

MÅLSTYRTE DNA-VAKSINER MOT INFEKSJONSSYKDOMMER OG KREFT

foredrag på møte
15. mars 2018

av professor Bjarne Bogen, Institutt for klinisk medisin, Universitetet i Oslo

Vaksiner har betydd svært mye for folkehelsen. Det er imidlertid et stort behov for utvikling av nye vaksiner. Vaksiner kan leveres som DNA, men dessverre har immunsvaret ved DNA-vaksinasjon vært skuffende dårlige. Denne artikkelen vil belyse hvordan DNA-vaksiner kan gjøres mer effektive. Dette kan oppnås ved å konstruere vaksine-DNA slik at det koder for et vaksineprotein som oppsøker celler med evne til å igangsette kraftige immunsvaret. Dette prinsippet blir kalt «målstyrende DNA vaksiner». Vaksineformatet kan forhåpentligvis føre til utvikling av mer virksomme vaksiner mot infeksjonssykdommer og kreft. En betydelig fordel er at målstyrte DNA-vaksiner kan produseres raskt og i store mengder, noe som er viktig ved truende pandemier som for eksempel fugleinfluensa. Rask og billig produksjon er også viktig for individtilpassede vaksiner mot kreft.

Hvorfor trenger vi nye vaksiner?

Til tross for store internasjonale satsninger mangler vi vaksiner mot velkjente infeksjonssykdommer. For eksempel trengs effektive vaksiner mot HIV, malaria og tuberkulose, sykdommer som dreper flere millioner mennesker årlig. For andre vanlige infeksjonssykdommer har vi allerede vaksiner, men disse er dessverre ikke alltid optimale. Et eksempel er influensa, hvor årlige endringer i virusets arvestoff gjør at fjorårets vaksine ikke lenger er virksom mot årets influensavirus. Derfor må man hvert år lage nye vaksiner for å forsøke å holde tritt med disse endringene. Det er imidlertid et stort problem: Den lange produksjonstiden gjør at man må gjette hvilke influensatyper det er best å inkludere i neste års vaksine. Og av og til gjetter man feil slik at influensavaksinen har manglende effekt. Det er derfor et mål å utvikle nye vaksineformater som kan produseres svært raskt, ikke

bare ved influensa, men også når det brått dukker opp virus som kan forårsake uventede epidemier. Nærliggende eksempler er epidemiene forårsaket av Ebola- og Zika-virus, og hvor vaksineberedskaperen har vært mangelfull. Den største trusselen er imidlertid faren for en verdensomspennende fugleinfluensa-pandemi, med en dødelighet som kan nå 50 %.

Det er ikke bare ved infeksjonssykdommer vi trenger nye vaksiner. Forskningsresultater publisert det siste året har vist at det er mulig å lage virksomme kreftvaksiner tilpasset hver enkelt pasient. Slike skreddersyde kreftvaksiner vil kreve et effektivt vaksineformat, og hvor vaksinen kan produseres raskt.

Subenhetsvaksiner er et attraktivt vaksineformat

De fleste effektive vaksiner består i dag av hele det sykdomsfremkallende smittestoffet, slik som for eksempel virus. I slike vaksiner er viruset enten drept eller svekket for å unngå at vaksinasjonen i seg selv skal kunne forårsake sykdom. Slike vaksiner, og særlig de som består av levende men svekkede virus, har ofte evnen til å indusere kraftige, langvarige og beskyttende immunsvær. Ulempen er at selve produksjonen av slike vaksiner kan medføre fare siden man dyrker levende virus, og prosessen er veldig tidkrevende. For vaksiner med svekket virus er det også en liten mulighet for at vaksineviruset kan gjenvinne sin evne til å fremkalle sykdom, så denne strategien er lite egnet for vaksiner mot farlige virus.

Ved subenhetsvaksiner, derimot, vil bare en liten del av viruset benyttes i vaksinen, en såkalt subenhet. Som subenhet velges gjerne et protein som det er mye av på overflaten av viruset, eller et protein som er viktig for virusets formering. Uansett er det viktig at man velger en subenhet som har evnen til å indusere et beskyttende immunsvær mot det aktuelle viruset. Subenhetsvaksiner har den fordel at de er trygge både når det gjelder produksjon og bruk, siden den lille virusbiten i seg selv ikke kan utgjøre noen smittefare. Ulempen er at subenhetsvaksiner ofte fremkaller kun svake immunsvær sammenlignet med vaksiner basert på et helt virus.

Subenhetsvaksiner kan leveres som DNA

Det er i hovedsak smittestoffets proteiner som fremkaller et immunsvær. Derfor består en subenhetsvaksine gjerne av protein, slik som for eksempel

Hepatitt B-vaksinen. Siden immunsvaret utløst av subenhetsvaksiner er svake, gis proteinvaksiner sammen med et adjuvans (hjelpstoff) som har som oppgave å forsterke immunsvaret. En utfordring med protein-subenhetsvaksiner er å produsere tilstrekkelig store mengder protein.

Som alternativ kan man levere subenhetsvaksinen som en genomisk vaksine, enten i form av RNA eller DNA. RNA tatt opp i celler hos det vaksinerte individet vil direkte kode for vaksineprotein, mens DNA vil indirekte kode for protein via RNA. RNA-vaksiner har den fordel at RNA ikke kan integreres i det vaksinerte individets arvemateriale. En ulempe er at RNA brytes ned relativt raskt. Dermed avsluttes også proteinproduksjonen, som blir relativt kortvarig. En annen ulempe er at RNA er et relativt ustabil molekyl, hvilket krever mer av både produksjon og oppbevaring før bruk.

DNA-vaksiner har den fordel at DNA vil være lenge til stede i cellen, oversettes kontinuerlig til RNA, og dermed gi en langvarig proteinproduksjon som kan vare opptil flere uker. En annen fordel er at DNA er svært stabilt, og dermed lett å produsere og oppbevare. Dette har en særlig stor betydning for lavinntektsland i varmere strøk, hvor en kuldekjede («cold chain») for oppbevaring av vaksiner er både kostbart og praktisk vanskelig. En tredje fordel med DNA er at man i laboratoriet enkelt kan endre hvilket protein DNAet koder for. DNA-vaksiner har imidlertid en potensiell ulempe ved at DNAet kan integreres i det vaksinerte individets arvemateriale. Særlig vil integrasjon i genomet til kjønnsceller være uheldig da dette medfører fare for overføring til avkom. Heldigvis har omfattende undersøkelser vist at risikoen for integrasjon er liten, og DNA-vaksinasjon anses i dag som trygt (Manam et al., 2000). Gitt DNAets mange fordeler vil den videre fremstillingen fokusere på levering av subenhetsvaksiner i DNA-format.

DNA i virale vektorer versus nakent DNA (plasmider)

DNA kan leveres i virale vektorer, slik som for eksempel adenovirus-baserte vektorer. Slike virale vektorer inducerer som oftest kraftige immunsvaret. Imidlertid vil immunsystemet også oppfatte selve den virale vektoren som fremmed, og inducere et kraftig immunsvaret mot de delene som egentlig bare skulle sørge for effektiv levering av selve vaksine-DNAet. Dette ødelegger muligheten for gjentatt vaksinering, siden immunsystemet ved neste gangs vaksinasjon vil gjenkjenne den virale vektoren og eliminere denne før det kan dannes immunsvaret mot vaksine-DNAet (det vil si proteinet) som

vektoren bærer. Dette ekskluderer også at man kan benytte den samme virale vektoren til å vaksinere mot ulike sykdommer.

DNA kan også leveres som nakent DNA i form av små sirkulære DNA-molekyler (plasmider), rensert fra bakteriekulturer (Tang et al., 1992; Ulmer et al., 1993). Fordelen med bruk av plasmider ved vaksinasjon er flere: (i) Immunisering med plasmid-DNA anses som trygt (ii) Plasmider kan gis et ubegrenset antall ganger da DNA i seg selv ikke induserer en immunrespons (iii) Det er raskt å lage nye konstruksjoner på plasmidnivå (iv) Det er lett å skalere opp produksjonen av plasmider (v) Produksjonen av plasmider er billig (vi) Plasmider er relativt resistente mot nedbrytning. Disse faktorene (i-vi) gjør plasmid-DNA til et attraktivt vaksineformat. Dessverre har nakent plasmid-DNA en stor ulempe: Immunsvarerne som utløses er som regel svake, spesielt i større dyr og mennesker (Li et al., 2012).

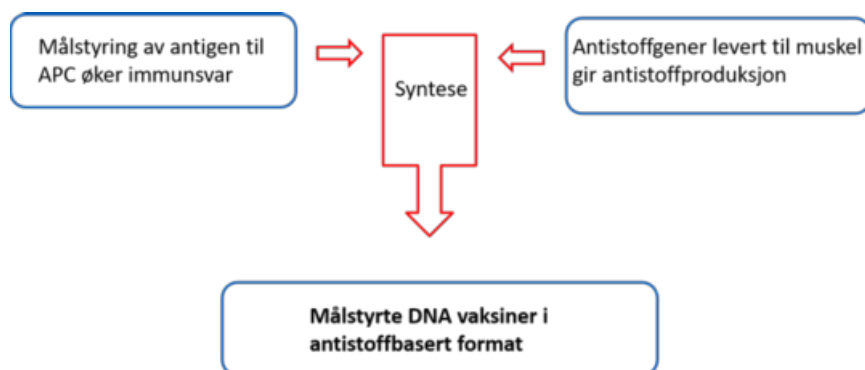
Vaksinasjon med plasmid-DNA potensières av elektroporering og jet-levering

En strategi for å overkomme de svake immunsvarerne har vært å øke antall celler som tar opp plasmider ved vaksinasjon, og samtidig få flere plasmider inn i hver enkelt celle. Dette kan oppnås ved umiddelbart å gi en rekke svært kortvarige elektriske pulser til vevet hvor DNA er blitt injisert, det være seg hud eller tverrstripet muskulatur (Tollefsen et al., 2002). Denne prosedyren heter elektroporering. De elektriske pulsene gjør at det dannes små hull i cellemembranen, noe som bedrer opptak av DNA i celler. Resultatet er at flere celler tar opp flere plasmider, mer RNA og protein produseres, og dermed forbedres immunsvaret. En annen strategi for økt opptak av DNA er innkapsling av plasmider i liposomer. En tredje strategi er såkalt jet-levering hvor plasmider skytes inn i overflatisk beliggende hud eller muskulatur med høyt trykk (Grodland et al., 2016; Manam et al., 2000). Sistnevnte teknikk er paradoksalt nok nærmest smertefri og har klare fordeler i større dyr og mennesker (se senere).

Målstyring potensiører DNA-vaksiner

En ganske annerledes strategi for å øke immunsvaret utløst av nakent DNA er å benytte målstyrte DNA-vaksiner. Denne typen DNA-vaksiner er blitt utviklet i mitt laboratorium siden begynnelsen av 2002 (Fredriksen and

Bogen, 2007; Fredriksen et al., 2006; Schjetne et al., 2007b). I tillegg til å øke immunsvaret har denne teknologien muliggjort at den type immunsvaret som utløses kan styres i bestemte retninger, enten mot antistoffsvar eller T-cellesvar (Grodeland et al., 2015). Målstyrte DNA-vaksiner kan med fordel leveres med enten elektroporering (Fredriksen et al., 2006) eller jet-levering (Grodeland et al., 2016) som begge styrker immunsvaret som utløses.



Figur 1. Målstyrte DNA vaksiner representerer syntese av to prinsipper. (i) Målstyring av antigener til antigenpresenterende celler (APC) ved bruk av antistoff-antigen konjugater øker immunsvaret mot antigenet med en faktor på rundt 1000 (ii) Antistoffgener levert til tverrstripet muskulatur resulterer i sekresjon av antistoffer. Man kan da kombinere (i) og (ii) ved å konstruere DNA på en slik måte at celler som tar opp DNA vaksinen utskiller antistoffbaserte vaksinemolekyler som målstyrer antigen til APC.

- (i) Det har vært kjent siden 1980-tallet at proteiner som målstyres mot overflatemolekyler på cellyper som igangsetter immunsvaret [såkalte antigen presenterende celler (APC)], forsterker immunsvaret betydelig (Kawamura and Berzofsky, 1986; Snider and Segal, 1987). (Antigen er et immunologisk begrep; antigen tilsvarer en subenhet av et smittestoff, slik som et virus). Dette ble i tidlige forsøk oppnådd ved å kople antigen til målstyrende antistoff rettet mot APC. I senere forsøk har man satt antigen inn i målstyrende APC-spesifikke antistoffer med bruk av genteknologi (Lunde et al., 1999).

- ii) DNA som koder for henholdsvis den lette og den tunge kjeden av et monoklonalt antistoff kan injiseres (med elektroporering) i tverrstripet muskulatur. Transfekterte muskelceller som har tatt opp DNA vil så syntetisere monoklonale antistoffer som utskilles til ekstracellulær væske. Dette ble først vist av meg og medarbeidere i 2004 (Tjelle et al., 2004). Det var da en naturlig tanke at målstyrte DNA-vaksiner kunne leveres på samme måte. Min ide var altså å vaksinere med DNA som koder for målstyrt vaksineprotein med evne til å oppsøke APC i det vaksinerte individet (Fig. 1 neste side).

Design av det målstyrte vaksinemolekylet. En bakgrunn.

Sammen med Inger Sandlie (Universitetet i Oslo) hadde forfatteren i 1999 utviklet såkalte Troybody molekyler (Lunde et al., 1999), tiltenkt vaksineformål. Et Troybody er et genmodifisert antistoff som er gjort målstyrende og hvor korte sekvenser av antigen (antigene peptider, p) er satt inn i hale-regionen av antistoffmolekylet. Når et Troybody binder seg til APC vil de bli tatt inn i cellen (endocyttert) og delvis nedbrutt, hvilket frigjør de innsatte antigene peptidene. Disse kan så binde seg til vevstypeantigener [Major Histocompatibility Complex (MHC) molekyler] av type II i cellens endosomer. Kompleksene av antigen peptid og MHC klasse II molekyl (p:MHCII) fraktes så ut på overflaten av APC hvor de presenteres til T-celler av CD4⁺ typen.

Troybody formatet har imidlertid to store ulemper som vaksinemolekyl:

- (i) MHC-molekyler varierer i utstrakt grad mellom forskjellige individer innen en art, og ulike MHC-molekyler binder og presenterer ulike antigene peptider derivert fra ett og samme antigen. Derfor vil en Troybody vaksine, med kun ett enkelt innsatt antigen peptid, bare være virksomt i den lille andelen av individer som har akkurat de MHC-molekylene som passer som hånd i hanske til det innsatte antigen peptidet. Fordi en vaksine nødvendigvis må virke i alle individer innen en art for å være nyttig i vaksinesammenheng, var dette et stort problem som måtte løses.
- (i) Ved infeksjonssykdommer er antistoffer mot smittestoffet som regel av største viktighet. For å kunne indusere antistoffer må antigenet ha

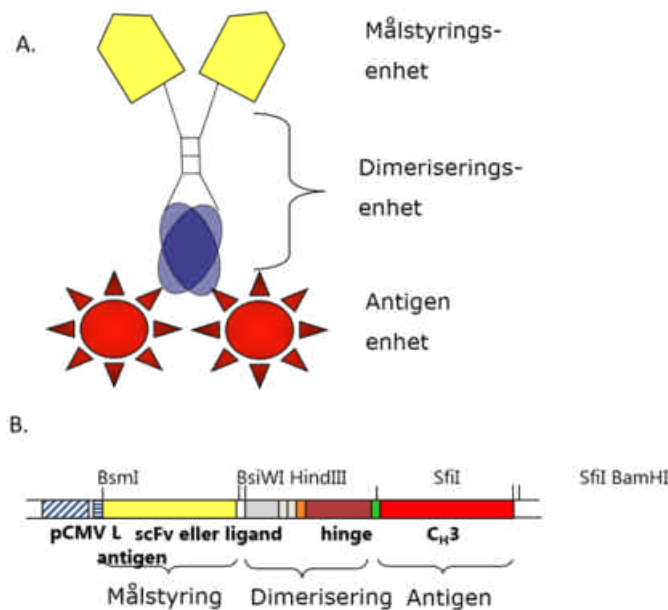
en intakt tredimensjonal struktur. De korte antigenene peptidene satt inn i et Troybody molekyl er defekte i så henseende.

En tredje drivkraft for å utvikle nye og bedre vaksinemolekyler var at jeg under et forskningsopphold ved Stanford University i 1995/96 ble inspirert av professor Ron Levy's arbeid med idiotype-vaksinering. Idietyper (Id) er en betegnelse for antigenene determinanter i de variable regionene av antistoffer. Ved kreft i B-celler (eller plasmaceller) vil den ondartede klonen produsere et ensartet (monoklonalt) antistoff med unike variable regionene (Id); disse fungerer som et tumorspesifikt antigen på de maligne B-cellene. Ron Levy's mål var derfor å vaksinere lymfekreftpasienter med deres eget Id slik at pasientene utviklet anti-Id antistoffer rettet mot de ondartede B-cellenes monoklonale antistoff. Håpet var at slike anti-Id antistoffer kunne føre til utryddelse av kreftcellene. Jeg fikk da den tanke at hvis man kunne målstyle lymfekreftpasientens V regioner (idiotype) til antigenpresenterende celler ville dette kunne føre til økt dannelse av anti-Id antistoffer.

Design av det målstyrte vaksinemolekylet. Den konkrete utformingen.

Spørsmålet var da om en ny molekylær design av vaksineproteinene kunne tilfredsstillende de to punktene (i-ii) beskrevet ovenfor. Forfatteren tok problemstillingen opp med Inger Sandlie, og etter overlegninger kom vi frem til en antistoffbasert vaksinestruktur som vist i Fig. 2. Vaksinemolekylet er en homodimer som består av to identiske kjeder. De midtre partiene av de to kjedene blir holdt sammen av en dimeriseringsenhet som består av (i) et immunglobulin domene (C_{H3}) fra tungkjedens konstante region og (ii) en forkortet immunglobulin hengsleregion. Dette motivet forårsaker en dimerisering gjennom både nonkovalente krefter (mellom C_{H3} domene) og kovalente krefter (disulfidbroer mellom hengsleregionene). I den aminosyreterminalen, oppstrøms for dimeriseringsenheten, har kjedene en målstyrende enhet som kan binde overflatemolekyler på antigenpresenterende celler. Som målstyrende enhet benyttes gjerne de variable regionene fra et APC-spesifikt monoklonalt antistoff, sydd sammen i et «single chain Fragment variable» (scFv) format. Alternativt benyttes kjemokiner som binder kjemokinreseptorer i celleoverflaten på APC. I den karboksyterminale enden nedstrøms for dimeriseringsenheten har de to kjedene en antigen enhet. De første versjonene benyttet et tumorspesifikt antigen, nærmere bestemt de variable regionene (Id) fra et monoklonalt antistoff produsert av

en benmargskreft-cellelinje hos mus, sydd sammen i et scFv format. Slike bivalente vaksinemolekyler fikk navnet Vaccibody fordi de hadde en relasjon til både vaksiner (**vaccines**) og antistoffer (**antibodies**). Betegnelsen Vaccibody benyttes ikke bare for det målstyrte vaksineprotein, men også for plasmid DNA som koder for vaksineprotein.



Figur 2. Design av det målstyrte vaksinemolekylet (Vaccibody). A. Proteinstruktur. Vaksinemolekylet er en homodimer som består av to identiske kjeder som i de midtre deler holdes sammen av en dimeriseringsenhet. Denne enheten består av et humant IgG3 C_H3 domene som dimeriserer med hverandre gjennom nonkovalente krefter. I tillegg har dimeriseringsenheten en forkortet IgG3-hengsleregion som muliggjør dannelse av disulfid-broer mellom de to kjedene. I den ene (aminoterminal) enden har kjedene en målstyringsenhet. Denne kan bestå av Variable (V) regioner fra monoklonale antistoffer (mAs) som er spesifikke for et overflatemolekyl på APC. V regionene fra henholdsvis lett og tung kjede av mAs blir sydd sammen i et "single chain Fragment variable" (scFv) format. Alternativt kan målstyringsenheten bestå av naturlige ligander, som for eksempel kjemokiner som binder kjemokinreseptorer på APC. I den andre (karboksyterminale) enden har kjedene en antigen enhet som kan bestå av et proteinantigen fra

enten et smittestoff slik som virus, eller fra en kreftcelle. B. Del av et Vaccibody DNA plasmid. Forskjellige genetiske elementer koder for de ulike delene av Vaccibody-proteinet, slik som anvist. Viktige restriksjonsenzym-seter er indikert. De ulike genetiske elementene kan lett byttes ut som i en kassett-vektor. pCMV indikerer en Cytomegalovirus-promotor. L indiker en ledersekvens.

Virkningsmekanismen til målstyrt DNA

Den postulerte virkningsmekanismen til Vaccibody-DNA er illustrert i Fig. 3 & 4. Når Vaccibody-plasmider sprøytes inn i hud (eller tverrstripet muskulatur), så vil DNA-transfekterte celler produsere proteinkjedene (Lovas et al., 2014). Disse vil dimeriseres (pares) intracellulært (i endoplasmatisk retikulum), og deretter utskilles som vaksineprotein til ekstracellulær væske. Det målstyrte vaksineproteinet binder seg så til APC av typen dendritiske celler (DC) i det lokale vevet. DC med bundet Vaccibody-protein dreneres via afferente lymfekar til lymfeknuter hvor de setter i gang et immunsvaret mot antigenet (Fig. 2). Det er neppe slik at alle Vaccibody-proteiner kun fraktes i cellebundet form til lymfeknuten. Vi tror at en del også fraktes som fritt, løselig protein i lymfevæsken. De to mulighetene, frakt av Vaccibody-protein i respektive cellebunden og fri løselig form, er ikke gjensidig utelukkende. Snarere tror vi at begge måter av frakt finner sted, uten at vi har eksperimentelle holdepunkter for dette.

Når APC binder Vaccibody (via de målstyrende enhetene) vil det endocytterte vaksineproteinet bli brutt ned i små peptider. Antigene peptider går så i kompleks med MHC klasse I og II molekyler. Kompleksene fraktes ut til overflaten hvor de kan gjenkjennes av antigen-spesifikke T-celler av henholdsvis CD8⁺ og CD4⁺ typen. Dette vil føre til forsterkede T-celle svar mot antigenet av to grunner (i) målstyring av vaksineproteinet øker konsentrasjon av antigen i APC, dermed økes antall antigene peptider som presenteres på MHC molekyler, (ii) binding av Vaccibody-protein til celleoverflate-molekyler aktiverer APC, og øker dermed deres evne til å stimulere T-celler. Den APC-medierte antigen stimuleringen av T-celler skjer i lymfeknuten, og mest sannsynlig i lymfeknutens paracortex hvor det er flest T-celler.

Det er et vesentlig poeng at antigenet inkorporert i Vaccibody-proteinet bør være så stort at det vil inneholde sekvenser som vil passe til ethvert MHC-molekyl som uttrykkes innen en art. Sagt på en annen måte, store

antigener vil presenteres som p:MHC komplekser til T-celler i mer eller mindre alle vaksinerte individer. Jo større antigenet er, jo flere sekvenser vil presenteres av MHC molekyler på overflaten av DC, og desto bedre blir T-celle svaret på vaksinasjonen.

En essensiell del av Vaccibody-strategien er at antigendelen binder B-celle-reseptor (BCR) på antigen-spesifikke B-celler. Dette er mulig fordi antigenet som settes inn i Vaccibody-proteinet er så stort at det vil ha en intakt tredimensjonal struktur. Dette er en viktig forutsetning for å binde seg til BCR, som ofte er spesifikk for struktur-avhengige antigene determinanter. En mulig mekanisme for dette er at frie løselige vaksineproteiner kommer via tilførende lymfe og binder seg til B-celler i lymfeknutens cortex (bark). B-cellen vil ta opp vaksineproteinet ved BCR-mediert endocytose og delvis degradere det til antigenpeptider. Genererte p:MHCII komplekser fraktes ut på B-cellens overflate for stimulering av CD4 T-celler.

Antistoffsvaret mot vaksineproteinet er avhengig av et samarbeid mellom antigen-reaktive CD4⁺ T- og B-celler, og dermed en samlokalisasjon av de to celletypene. Samarbeidet skjer sannsynligvis i lymfeknutens bark. En betingelse for en slik samlokalisasjon er at T-cellene, som først stimuleres av APC dypt i lymfeknuten (paracortex), vandrer ut til barken. B-cellene på sin side er allerede lokalisert til barken hvor de med sin BCR binder løselig Vaccibody-protein. Etter binding av Vaccibody-protein vil stimulerede B-celler vandre ut av folliklene og møte T celler som har vandret ut fra paracortex. Her vil B-cellene presentere antigenpeptid på sine MHCII molekyler til antigen-reaktive CD4⁺ T-celler. De to celletypene vil gjensidig stimulere hverandre, noe som fører til en kimsenter-reaksjon i barken med dannelse av plasmaceller og hukommelses B-celler. Plasmaceller generert i kimsentre vandrer til benmargen hvor de lever lenge og produserer stor mengde av antigen-spesifikke antistoffer som sirkulerer i blod og som beskytter individet mot smittestoff. Hukommelses B-cellene lever lenge og kan lettere stimuleres når individet på nytt eksponeres for smittestoff. Den beskrevne mekanismen for økte immunsvaret er understøttet av ikke-publiserte observasjoner i mitt laboratorium (Tor Kristian Andersen et al., 2019).

Scenariet som utpensles over er konsistent med en konvensjonell forståelse av samarbeidet mellom T- og B-celler. Imidlertid tyder upubliserte forsøk i Bogen-lab på at den immun-potensierende effekten av målstyrte Vaccibody-proteiner kanskje skyldes at APC, T- og B-celler danner tri-cellulære komplekser med utstrakt synapsedannelse. Det vil gå for langt å gå inn på detaljene her.

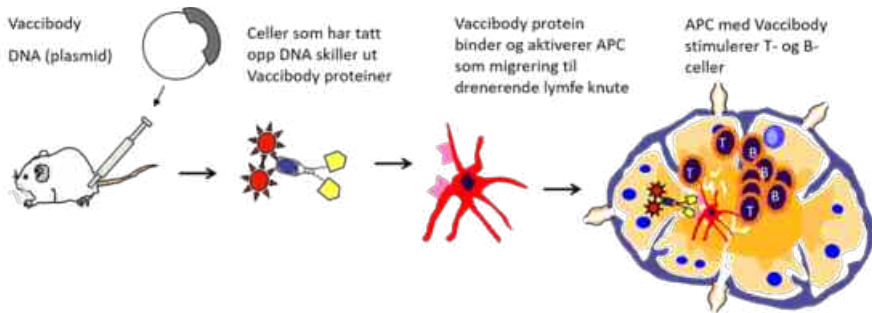


Fig. 3. Vaksinasjon med målstyrte DNA vaksiner (Vaccibody). DNA plasmider blir injisert intradermalt eller intramuskulært med electroporering (hos større dyr og mennesker benyttes nålefri jet-levering med høyt trykk). Celler som tar opp plasmider utskiller Vaccibody protein som binder seg til overflatemolekyler på APC. APC med bundet Vaccibody drenerer til lymfeknuter hvor de utløser et immunsvaret ved å presentere antigenet til T- og B-celler.

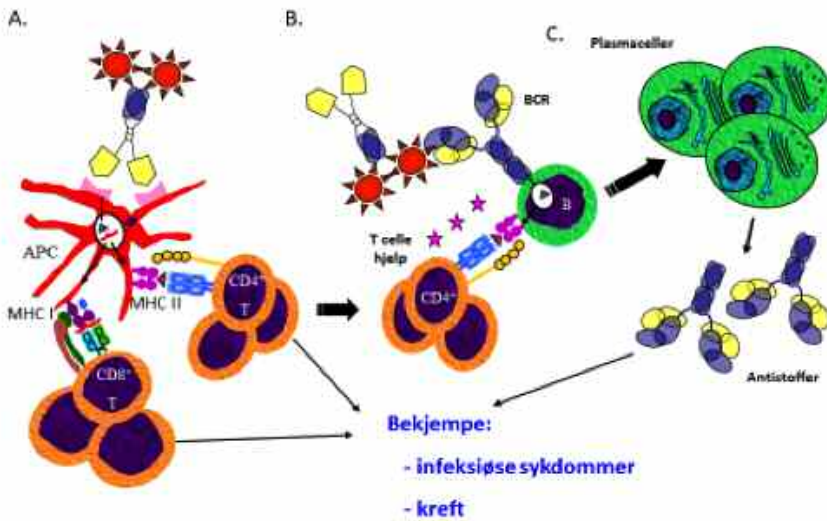


Fig. 4. Den cellulære og molekylære virkningsmekanismen til målstyrte DNA vaksiner. Stimulering av immunsvaret i lymfeknuten. A. Når et Vaccibody protein binder et overflatemolekyl på APC (slik som dendrittiske celler) vil vaksineproteinene bli tatt inn i cellen ved endocytose og delvis nedbrytes til korte antigenpeptider (røde triangler og streker). Slike peptider kan binde

seg til Major Histocompatibility Complex (MHC) molekyler av henholdsvis klasse I eller II. Kompleksene fraktes så ut til celleoverflaten hvor de stimulerer henholdsvis $CD8^+$ og $CD4^+$ antigen-spesifikke T celler. $CD8^+$ T-celler kan drepe virusinfiserte celler og kreftceller. $CD4^+$ T-celler kan hjelpe B-celler. B. B-celler har en B-celle reseptor (BCR) som kan binde antigenenheten i Vaccibodyproteinet. Dette fører til endocytose og delvis nedbrytning av antigenet til korte antigene peptider (rødt triangel) som kan binde seg til MHC II molekyler. Kompleksene fraktes ut på overflaten av B-cellen hvor de kan stimulere $CD4^+$ T-celler (disse $CD4^+$ T-cellene er sannsynlig først stimulert slik som vist i A., dette er indikert med den tykke sorte pilen). De stimulerede $CD4^+$ T-cellene vil så stimulere (hjelpe) B cellen slik som indikert med fiolette stjerner. C. Stimulerte B-celler vil utvikle seg til plasmaceller som utskiller store mengder antigen-spesifikke antistoffer. Antistoffer, $CD4^+$ og $CD8^+$ T-celler vil sammen kunne bekjempe infeksjøs sykdommer og muligens kreft.

De grunnleggende forsøkene med målstyrte DNA vaksiner

Uttesting av Vaccibody levert som målstyrende DNA-vaksine ble først utført i mitt laboratorium av PhD-stipendiat Agnete B. Fredriksen. Forsøkene viste at vaksinerings med målstyrt Vaccibody-DNA i mus ga meget gode antistoff og T-celle svar. Disse forsøkene benyttet tumorspesifikt antigen fra B-cellesvulster (Idiotype i form av scFv, dvs V regionene til monoklonalt immunglobulin). Vaksinerede mus var beskyttet mot kreftceller. Resultatene ble publisert i 2006–7 (Fredriksen and Bogen, 2007; Fredriksen et al., 2006; Schjetne et al., 2007a).

Siden har en lang rekke stipendiater, postdoktorer og forskere i Bogenlab arbeidet med videre utvikling av Vaccibody-formatet og med uttesting som målstyrte DNA-vaksiner mot infeksjonssykdommer og kreft. Det vil ta for lang tid å gå inn på detaljer. Nedenfor vil noen hovedfunn gjengis.

De fleste antigener kan uttrykkes i målstyrte DNA Vaccibody-vaksiner

Dersom målstyrende DNA Vaccibody-vaksiner skal være en nyttig vaksineplattform bør de fleste protein antigener, derivert fra forskjellige infeksjøs agens og kreftceller, kunne settes inn i antigenenheten med bibehold av antigenets tre-dimensjonale struktur, samt sekresjon fra DNA-transfektete

celler. Mer enn 50 forskjellige antigen-kodende nukleotidsekvenser er til nå satt inn i antigenenheten. Resultatene har vært overveiende vellykket ut fra følgende kriterier: (i) Etter transfeksjon av celler *in vitro* med Vaccibody-plasmider utskiller transfekterte celler Vaccibody-proteiner i de aller fleste av tilfellene (ii) Bedømt ut i fra størrelse og karakterisering med monoklonale antistoffer ser de utskilte Vaccibody-proteinene ut til å ha forventet struktur (iii) Etter vaksinasjon med Vaccibody-plasmider produserer de immuniserte musene antistoffer som binder antigenet, hvilket indikerer at struktur av antigenet er konserverv i vaksineproteinene som skiller ut av transfekterte celler *in vivo*. Selv store proteiner opp til 523 aminosyrer (influenzavirus hemagglutinin) uttrykkes. Ingen øvre grense er etablert (Andersen et al., 2017; Anderson et al., 2018; Baranowska et al., 2015; Fossum et al., 2015; Fredriksen et al., 2006; Froyland et al., 2011; Grodeland et al., 2016; Grodeland et al., 2013a; Gudjonsson et al., 2017; Lovas et al., 2014; Oynebraten et al., 2014; Oynebraten et al., 2012; Ruffini et al., 2014).

Et stort antall forskjellige målstyringsenheter kan uttrykkes i DNA Vaccibody-vaksiner

Målstyringsenheter har vært av to typer: (i) scFv derivert fra monoklonale antistoffer med definert spesifisitet for overflatemolekyler på APC (Fredriksen et al., 2006; Grodeland et al., 2016; Schjetne et al., 2007a; Tunheim et al., 2007) (ii) Naturlige ligander med spesifisitet for overflatemolekyler på APC. Blant disse er kjemokiner, som binder kjemokinreseptor på APC, særlig blitt brukt (Ardouin et al., 2016; Braathen et al., 2018; Crozat et al., 2011; Deloizy et al., 2016; Deloizy et al., 2017; Dutertre et al., 2014; Fossum et al., 2015; Fredriksen and Bogen, 2007; Grodeland et al., 2015; Gudjonsson et al., 2017; Williams et al., 2016; Ruffini et al., 2010; Terhorst et al., 2015; Zhou et al., 2016). Mer enn 20 målstyringsenheter har vært satt inn, stort sett uten problemer. Som en generell regel gir ikke scFv målstyringsenheter noen aktivering av APC da mAb hvorfra scFv er derivert som regel er antagonistiske og dermed ikke signalerer celler. Kjemokiner, derimot, virker ofte aktiverende på APC og induserer kjemotakse av disse.

Målstyring potensierer DNA vaksiner

I våre immuniseringsforsøk sammenlignes målstyrt DNA Vaccibody med en

ikke målstyrt versjon – for øvrig er de to versjonene identiske. En strategi for å oppheve målstyring er å innføre ødeleggende mutasjoner i målstyringsenheten slik at denne ikke lenger kan binde APC (Fossum et al., 2015; Fredriksen and Bogen, 2007). En annen strategi er å benytte en målstyringsekvivalent som ikke har evnen til å binde APC [til dette formålet benytter vi et scFv som binder et lavmolekylært haptent (NIP) som ikke finnes i kroppen (Fredriksen et al., 2006)]. Et stort antall publiserte forsøk har vist at målstyring av DNA-vaksiner i Vaccibody-format øker immunsvarene mot antigener, antistoffsvar så vel som T-cellesvar, med økt beskyttelse mot influensavirus og kreftceller som resultat (Anderson et al., 2018; Fossum et al., 2015; Fredriksen and Bogen, 2007; Fredriksen et al., 2006; Grodeland et al., 2016; Grodeland et al., 2013a; Schjetne et al., 2007a).

Hvilket immunsvare som utløses kan skreddersys ved hjelp av ulike målstyringsenheter

Ved infeksjonssykdommer er antistoffer av særlig stor betydning for beskyttelse. For eliminering av kreftceller ser det derimot ut til at T-celler spiller en særlig stor rolle. Det er derfor viktig å kunne manipulere hva slags type immunsvare som utløses. Det har vist seg at vi kan oppnå en polarisering mot henholdsvis antistoffsvar eller T-cellesvar ved å endre målstyringsenheten (Grodeland et al., 2015).

Flere typer kjemokiner gir spesielt gode T-celleresponser av typen CD8⁺ T-celler og Th1-celler (en undergruppe av CD4⁺ T-celler); slike T-celler har særlig stor betydning ved bekjempelse av kreft og enkelte typer virusinfeksjoner. Kjemokinene MIP-1 α (CCL3) (Baranowska et al., 2015; Fredriksen and Bogen, 2007; Ruffini et al., 2010) og Xcl1 (Fossum et al., 2015; Gudjonsson et al., 2017) har vist seg særlig lovende. MIP-1 α (CCL3) binder flere kjemokinreseptorer (CCR1,3,5) som uttrykkes relativt bredt på forskjellige APC cellyper. Bruk av Xcl1 har et klart rasjonale da Xcl1 selektivt binder kjemokinreseptoren Xcr1 som er selektivt uttrykt på kryss-presenterende DC, kjent for sin evne til å utløse nettopp CD8/Th1 svar.

Andre målstyringsenheter er særlig potente til å utløse antistoffsvar. Den beste målstyringsenheten vi hittil har funnet for dette formålet er MHC klasse II molekyler, som er relativt høyt uttrykt på en rekke forskjellige typer APC. Denne målstyringsenheten er derfor et naturlig valg for å oppnå steriliserende antistoffer for eksempel mot influensavirus (Andersen et al., 2017; Anderson et al., 2018; Grodeland et al., 2016; Grodeland et al., 2013b)

(Braathen et al., 2018). Den nest beste målstyringsenheten for induksjon av antistoffer vi så langt har funnet er CD11c uttrykt på DC av både typen cDC1 og cDC2 (Braathen et al., 2018).

Det bør understrekes at den polariserende effekten på type immunsvarene ikke er absolutt. De fleste målstyringsenheter utløser både antistoffer og T-celler, men balansen mellom de to er klart forskjellig (Grodland et al., 2015).

Bivalens av vaksinemolekylet er viktig for induksjon av antistoffer

Som nevnt over består Vaccibody-molekylet av to identiske kjeder bundet til hverandre gjennom et dimeriseringsmotiv. Dette gjør molekylet bivalent med hensyn til både målstyringsenheten og antigenet. Betydningen av bivalens for målstyringsenheten er fortsatt ikke fullstendig utforsket, men synes liten (Spang et al., 2012). Når det gjelder bivalens av antigenet i Vaccibody-proteinet ser dette ut til å spille en stor rolle for induksjon av antistoffer (Fredriksen and Bogen, 2007). Faktisk ser bivalens av antigen ut til å spille en større rolle enn målstyring for nivåer av antistoffer, men de to faktorene har en klart synergetisk effekt (Hinke et al., upublisert).

Forlenget tilstedeværelse av vaksineprotein på overflaten av APC øker antistoffsvaret

Ved å benytte målstyringsenheter som binder overflatemolekyler på APC, men som ikke blir endocyttert, har vi vist at når det målstyrte vaksinemolekylet forblir på overflaten av cellen oppnås et forsterket antistoffsvar (Gudjonsson et al., 2017). Dette funnet er blitt videreført ved å innføre subtile endringer i målstyringsenheten, som fører til redusert endocytose av Vaccibody-proteinet og bedre antistoffsvar (Gudjonsson et al, upublisert).

En hypotese: Målstyrte vaksineproteiner styrker antistoffsvar ved å fremme synapsedannelse mellom APC og antigen-spesifikke B-celler

Tre faktorer, målstyring, bivalens og forlenget tilstedeværelse på overflaten av APC, bidrar alle til forbedrede antistoffresponser. Dette har ledet meg og medarbeidere til å fremsette en hypotese om at målstyrte DNA-vaksiner for-

bedrer antistoffsvar ved at vaksineproteinet danner en bro mellom målstrukturer på APC- og B-celle reseptor, det vil si at det dannes en synapse mellom APC- og B-celler (Fredriksen et al., 2012; Gudjonsson et al., 2017). Bivalens av antigenet i vaksineproteinet er viktig fordi det tillater at to BCR på den antigen-spesifikke B cellen kan kryssbindes. Dette gir trolig et økt signal til B-cellen, økt dannelse av plasmaceller, og dermed økt produksjon av antigen-spesifikke antistoffer.

Målstyrte DNA vaksiner gir en økt kimsenterreaksjon

Det er velkjent at kimsenterreaksjonen ligger til grunn for økt produksjon av IgG antistoffer med økt binding til antigen og effektive biologiske effektorfunksjoner slik som komplementaktivering og økt fagocytose. Det er akkurat denne type antistoffer man ønsker å utløse ved vaksinasjon. Under pågående arbeider har vi nå direkte vist at bivalente målstyrte DNA-vaksiner har evnen til å øke kimsenterreaksjonen både når det gjelder rask induksjon og størrelse på reaksjonen. Således vil målstyring mot MHC klasse II molekyler øke antall kimsenter B-celler, follikulære T-hjelperceller, plasmaceller, og nivået av antistoffer med evne til sterk binding til antigenet (økt affinitet) (Andersen et al., 2019).

Målstyrte DNA vaksiner forbedrer immunsvaret i større dyr

Problemet med DNA-vaksinasjon er at lovende forsøk i mus har vært vanskelige å reproducere i større dyr og mennesker. Immunsvarene har rett og slett vært svake. Det har vært vårt håp at målstyrt DNA-vaksinasjon kanskje kunne bøte på dette problemet. For å teste dette ut laget Grødeland og Fredriksen i mitt laboratorium en målstyringsenhet som binder nesten alle MHC klasse II molekyler hos mennesket (også kalt HLA klasse II). Målstyringsenheten er et scFv fra et monoklonalt museantistoff som binder nær sagt alle utgaver av HLA klasse II molekyler innen menneskearten (det monoklonale antistoffet er en gave fra Steinar Funderud, Oslo Universitetssykehus). Det faktum at denne panHLAII-spesifikke målstyringsenheten binder de fleste HLA klasse II molekyler er særdeles viktig da en målstyrt DNA vaksine må fungere i alle individer. Videre forsøk har vist, overraskende nok, at den panHLAII-spesifikke målstyringsenheten er i stand til å binde MHC klasse II molekyler fra en rekke arter. Vi kunne derfor teste ut DNA-vaksiner utstyrt

med denne målstyringsenheten i flere større dyrearter. Resultatene viser at Vaccibody-DNA med anti-panHLAII målstyringsenhet forbedrer antistoffsvar i både ildere og gris (Grodeland et al., 2016), og både antistoff og T-cellessvar i rhesus macaque aper (Mooij, Grodeland et al., 2019).

Målstyrte DNA-vaksiner i mennesker

På grunnlag av de ovenfor beskrevne resultater har KG Jebsen Centre for Influenza Vaccine Research (hvor forfatteren er leder) påbegynt planlegging av en fase I studie ved Oslo Universitetssykehus, med mulig oppstart innen 2019. Frivillige forsøkspersoner vil DNA-vaksineres med en panHLAII-målstyrt fugleinfluensavaksine.

Influenza som infeksjonsmodell for målstyrte Vaccibody DNA-vaksiner

Vi har av flere grunner valgt influensa som infeksjonsmodell for målstyrte Vaccibody DNA-vaksiner. For det første er en fugleinfluensapandemi en reell trussel med en mulig dødelighet på opp mot 50 %. Produksjon av hønseegg-baserte inaktiverte fugleinfluensavirusvaksiner vil ta minst seks måneder, og vil ikke engang i teorien kunne gi tilstrekkelig med vaksiner for hele jordens befolkning. Videre vil antivirale midler trolig ha en begrenset effekt ved en fugleinfluensaepidemi. Gode vaksinealternativer er derfor viktig. Målstyrte DNA-vaksiner kan ha en misjon i en slik kritisk situasjon, siden en vaksine kan konstrueres og produseres relativt raskt, sannsynligvis innen to–tre måneder. Under den meksikanske svineinfluensapandemien i 2009 produserte og testet Grodeland i Bogen-lab en vaksine i løpet av fem uker. Denne vaksinen beskyttet vaksinerte mus mot svineinfluensa-viruset (Grodeland et al., 2013a). Vi har senere vist at en lignende hemagglutinin-basert DNA-vaksine målstyrt mot MHC klasse II kan beskytte mot fugleinfluenza av type H7 (Andersen et al., 2017). Som nevnt over er en fase I studie planlagt ved Ullevål Universitetssykehus for uttesting av en målstyrt DNA-vaksine for fugleinfluenza i friske forsøkspersoner.

For det andre er det behov for å utvikle en vaksine som kan beskytte mot vanlig sesonginfluenza, år etter år. En slik vaksine kalles en universell influensavaksine. Problemet ved sesonginfluenza er at influensavirus, som er et RNA-virus, muterer meget raskt. Virus som forårsaker dette årets influensaepidemi vil derfor ikke affiseres av immunsvar utløst av fjorårets

vaksine. Nye influensavirus vil derfor kunne forårsake sykdom. En stor utfordring er også at produksjonstiden til dagens vaksiner gjør at man allerede året før må foreta en kvalifisert gjetning av hvilke virus som skal inkluderes i neste års vaksine. Den kvalifiserte gjetningen er basert på enorme mengder data, innhentet fra hele verden, over hvilke influensatyper som sirkulerer. Men det er likevel vanskelig å alltid treffe riktig valg. Senest i 2017 gjorde man en skikkelig bom i så henseende, og vaksinene brukt i Norge var bare rundt 30 % virksomme. Forskere i Bogen-lab har angrepet problemet ved å lage en blanding av målstyrte DNA-vaksiner med seks ulike hemagglutinerer fra forskjellige influensavirus. Resultatet etter immunisering av mus med blandingen er lovende (Anderson et al., 2018), og ytterligere hemagglutinerer fra andre influensavirusstammer vil nå inkluderes i vaksinen.

Individbaserte målstyrte Vaccibody-DNA vaksiner mot kreft

Vaccibody-teknologien er patentert (oppfinnere: Agnete Fredriksen, Inger Sandlie og Bjarne Bogen), og et selskap, Vaccibody AS, ble etablert i 2007. Agnete Fredriksen, en tidligere PhD-stipendiat og postdoktor i Bogen-lab, er vitenskapelig leder av selskapet. Vaccibody AS har utviklet en terapeutisk DNA-vaksine mot forstadier av livmorhalskreft forårsaket av det vanligste papillomviruset, HPV16. To kreftfremkallende virale proteiner, E6 og E7, blir målstyrt med bruk av humant MIP-1 α et Vaccibody DNA format. DNA-vaksinen injiseres intramuskulært med jet-levering (Pharmajet). En fase I studie er gjennomført i Tyskland på kvinner med forstadier til livmorhalskreft, klassifisert som CIN2/3. Vaksinasjonen har vist seg å være skånsom og uten farlige bivirkninger. Immunsvarene (T-celler) var gode, og lesjonene i livmorhalsen regredierte i alle de seks kvinnene som gjennomførte behandlingen og kontroller. Basert på disse lovende resultatene er et fase IIa studium nå igangsatt (<http://www.vaccibody.com/>).

I tillegg til vaksinen mot HPV, utvikler Vaccibody-selskapet også en individbasert kreftvaksine. Basert på helgenom-sekvensering av pasienten og eksom-sekvensering av kreftcellene, kan kreft-spesifikke mutasjoner kartlegges. Man undersøker så om disse muterte sekvensene uttrykkes i proteiner, og om sekvensene binder seg til pasientens HLA klasse I og klasse II molekyler. Muterte sekvenser som oppfyller disse kriteriene settes inn i antigenenheten i Vaccibody-formatet som perler på en snor. Man kan sette inn opp til 20 korte peptider, med koplingssekvenser («linkere») i mellom. Grunnen til at man setter inn korte peptider og ikke hele antigener er at man

ved kreft kun er interessert i å utløse T-celle svar og ikke antistoffer. En fase I studie blir nå initiert i Tyskland (<http://www.vaccibody.com/>).

Takk til bidragsytere

Forfatteren vil takke postdoktorer, stipendiater, Master-studenter, forskerlinje-studenter og ingeniører som i årenes løp har bidratt til utviklingen av målstyrte vaksiner i Vaccibody-formatet i Bogen-lab. Takk går til økonomisk støtte fra Stiftelsen Kristian Gerhard Jebsen, Det Medisinske Fakultet v/Institutt for Klinisk Medisin, Norges Forskningsråd, Helse Sør-Øst, Kreftforeningen og EU. Ranveig Braathen og Gunnveig Grødeland har lest manuskriptet og kommet med forslag til endringer.

Opplysninger om mulig interessekonflikt

Bjarne Bogen er oppfinner på Vaccibody-patentet (US patent no. 8,932,603 B2) og to patentsøknader relatert til Vaccibodies (European patent application no. 10167291.3-1222; US62/352,815). Han er leder av det vitenskapelige rådet i Vaccibody AS og har aksjer i selskapet.

Referanser

- Andersen, T.K., Zhou, F., Cox, R., Bogen, B., and Grodeland, G. (2017). *A DNA Vaccine That Targets Hemagglutinin to Antigen-Presenting Cells Protects Mice against H7 Influenza*. *J Virol* 91.
- Andersen TK, Huszthy PC, Gopalakrishnan RP, Jacobsen JT, Fauskanger M, Tveita AA, Grødeland G, Bogen B. Enhanced germinal center reaction by targeting vaccine antigen to Major Histocompatibility Complex class II molecules. *npj Vaccines*, in press 2019
- Anderson, A.M., Baranowska-Hustad, M., Braathen, R., Grodeland, G., and Bogen, B. (2018). *Simultaneous Targeting of Multiple Hemagglutinins to APCs for Induction of Broad Immunity against Influenza*. *J Immunol* 200, 2057–2066.
- Ardouin, L., Luche, H., Chelbi, R., Carpentier, S., Shawket, A., Montanana Sanchis, F., Santa Maria, C., Grenot, P., Alexandre, Y., Gregoire, C., et al. (2016). *Broad and Largely Concordant Molecular Changes Charac-*

- terize Tolerogenic and Immunogenic Dendritic Cell Maturation in Thymus and Periphery*. *Immunity* 45, 305–318.
- Baranowska, M., Hauge, A.G., Hoornaert, C., Bogen, B., and Grodeland, G. (2015). *Targeting of nucleoprotein to chemokine receptors by DNA vaccination results in increased CD8(+)-mediated cross protection against influenza*. *Vaccine* 33, 6988–6996.
- Braathen, R., Spång, H.C.L., Lindeberg, M.M., Fossum, E., Grødeland, G., Fredriksen, A.B., and Bogen, B. (2018). *The Magnitude and IgG Subclass of Antibodies Elicited by Targeted DNA Vaccines Are Influenced by Specificity for APC Surface Molecules*. *ImmunoHorizons* 2, 38–53.
- Crozat, K., Tamoutounour, S., Vu Manh, T.P., Fossum, E., Luche, H., Ardouin, L., Williams, M., Azukizawa, H., Bogen, B., Malissen, B., *et al.* (2011). *Cutting Edge: Expression of XCR1 Defines Mouse Lymphoid-Tissue Resident and Migratory Dendritic Cells of the CD8⁺ Type*. *The Journal of Immunology* 187, 4411–4415.
- Deloizy, C., Bouguyon, E., Fossum, E., Sebo, P., Osicka, R., Bole, A., Pierres, M., Biacchesi, S., Dalod, M., Bogen, B., *et al.* (2016). *Expanding the tools for identifying mononuclear phagocyte subsets in swine: Reagents to porcine CD11c and XCR1*. *Dev Comp Immunol* 65, 31–40.
- Deloizy, C., Fossum, E., Barnier-Quer, C., Urien, C., Chrun, T., Duval, A., Codjovi, M., Bouguyon, E., Maisonnasse, P., Herve, P.L., *et al.* (2017). *The anti-influenza M2e antibody response is promoted by XCR1 targeting in pig skin*. *Sci Rep* 7, 7639.
- Dutertre, C.A., Jourdain, J.P., Rancez, M., Amraoui, S., Fossum, E., Bogen, B., Sanchez, C., Couedel-Courteille, A., Richard, Y., Dalod, M., *et al.* (2014). *TLR3-responsive, XCR1⁺, CD141(BDCA-3)⁺/CD8 α ⁺-equivalent dendritic cells uncovered in healthy and simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques*. *J Immunol* 192, 4697–4708.
- Fossum, E., Grodeland, G., Terhorst, D., Tveita, A.A., Vikse, E., Mjaaland, S., Henri, S., Malissen, B., and Bogen, B. (2015). *Vaccine molecules targeting Xcr1 on cross-presenting DCs induce protective CD8⁺ T-cell responses against influenza virus*. *European journal of immunology* 45, 624–635.
- Fredriksen, A.B., and Bogen, B. (2007). *Chemokine-idiotype fusion DNA vaccines are potentiated by bivalency and xenogeneic sequences*. *Blood* 110, 1797–1805.
- Fredriksen, A.B., Sandlie, I., and Bogen, B. (2006). *DNA vaccines increase immunogenicity of idiotypic tumor antigen by targeting novel fusion proteins to antigen-presenting cells*. *MolTher* 13, 776–785.

- Fredriksen, A.B., Sandlie, I., and Bogen, B. (2012). *Targeted DNA vaccines for enhanced induction of idiotype-specific B and T cells*. *Front Oncol* 2, 154.
- Froyland, M., Ruffini, P.A., Thompson, K.M., Gedde-Dahl, T., Fredriksen, A.B., and Bogen, B. (2011). *Targeted idiotype-fusion DNA vaccines for human multiple myeloma: preclinical testing*. *European journal of haematology* 86, 385–395.
- Grodeland, G., Fossum, E., and Bogen, B. (2015). *Polarizing T and B Cell Responses by APC-Targeted Subunit Vaccines*. *Frontiers in immunology* 6, 367.
- Grodeland, G., Fredriksen, A.B., Loset, G.A., Vikse, E., Fugger, L., and Bogen, B. (2016). *Antigen Targeting to Human HLA Class II Molecules Increases Efficacy of DNA Vaccination*. *J Immunol* 197, 3575–3585.
- Grodeland, G., Mjaaland, S., Roux, K.H., Fredriksen, A.B., and Bogen, B. (2013a). *DNA Vaccine that Targets Hemagglutinin to MHC Class II Molecules Rapidly Induces Antibody-Mediated Protection against Influenza*. *Journal of Immunology* 191, 3221–3231.
- Grodeland, G., Mjaaland, S., Roux, K.H., Fredriksen, A.B., and Bogen, B. (2013b). *DNA vaccine that targets hemagglutinin to MHC class II molecules rapidly induces antibody-mediated protection against influenza*. *J Immunol* 191, 3221–3231.
- Gudjonsson, A., Lysen, A., Balan, S., Sundvold-Gjerstad, V., Arnold-Schrauf, C., Richter, L., Baekkevold, E.S., Dalod, M., Bogen, B., and Fossum, E. (2017). *Targeting Influenza Virus Hemagglutinin to Xcr1(+) Dendritic Cells in the Absence of Receptor-Mediated Endocytosis Enhances Protective Antibody Responses*. *J Immunol* 198, 2785–2795.
- Guilliams, M., Dutertre, C.A., Scott, C.L., McGovern, N., Sychien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Prijck, S., *et al.* (2016). *Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species*. *Immunity* 45, 669–684.
- Kawamura, H., and Berzofsky, J.A. (1986). *Enhancement of antigenic potency in vitro and immunogenicity in vivo by coupling the antigen to anti-immunoglobulin*. *J Immunol* 136, 58–65.
- Li, L., Saade, F., and Petrovsky, N. (2012). *The future of human DNA vaccines*. *J Biotechnol* 162, 171–182.
- Lovas, T.O., Bruusgaard, J.C., Oynebraten, I., Gundersen, K., and Bogen, B. (2014). *DNA vaccines: MHC II-targeted vaccine protein produced by transfected muscle fibres induces a local inflammatory cell infiltrate in mice*. *PloS one* 9, e108069.

- Lunde, E., Munthe, L.A., Vabo, A., Sandlie, I., and Bogen, B. (1999). *Antibodies engineered with IgD specificity efficiently deliver integrated T-cell epitopes for antigen presentation by B cells*. *NatBiotechnol* 17, 670–675.
- Manam, S., Ledwith, B.J., Barnum, A.B., Troilo, P.J., Pauley, C.J., Harper, L.B., Griffiths, T.G., 2nd, Niu, Z., Denisova, L., Follmer, T.T., *et al.* (2000). *Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA*. *Intervirology* 43, 273–281.
- Mooi P, Koopman G, Andersen TK, Mortier D, Nieuwenhuis IG, Verschoor EJ, Zahra Fagrouch Z, Bogers WM, Bogen B, Grodeland G. Jet delivery of DNA: targeting of hemagglutinin to MHC class II molecules protects rhesus macaques against H1N1 influenza. *Vaccine*, in press 2019
- Oynebraten, I., Hinkula, J., Fredriksen, A.B., and Bogen, B. (2014). *Increased generation of HIV-1 gp120-reactive CD8+ T cells by a DNA vaccine construct encoding the chemokine CCL3*. *PloS one* 9, e104814.
- Oynebraten, I., Lovas, T.O., Thompson, K., and Bogen, B. (2012). *Generation of antibody-producing hybridomas following one single immunization with a targeted DNA vaccine*. *Scandinavian journal of immunology* 75, 379–388.
- Ruffini, P.A., Grodeland, G., Fredriksen, A.B., and Bogen, B. (2010). *Human chemokine MIP1alpha increases efficiency of targeted DNA fusion vaccines*. *Vaccine* 29, 191–199.
- Ruffini, P.A., Os, A., Dolcetti, R., Tjonnfjord, G.E., Munthe, L.A., and Bogen, B. (2014). *Targeted DNA vaccines eliciting crossreactive anti-idiotypic antibody responses against human B cell malignancies in mice*. *J Transl Med* 12, 207.
- Schjetne, K.W., Fredriksen, A.B., and Bogen, B. (2007a). *Delivery of Antigen to CD40 Induces Protective Immune Responses against Tumors*. *The Journal of Immunology* 178, 4169–4176.
- Schjetne, K.W., Fredriksen, A.B., and Bogen, B. (2007b). *Delivery of antigen to CD40 induces protective immune responses against tumors 3*. *J Immunol* 178, 4169–4176.
- Snider, D.P., and Segal, D.M. (1987). *Targeted antigen presentation using crosslinked antibody heteroaggregates*. *J Immunol* 139, 1609–1616.
- Spang, H.C., Braathen, R., and Bogen, B. (2012). *Heterodimeric barnase-barstar vaccine molecules: influence of one versus two targeting units specific for antigen presenting cells*. *PloS one* 7, e45393.
- Tang, D.C., DeVit, M., and Johnston, S.A. (1992). *Genetic immunization is*

- a simple method for eliciting an immune response.* Nature 356, 152–154.
- Terhorst, D., Fossum, E., Baranska, A., Tamoutounour, S., Malosse, C., Garbani, M., Braun, R., Lechat, E., Crameri, R., Bogen, B., *et al.* (2015). *Laser-assisted intradermal delivery of adjuvant-free vaccines targeting XCR1+ dendritic cells induces potent antitumoral responses.* J Immunol 194, 5895–5902.
- Tjelle, T.E., Corthay, A., Lunde, E., Sandlie, I., Michaelsen, T.E., Mathiesen, I., and Bogen, B. (2004). *Monoclonal antibodies produced by muscle after plasmid injection and electroporation.* MolTher 9, 328–336.
- Tollefsen, S., Tjelle, T., Schneider, J., Harboe, M., Wiker, H., Hewinson, G., Huygen, K., and Mathiesen, I. (2002). *Improved cellular and humoral immune responses against Mycobacterium tuberculosis antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation.* Vaccine 20, 3370–3378.
- Tunheim, G., Thompson, K.M., Fredriksen, A.B., Espevik, T., Schjetne, K.W., and Bogen, B. (2007). *Human receptors of innate immunity (CD14, TLR2) are promising targets for novel recombinant immunoglobulin-based vaccine candidates 1.* Vaccine 25, 4723–4734.
- Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., DeWitt, C.M., Friedman, A., *et al.* (1993). *Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein.* Science 259, 1745–1749.
- Zhou, P., Chionh, Y.T., Irac, S.E., Ahn, M., Jia Ng, J.H., Fossum, E., Bogen, B., Ginhoux, F., Irving, A.T., Dutertre, C.A., *et al.* (2016). *Unlocking bat immunology: establishment of Pteropus alecto bone marrow-derived dendritic cells and macrophages.* Sci Rep 6, 38597.

