The Journal of Gene Medicine*. 2023, roč. 2024, č. 26, s. 3672. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jgm.3672>. [cit. 2024-07-19].
144. XU, Hai, ZHU, Shanyuan, GOVINDEN, Roshini, et al. Multiple Vaccines and Strategies for Pandemic Preparedness of Avian Influenza Virus. Online. *Viruses*. 2023, roč. 2023, č. 15, s. 1694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/v15081694>. [cit. 2024-07-19].
145. AHMED, Tanvir. Immunotherapy for neuroblastoma using mRNA vaccines. Online. *Advances in Cancer Biology – Metastasis*. 2022, roč. 2022, č. 4, s. 100033. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.adcanc.2022.100033>. [cit. 2024-07-19].
146. ULLAS, Padinjaremmattathil Thankappan, MADHUSUDANA, Shampur Narayan, DESAI, Anita, et al. Enhancement of immunogenicity and efficacy of a plasmid DNA rabies vaccine by nanoformulation with a fourth-generation amine-terminated poly(ether imine) dendrimer.

- Online. *International journal of Nanomedicine*. 2014, roč. 2014, č. 9, s. 627-634. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S53415>. [cit. 2024-07-19].
147. WANG, Xiaoting, DAI, Yang, ZHAO, Song, et al. PAMAM-Lys, a Novel Vaccine Delivery Vector, Enhances the Protective Effects of the SjC23 DNA Vaccine against *Schistosoma japonicum* Infection. Online. *PLOS ONE*. 2014, roč. 2014, č. 9(1), s. e86578. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086578>. [cit. 2024-07-19].
148. JENSEN, Ditte Krohn, JENSEN, Linda Boye, KOOCHEKI, Saeid, et al. Design of an inhalable dry powder formulation of DOTAP-modified PLGA nanoparticles loaded with siRNA. Online. *Journal of Controlled Release*. 2011, roč. 2012, č. 157(1), s. 141-148. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.011>. [cit. 2024-07-19].
149. GOH, Sarah L, MURTHY, Niren, XU, Mingcheng, et al. Cross-linked microparticles as carriers for the delivery of plasmid DNA for vaccine development. Online. *Bioconjug Chem*. 2004, roč. 2004, č. 15(3), s. 467-474. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bc034159n>. [cit. 2024-07-19].
150. CASTALDELLO, Arianna, BROCCA-COFANO, Egidio, VOLTAN, Rebecca, et al. DNA prime and protein boost immunization with innovative polymeric cationic core-shell nanoparticles elicits broad immune responses and strongly enhance cellular responses of HIV-1 tat DNA vaccination. Online. *Vaccine*. 2006, roč. 2006, č. 29(29-30), s. 5655-5669. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.058>. [cit. 2024-07-19].
151. HASSAN, Homa, SHARMA, Pradakshina, HASAN, Mohd. Rahil, et al. Gold nanomaterials – The golden approach from synthesis to applications. Online. *Materials Science for Energy Technologies Volume*. Roč. 2022, č. 5, s. 375-390. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mset.2022.09.004>. [cit. 2024-05-11].
152. MENDES, Bárbara B., CONNIOT, João, AVITAL, Aviram, et al. Nanodelivery of nucleic acids. Online. *Nature Reviews Methods Primers*. 2022, roč. 2022, č. 2, s. 24. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00104-y>. [cit. 2024-07-25].

153. GREGORY, Anthony E.; TITBALL, Richard a WILLIAMSON, Diane. Vaccine delivery using nanoparticles. Online. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2013, roč. 2013, č. 3, s. 13. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00013>. [cit. 2024-07-25].
154. KU, Sook Hee, KIM, Kwangmeyung, KIM, Kuiwon, et al. Tumor-Targeting Multifunctional Nanoparticles for siRNA Delivery: Recent Advances in Cancer Therapy. Online. *Advanced healthcare materials*. 2014, roč. 2014, č. 3(8), s. 1182-1193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/adhm.201300607>. [cit. 2024-07-25].
155. TARN, Derrick, ASHLEY, Carlee E., XUE, Min, et al. Mesoporous Silica Nanoparticle Nanocarriers: Biofunctionality and Biocompatibility. Online. *Accounts of Chemical Research*. 2013, roč. 2013, č. 46(3), s. 792-801. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ar3000986>. [cit. 2024-07-25].
156. LEE, Ji Eun, LEE, Nohyun, KIM, Taeho, et al. Multifunctional mesoporous silica nanocomposite nanoparticles for theranostic applications. Online. *Accounts of Chemical Research*. 2011, roč. 2011, č. 44(10), s. 893-902. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ar2000259>. [cit. 2024-07-25].
157. PEDNEKAR, Priti P.; GODIYAL, Shilpa C. a JADHAV, Kisan R. Mesoporous silica nanoparticles: a promising multifunctional drug delivery system. Online. *J Biomed Nanotechnol*. 2017, roč. 2017, s. 593-621. Dostupné z: doi.org/10.1016/B978-0-323-46144-3.00023-4. [cit. 2024-08-26].
158. ALMANSOUR, Iman a JERMY, B. Rabindran. Nucleic acid vaccine candidates encapsulated with mesoporous silica nanoparticles against MERS-CoV. Online. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2024, roč. 2024, č. 20(1), s. 2346390. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21645515.2024.2346390>. [cit. 2024-07-25].
159. WANG, Tianyi, ZOU, Meijuan, JIANG, Haitao, et al. Synthesis of a novel kind of carbon nanoparticle with large mesopores and macropores and its application as an oral vaccine adjuvant. Online. *European Journal*

- of Pharmaceutical Sciences*. 2011, roč. 2011, č. 44(5), s. 653-659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.10.012>. [cit. 2024-07-25].
160. WU, Yanrong, PHILLIPS, Joseph A., LIU, Haipeng, et al. Carbon Nanotubes Protect DNA Strands During Cellular Delivery. Online. *ACS Nano*. Roč. 2008, č. 2(10), s. 2023-2028. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/nn800325a>. [cit. 2024-05-12].
161. HU, Feng, LI, Yingying Li, WANG, Qing, et al. Carbon nanotube-based DNA vaccine against koi herpesvirus given by intramuscular injection. Online. *Fish & Shellfish Immunology*. Roč. 2020, č. 98, s. 810-818. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.035>. [cit. 2024-05-11].
162. XU, Yang, FERGUSON, Tammy, MASUDA, Kazuya, et al. Short Carbon Nanotube-Based Delivery of mRNA for HIV-1 Vaccines. Online. *Biomolecules*. Roč. 2023, č. 13(7), s. 1088. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom13071088>. [cit. 2024-05-12].
163. LUNALABS. *NanoVac™ Carbon Nanotube Vaccine Delivery Platform*. Online. LUNALABS. Dostupné z: <https://lunalabs.us/product/nanovac/>. [cit. 2024-07-25].
164. HE, Qing; MITCHELL, Alaina a MORCOL, Tulin, et al. Calcium Phosphate Nanoparticles Induce Mucosal Immunity and Protection against Herpes Simplex Virus Type 2. Online. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002, roč. 2002, č. 9(5), s. 1021–1024. Dostupné z: [10.1128/CDLI.9.5.1021-1024.2002](https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.1021-1024.2002). [cit. 2024-08-26].
165. SUN, Zhe, LI, Wenyi, LENZO, Jason C, et al. The Potential of Calcium Phosphate Nanoparticles as Adjuvants and Vaccine Delivery Vehicles. Online. *Frontiers in Materials*. 2021, roč. 2021, č. 8, s. 788373. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmats.2021.788373>. [cit. 2024-07-25].
166. SUN, Bing, ZHAO, Xiaohui, GU, Wenxi, et al. ATP stabilised and sensitised calcium phosphate nanoparticles as effective adjuvants for a DNA vaccine against cancer. Online. *Journal of Materials Chemistry B*. 2021, roč. 2021, č. 9, s. 7435-7446. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D1TB01408K>. [cit. 2024-07-25].