

Revista Biomédica

<http://revistabiomedica.mx>

Artículo de revisión

Vacunas, adyuvantes y bacteriófagos como vectores vacunales

Natividad Ramírez-Pereda¹, Citlalli Regalado-Santiago¹, Jacob Jonatan Cruz-Sánchez¹, Octavio Rodríguez-Cortés², Patricia González-Cano^{1*}

¹ Instituto de Farmacobiología, Universidad de la Cañada, Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México, ² Sección de estudios de posgrado e investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional. Plan de San Luis y Salvador Diaz Mirón, Santo Tomas, Ciudad de México, México

ABSTRACT

Bacteriophages as vaccine delivery system

Introduction. Throughout history, different vaccines have been designed based on the recognition of epitopes present in the vaccine antigens. However, despite the advances and achievements in vaccinology, to date it has not been possible to develop efficient vaccines against pathogens like the Human Immunodeficiency Virus due to its antigenic complexity. On the other hand, in the last two decades multiple emerging infectious diseases like influenza and the appearance of zika and chikungunya viruses have arisen in the last two decades. Therefore, there is a need for the rational development of new and efficient vaccines that are stable, safe, able to induce a cellular and humoral immune response, and at the same time working as effective vaccine adjuvants to fight infectious diseases.

Objective. Thus, the objective of this review is to exalt the importance of tools like Next Generation Sequencing coupled to reverse vaccinology to identify new vaccine epitopes on infected tissue and expressing them on bacteriophages to design an immunoprotective vaccine which is cheap to produce, safe, stable, and can be administrated without adjuvant.

Methodology. This review was performed with a systematic literature search on the PubMed database related to each topic.

Historial del artículo

Recibido: 15 mar 2020

Aceptado: 28 abr 2020

Disponible en línea: 1 sep 2020

Palabras clave

Vacunas, bacteriófagos, secuenciación de nueva generación, vacunología reversa, adyuvantes.

Keywords

Vaccine, bacteriophage, next generation sequencing, reverse vaccinology, adjuvants

Copyright © 2020 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la *Creative Commons* (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

*Autor para correspondencia:

Patricia González Cano, Instituto de Farmacobiología, Universidad de la Cañada, Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México, CP. 68540. Tel: 5532062876; Fax: 951 1326958.

E-mail: patriciagc@unca.edu.mx

<http://revistabiomedica.mx>

RESUMEN

Introducción. A lo largo de la historia se han diseñado vacunas utilizando epítopenos definidos, presentes en antígenos utilizados para diseñar la vacuna. Sin embargo, a pesar de los avances y logros en el campo de la vacunología, a la fecha no se ha logrado desarrollar vacunas eficientes contra patógenos como el virus de la inmunodeficiencia

humana (VIH) debido a su complejidad antigénica. Por otro lado, en las últimas dos décadas se han presentado enfermedades reemergentes como la influenza y enfermedades emergentes como el zika y chikungunya para las cuales no existe una vacuna. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas vacunas, que sean eficientes, estables, capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular, y que al mismo tiempo funcionen como adyuvantes efectivos para el combate de enfermedades infecciosas.

Objetivo. En este contexto, el objetivo de la presente revisión es resaltar la importancia del uso de técnicas como la secuenciación de nueva generación junto con la vacunología reversa, para la identificación de nuevos epítopos vacunales en tejido infectado y su posterior expresión en vectores vacunales, como los bacteriófagos, para el diseño de vacunas inmunoprotectoras las cuales son baratas y fáciles de producir, seguras y estables, y que además puedan administrarse sin la necesidad de un adyuvante.

Metodología. La presente revisión se realizó haciendo una búsqueda sistemática de bibliografía, por cada uno de los temas a abordar, en la base de datos del PubMed.

INTRODUCCIÓN

La vacunación es un procedimiento simple que implica la aplicación de antígenos (Ags) para inducir una respuesta adaptativa protectora y duradera contra patógenos, minimizando efectos adversos (1). Es la mejor estrategia profiláctica para reducir y erradicar la incidencia de enfermedades infecciosas en humanos y animales alrededor del mundo (2); en humanos, las vacunas no sólo han contribuido a la erradicación de enfermedades como la viruela, sino también a la lucha contra enfermedades infecciosas como la difteria, poliomielitis, hepatitis e influenza entre otras (3). Al prevenir infecciones zoonóticas como rabia, gripe aviar y porcina, brucellosis, salmonelosis y leptospirosis, las vacunas veterinarias no sólo han contribuido a preservar la salud humana (4) sino también a prevenir el sacrificio masivo de rebaños, evitando así pérdidas económicas considerables (5). Sin embargo, a la fecha aún se

necesitan vacunas nuevas y eficientes capaces de inducir una respuesta inmune celular y humoral en ausencia de adyuvante. Aunque inicialmente los bacteriófagos o fagos se utilizaron para combatir infecciones bacterianas, recientemente han sido manipulados genéticamente por *phage display* para expresar Ags como péptidos en la superficie del fago (6) o secuencias codificantes para el Ag deseado, a nivel de ácido desoxirribonucléico (DNA) (7) para su posterior uso como vectores vacunales con el fin de estimular el sistema inmune (8). El tamaño de los fagos le permite al sistema inmune procesarlos como Ags particulados (9) y ser presentados en moléculas de histocompatibilidad (MHC) I y II. Esto sugiere un evento de presentación cruzada, que induce una respuesta inmune celular y humoral contra los Ags expresados por el fago (10), lo que les confiere una gran ventaja para su uso como vectores vacunales. Dado que los fagos utilizados como vectores vacunales no tienen modificación antigénica alguna, aparte de la proteína de fusión expresada en su superficie, tanto la cápside como el material genético le confieren propiedades adyuvantes intrínsecas (11), lo que los convierte en un candidato ideal para el diseño de vacunas. Sin embargo, para diseñar una vacuna eficaz, los epítopos expresados en los fagos deben ser inmunoprotectores (12). Utilizando herramientas como la vacunología reversa (RV) se pueden identificar nuevos Ags distintos a los reportados en la literatura y, una vez identificados, predecir la interacción de dichos epítopos con el sistema inmune (13), garantizando la inducción de una respuesta inmune protectora (14). Sin embargo, es crucial identificar los Ags expresados *in vivo* durante la infección, ya que la identificación de estos Ags reducirá el número de miles de posibles candidatos identificados por RV a unos pocos candidatos potencialmente protectores (15). Este enfoque es ahora posible gracias a técnicas como la secuenciación de nueva generación (NGS), una herramienta que nos permite no sólo identificar fácilmente nuevos candidatos para el diseño de vacunas (16), sino también ayudar a comprender la respuesta del sistema inmune ante un patógeno dado. Esto, quizás, nos proporcionará las herramientas

para manipular la respuesta inmune y así combatir enfermedades infecciosas.

Tipos de Vacunas

Vacunas vivas atenuadas.

Las vacunas vivas atenuadas también han contribuido no sólo a erradicar la viruela, sino también a controlar enfermedades como la poliomielitis, rubéola, sarampión, varicela y fiebre amarilla, entre otras (17). Dado que este tipo de vacuna induce una fuerte respuesta inmune humoral y celular, es una de las formulaciones más eficientes. Los Ags en éstas son patógenos atenuados, que en el caso de los virales se logra mediante múltiples pases en cultivo celular (18). Los patógenos atenuados son inocuos para el huésped, pero capaces de replicarse hasta cierto punto en el huésped inmunocompetente, actuando así como fuente de Ag y reduciendo el número de inmunizaciones necesarias para conferir inmunidad (19). Sin embargo, existe la posibilidad de reversión a virulencia, lo que es preocupante en términos de seguridad de la vacuna (20).

Vacunas inactivadas

Estas vacunas se formulan con patógenos que después de haber sido cultivados y cuidadosamente inactivados mediante tratamiento químico o con temperaturas elevadas, el patógeno pierde viabilidad conservando su inmunogenicidad (21). Se utiliza calor o sustancias químicas como el formaldehído, cuyo mecanismo de acción es el entrecruzamiento de proteínas (22). Como consecuencia de la inactivación, el microorganismo pierde viabilidad mientras preserva la estructura de los Ags de superficie, permitiendo que el sistema inmune los reconozca, procese e induzca una respuesta inmune protectora. Estas vacunas son fáciles de producir y dado que no son infecciosas, se consideran seguras para las personas inmunocomprometidas (23). Sin embargo, se requieren inmunizaciones repetidas para mantener la inmunidad. Entre los ejemplos de este tipo se encuentran la vacuna para hepatitis A, influenza, polio y rabia (24, 25)

Vacunas de toxoide

Las toxinas son metabolitos nocivos secretados por algunas bacterias (26). Después del tratamiento con formaldehído, las toxinas se inactivan y estabilizan, convirtiéndose en toxoides. El tratamiento induce cambios conformacionales menores en epítopos de la toxina (27). Aunque resulta en cierta pérdida de inmunogenicidad, la proteína retiene la mayor parte de su estructura, lo que permite que el sistema inmune la procese, presente y genere una respuesta inmune humoral protectora (28). Sin embargo, algunos efectos secundarios no deseados como enrojecimiento, comezón e inflamación en el sitio de vacunación se han asociado a estas vacunas (29). Ejemplos de estas vacunas son los toxoides diftérico y tetánico (30).

Vacunas de DNA

Las vacunas de DNA se basan en plásmidos que contienen promotores virales para garantizar la expresión de la proteína codificada en células de mamífero (31). Los Ags codificados en el plásmido son el componente principal de la vacuna, mientras que el plásmido de DNA transfectado le confiere a éstas propiedades adyuvantes intrínsecas que estimulan el sistema inmune a través del receptor tipo toll (TLR) 9 (32). Tanto los vectores como los Ags, así como las estrategias de vacunación se han optimizado y en conjunto han contribuido a mejorar la inmunogenicidad de la vacuna en comparación con las primeras vacunas de DNA (33). Los Ags codificados inducen una respuesta de células T CD8 que contribuye a la eliminación de patógenos intracelulares (34). Las vacunas de DNA son fáciles de producir, a bajo costo en comparación con las vacunas convencionales, son estables a temperatura ambiente, importante para su transporte y almacenamiento y son muy seguras (35), por lo que se han sugerido como una estrategia prometedora para el diseño de vacunas contra la tuberculosis, VIH y dengue (36).

Vacunas subunitarias

Las vacunas subunitarias se formulan con Ags como proteínas, péptidos, polisacáridos o un conjugado de proteína-polisacárido altamente

purificados (37); éstos son más seguros que las vacunas vivas atenuadas o inactivadas (38), sin embargo, se degradan rápidamente, son pobemente captadas por las células presentadoras de antígeno (APC) y su immunogenicidad es limitada debido a su incapacidad para estimular los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) tales como la familia los TLR (11). Por lo tanto, la respuesta inducida por estas vacunas es débil y ofrece poca protección en comparación con las atenuadas e inactivadas. Además, su efectividad depende del Ag utilizado (39) por lo que, se requieren adyuvantes en su formulación para mejorar y mantener la respuesta inmune contra el Ag vacunal (40). A pesar de su baja immunogenicidad, éstas son seguras para las personas inmunocomprometidas, ya que a diferencia de las vacunas atenuadas, no revierten y tienen menos efectos adversos (23). Entre los ejemplos de estas vacunas se encuentran las de los virus de la influenza H5N1, Epstein-Barr y papiloma humano serotipo 16 (41).

Adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias capaces de modular la respuesta inmune (42) mejorando la presentación de Ag a distintas poblaciones celulares. Utilizando pequeñas dosis de Ag se induce tanto una respuesta inmune celular como humoral contra el patógeno deseado confiriendo protección a largo plazo y reduciendo la necesidad de inmunizaciones repetidas (43).

A la fecha existen pocos adyuvantes autorizados para uso humano, ya que se deben considerar algunos puntos clave. Los candidatos a adyuvante deben ser estables, con una larga vida de anaquel (44), capaces de promover una respuesta inmune específica contra el Ag deseado, sin inducir efectos adversos tras la vacunación; poseer niveles aceptables de tolerabilidad, y lo más importante, su bioseguridad; sin embargo, durante su desarrollo, muchos adyuvantes no logran cumplir con estos requisitos (45). Una vez que se obtiene un candidato a adyuvante, es importante comprender su mecanismo de acción y la manera en que desencadena la respuesta inmune, ya que el conocimiento adecuado

de éstos nos permitirá manipular la respuesta hacia una respuesta inmune celular o humoral (46).

Las vacunas subunitarias no inducen una respuesta robusta, en comparación con las formuladas con microorganismos vivos atenuados o inactivados, por lo tanto, es necesario agregar un adyuvante a la formulación para mejorar su immunogenicidad mediante el mejoramiento de la presentación del Ag (47). Dependiendo del adyuvante, se logra una respuesta inmune celular y/o humoral a largo plazo, lo que reduce el número de inmunizaciones necesarias para conferir inmunidad (48). Aunque su mecanismo de acción no se comprende completamente, aquí se describen brevemente algunos adyuvantes.

Alumbre

Los compuestos a base de aluminio como el hidróxido de aluminio, el fosfato de aluminio y el sulfato de aluminio se conocen colectivamente como alumbre. El alumbre fue el único adyuvante utilizado en vacunas humanas y veterinarias durante casi 70 años (49). La formulación del fosfato de aluminio se realiza mezclando NaH_2PO_4 y cloruro de aluminio y agregando lentamente NaOH hasta mantener un pH constante de 5.5 con el que se consigue un precipitado homogéneo con gran capacidad de retención y agregación de proteínas (50, 51). Aunque no se considera el adyuvante más seguro para todas las vacunas, es el más utilizado en vacunas humanas (45). Inicialmente, se creía que el alumbre creaba un efecto de depósito liberando lentamente el Ag y aumentando el tiempo de exposición al sistema inmune (52). Ahora se sabe que, tras la vacunación, los adyuvantes de alumbre tienden a formar cristales que son fagocitados por las APC dañando los lisosomas y liberando catepsina B en el citoplasma, la cual es detectada por los dominios NACHT, LRR y PYD contenidos en la proteína 3 del inflamasoma NALP3 o NLRP3 (53). Una vez activado, el NLRP3 se oligomeriza y posteriormente recluta las proteínas adaptadoras de ASC que contienen un dominio de reclutamiento de caspasas en el extremo carboxi-terminal (CARD), el dominio CARD reclutará caspasa 1 a través de las interacciones CARD-CARD dando como resultado

la activación del inflamasoma, una estructura que también se forma en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos (54). En respuesta a la activación del inflamasoma vía NLRP3, se producen Interleucinas (IL)-1 e IL-18 (55) promoviendo una respuesta inmune TH2, que favorece la activación de células B y la consecuente producción de anticuerpos (Ab) (56). Aunque el alumbre es bueno para inducir una respuesta inmune humorar, no induce una buena respuesta inmune celular (57).

MF59

MF59 es el segundo adyuvante autorizado para uso humano; es seguro a base de agua y aceite formulado con 4.3 % escualeno proveniente de hígado de tiburón; 0.5 % Tween 80 y 0.5 % Span 85, ambos tensioactivos no iónicos utilizados como emulgentes (49). MF59 se autorizó por primera vez como adyuvante para las vacunas contra la influenza en 1997 (58) y desde entonces se ha utilizado ampliamente para formulaciones de vacunas humanas y veterinarias (45). Se ha demostrado que es seguro de usar en ancianos, bebés, mujeres embarazadas e individuos inmunocomprometidos, induciendo títulos de Ab más altos que el alumbre (59). El mecanismo de acción propuesto es inducir la secreción de quimiocinas como IL-8, proteína quimioatractante de monocitos-1, (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α y MIP-1 β que intervienen en el reclutamiento de monocitos; tras su activación, los monocitos producirán el mismo patrón de citocinas creando un asa de amplificación y la diferenciación de monocitos a células dendríticas (DC) (60). Las DC regularán positivamente la expresión no solo del grupo de genes del Antígeno Leucocitario Humano (HLA) que codifica para el MHC, sino también de moléculas de coestimulación para la activación adecuada de linfocitos T y B (61), mientras migran al nódulo linfoide más cercano para iniciar la respuesta inmune adaptativa. Recientemente, se ha observado la activación de caspasa 1 independiente de la activación del NLRP3, lo que indica que una vía alterna de activación del inflamasoma podría estar involucrada en el mecanismo de acción del MF59. Sin embargo, se

requieren más estudios para elucidar el mecanismo de acción de este adyuvante (52).

PCEP

Desde su síntesis en 2006 por el grupo del Dr. Chen, el adyuvante poli (di (carboxilato-etilfenoxi) fosfazeno) o PCEP, un adyuvante soluble en agua, demostró fuertes propiedades inmunomoduladoras (para información detallada sobre su formulación consulte Adrianov et al, 2006) (62), modulando la respuesta inmune innata en el sitio de inyección. A diferencia de otros adyuvantes, induce la activación de genes que codifican para citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-18 y el receptor 4 de linfotoxina β (LTBR4), citocinas que contribuyen al reclutamiento de poblaciones de células mieloídes en el sitio de inyección (56, 63). Este adyuvante se encuentra en etapa experimental, por lo que su uso está restringido a experimentos de vacunación en modelos animales.

Vacunas recombinantes y sus propiedades adyuvantes intrínsecas

El DNA plasmídico para el diseño de vacunas ha sido manipulado genéticamente para expresar epítopos definidos de un patógeno deseado (21), se introduce en vectores vacunales como levaduras, bacterias, insectos, células de mamífero (64) o bacteriófagos (65, 66) para producir vacunas recombinantes. Debido a su complejidad antigenica, los vectores de vacuna tienen propiedades adyuvantes intrínsecas que inducen una respuesta inmune celular y humorla protectora (64).

Bacteriófagos como Vectores Vacunales

Los bacteriófagos o fagos son virus que sólo infectan bacterias y por lo tanto, se consideran seguros para las células eucariotas. Fueron descritos en 1896 por Ernest Hanbury Hankin como una sustancia en el filtrado de agua capaz de lisar a *V. cholerae* (67). Aunque los fagos son los organismos más abundantes en el planeta, no fue sino hasta 1923 que se exploró su potencial como agentes terapéuticos o terapia de fagos (68). Inicialmente se usaron para combatir infecciones bacterianas, pero su uso como agentes antimicrobianos se suspendió debido al

auge de la era de los antibióticos (69). Sin embargo, con la aparición de cepas multidrogoresistentes, la terapia con fagos ha recuperado importancia en el combate de infecciones bacterianas en humanos y animales (70).

Los fagos también se han utilizado para estudiar aspectos fundamentales de la biología molecular, para identificar bacterias patógenas y más recientemente los bacteriófagos se han manipulado genéticamente mediante *phage display* para expresar Ags peptídicos en su cápside para su utilización como vectores vacunales (6) o como vectores para vacunas de DNA (7). Descritos por primera vez en 1985 por Smith, G., el *phage display* es una herramienta poderosa basada en la ingeniería genética, mediante la modificación de los genes de fagos que codifican proteínas de la cápside para expresar péptidos y fragmentos de anticuerpos como proteínas de fusión en la superficie del fago (71). Fagos como el Fd (72), lambda (65, 66) y M13 (73) son los vectores más utilizados para el *phage display*, de los cuales, M13 es el vector más utilizado para el desarrollo de fármacos, anticuerpos y vacunas (74), es un fago filamentoso de DNA monocatenario que codifica cinco proteínas estructurales pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX (75). Los Ags exógenos son fusionados mediante un espaciador de ocho a diez aminoácidos en el carboxilo terminal de la proteína PIII, por lo que se expresan eficientemente en la superficie del fago (76); el *display* resultante expresa tanto las proteínas PIII nativas como las proteínas PIII de fusión. Esta estrategia asegura tanto la estabilidad del *display* como la interacción eficiente de los Ags presentados (8). El M13 también ha sido genéticamente manipulado, para su uso como vector de vacunas de DNA, al introducir múltiples genes de interés en su genoma (77). Expresando un dominio de transducción de péptido-proteína proveniente del VIH tipo 1 (péptido TAT) en la cápside del fago (7), se favorece la captación del fago mediante la vía endocítica; la internalización del fago por esta vía incrementa la captación de vacunas de DNA y su expresión en la célula blanco. Como resultado, el *display* en fagos induce una fuerte respuesta inmune celular y humorral a los Ags codificados (77).

Aunque los parámetros necesarios para inducir una respuesta inmune protectora y robusta no están completamente claros, se sabe que los Ags particulados son importantes para el diseño de vacunas, siendo el tamaño de la partícula un factor crítico que afecta la inmunogenicidad de la vacuna (11), es decir, el tamaño es determinante en el resultado de la respuesta inmune (47). Mientras que las nanopartículas (< 200 nm) son internalizadas vía macropinocitosis, las micropartículas ($\geq 1\mu\text{m}$) se internalizan vía fagocitosis en células del sistema inmune como monocitos, células B y DC y por endocitosis mediada por receptores en células no pertenecientes al sistema inmune (11). Debido a su tamaño, el sistema inmune procesa los bacteriófagos como Ags particulados (9) y después de su internalización se han observado en el compartimento endosomal, entre 15 y 60 minutos después de su inyección (78). Un estudio que analizó el procesamiento del bacteriófago filamentoso Fd demostró que puede presentarse tanto en el contexto de MHC I como MHC II, lo que sugiere un evento de presentación cruzada. Este proceso permite presentar Ags extracelulares en moléculas de MHC I obteniéndose una respuesta inmune de CD8 contra esos Ags (10). Así, los bacteriófagos ofrecen la ventaja de inducir una respuesta inmune tanto de CD4 como de CD8 contra el *display* expresado en el fago, característica que exalta su potencial como vectores vacunales (10). M13 cuyo tamaño es de aproximadamente 800 nm de longitud por 6.6 nm de diámetro (79) puede considerarse como Ag particulado ideal para la administración de vacunas (8). Dado que los fagos utilizados como vectores vacunales no tienen ninguna modificación antigénica que no sea la proteína de fusión expresada en su superficie, conservan sus patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (80) tales como glicoproteínas de superficie y el DNA que son reconocidos por los PRR en células del sistema inmune. Esto confiere propiedades adyuvantes intrínsecas a las vacunas diseñadas con fagos, una característica deseable además de su ventaja intrínseca como Ags particulados (11). Estas interacciones activan

el sistema inmune innato mediante una vía dependiente de la proteína adaptadora MyD88 (Respuesta primaria de diferenciación mieloide 88) (81) colocando a los bacteriófagos como un candidato ideal para la administración de vacunas. Tanto el tamaño del bacteriófago que le permite ser presentado como antígeno particulado, así como su estructura la cual activa al sistema inmune y le confiere propiedades adyuvantes, han demostrado ser de gran utilidad para el diseño de vacunas recombinantes. Esto se ha demostrado utilizando el fago lambda como vector vacunal para expresar Ags inmunodominantes del circovirus porcino 2. En este modelo se demostró que la vacunación parenteral con este *display*, en ausencia de adyuvante, induce la producción de Abs neutralizantes dirigidos contra los Ags del circovirus (66). Similarmente, en un modelo bovino se demostró que la vacunación con lambda *display* expresando epítopos crípticos de la proteína priónica, al ser administrado en mucosas en ausencia de adyuvante, induce una respuesta de Abs IgA específicos contra los epítopos desplegados (65).

Vacunología reversa (RV)

El éxito de cualquier vacuna recombinante depende de la selección correcta del Ags. A diferencia de la selección convencional de Ags basada en la secuencia de proteínas, la RV analiza el genoma del patógeno, en busca de nuevos epítopos, utilizando herramientas *in silico* para identificar factores de virulencia secretados o proteínas transmembranales que sirvan como nuevos candidatos potenciales para el diseño de vacunas (82). Usando la RV se evita el desarrollo empírico de vacunas, el cual sigue las reglas básicas de la vacunología que consisten en el cultivo y crecimiento del agente causal, su inactivación, la formulación de la vacuna y la comprobación de su inmunogenicidad mediante ensayos de prueba y error (13), un proceso que resulta lento, tedioso y en la mayoría de los casos ineficiente para el desarrollo de nuevas vacunas (83).

El uso de la RV ha permitido la identificación de Ags para el diseño de vacunas diferentes a los reportados en la literatura (84). Este análisis no sólo permite la identificación de nuevos epítopos, sino que además predice su interacción con el sistema inmune (13). A las proteínas/péptidos identificados mediante RV se les predice el sitio de unión al Ab y posteriormente se prueban en modelos animales. Este enfoque reduce significativamente el tiempo y costo necesarios para obtener las vacunas (83, 85). Sin embargo, estas vacunas recombinantes son poco inmunogénicas (38) y requieren la incorporación de un adyuvante en su formulación para mejorar la inmunogenicidad (40).

El éxito en el diseño de vacunas efectivas se basa en la comprensión de los mecanismos de respuesta inmune inducidos por la vacuna o el adyuvante, en la unión del Ag a la célula efectora la cual determina el tipo de respuesta inmune que se generará, pero principalmente en la identificación de epítopos inmunogénicos e inmunoprotectores (12). Otro aspecto a considerar durante el diseño de vacunas es la conformación del epítopo, es decir, si éstos son lineales (una secuencia continua de aminoácidos) o conformacionales (secuencia discontinua de aminoácidos) que adquieren una estructura tridimensional (86). La conformación de los epítopos determina su capacidad para estimular selectivamente determinadas poblaciones celulares; mientras que los lineales se unen a las células T cuando se presentan en las moléculas de MHC I o MHC II, la mayoría de los epítopos que se unen al receptor de células B (aproximadamente el 90%) son epítopos conformacionales (87). Por lo tanto, identificar el epítopo lineal o conformacional es una estrategia útil para que las vacunas basadas en epítopos induzcan una respuesta inmune celular o humoral protectora (88). Se han descrito más de 6000 moléculas del MHC (89) y a pesar del polimorfismo entre las poblaciones humanas, existen alelos de HLA promiscuos capaces de unir el mismo péptido, lo que hace posible cubrir a la gran mayoría de la población humana independientemente del HLA expresado (90). La identificación de tales epítopos proporciona un enfoque más racional para el diseño

de vacunas basadas en ellos (17, 91), garantizando la inducción de una respuesta inmune protectora (14). Se han diseñado diferentes herramientas *in silico* para predecir la inmunogenicidad de los epítopos de patógenos eucariotas y procariotas (92). A pesar de que esas herramientas reducen el tiempo y el costo del diseño de vacunas, su principal limitación es que no se considera la función y la patogenicidad de los candidatos a Ag. Se han diseñado nuevas herramientas que identifiquen Ags de superficie, lo que facilita la identificación de posibles candidatos para el diseño de vacunas (93). En la **tabla 1**, se indican algunas de las compañías que proporcionan

herramientas bioinformáticas utilizadas para la identificación de epítopos de células B y T. Para una revisión más detallada de las mismas consultar la referencia (94). Estas herramientas también podrían usarse para diseñar vacunas de epítopos múltiples fusionando diferentes péptidos antigenicos de un solo patógeno o diferentes patógenos y expresándolos en un vector adecuado como los fagos, que podrían funcionar como un adyuvante al mismo tiempo (88). Esta estrategia facilitaría el diseño racional de las vacunas, evitando al mismo tiempo la necesidad del uso de adyuvantes.

Tabla 1. Compañías que ofrecen herramientas bioinformáticas para la búsqueda, selección y optimización de epítopos vacunales para el diseño racional de vacunas.

Compañía y Herramienta Bioinformática	Característica de la compañía y/o de los algoritmos	Referencia
IEDB	Immune Epitope Database Analysis Resource. Compañía dedicada a la predicción de epítopos para células B y T, utiliza una base de datos de éstos que han sido comprobados previamente.	95
ProInmune	Se encarga de la caracterización de antígenos. La compañía ofrece servicio de predicción de epítopos para MHC I y MHC II.	96
EpiVax	Compañía encargada de la búsqueda y optimización de epítopos vacunales los cuales pueden estimular selectivamente diferentes poblaciones celulares.	97
EpiMatrix	Algoritmo encargado de predecir la inmunogenicidad de epítopos presentes en el antígeno de interés.	98
JanusMatrix	Algoritmo diseñado para prevenir el desarrollo de una reacción autoinmune mediante el escaneo del epítopo vacunal seleccionado contra una base de datos de Ag propios.	99
ClustiMer	Que mide la habilidad de los epítopos predichos por EpiMatrix para unirse a un mayor número de MHC para posteriormente hacer una búsqueda de esos epítopos en otras regiones del Ag.	100
JanusMatrix	Una vez seleccionados los epítopos para células T utilizando EpiMatrix, este algoritmo busca reactividad cruzada con microorganismos comensales, otros patógenos y componentes propios; además de predecir qué población de células T responderá al mismo, contribuyendo al desarrollo de vacunas más seguras y efectivas.	101
Conservatrix	Algoritmo que busca epítopos conservados entre diferentes cepas de patógenos.	102
EpiAssembler	Una vez que se han identificado los epítopos inmunogénicos, se analiza la secuencia que flanquea al epítopo para obtener la secuencia consenso, el análisis se realiza tanto en el extremo amino como en el carboxilo del epítopo; el ensamble de la secuencia consenso incrementa la probabilidad de que el epítopo seleccionado se une al MHC, haciendo más accesible al Receptor de Células T o TCR.	103

Además de lo anterior, es crucial identificar las proteínas expresadas *in vivo* durante la infección, ya que la identificación de estos Ags reducirá el número de miles de posibles candidatos identificados por RV a pocos candidatos a Ags potencialmente protectores (15). La identificación de estos Ags a partir de tejido infectado es ahora posible gracias a técnicas como la NGS, una herramienta que nos permitirá no sólo identificar fácilmente nuevos candidatos a Ag para el diseño de vacunas, sino también contribuir a la comprensión de cómo responde el sistema inmune ante un patógeno dado y quizás también nos proporcione las herramientas para manipular la respuesta inmune a fin de combatir enfermedades infecciosas.

Secuenciación de nueva generación y diseño de vacunas

La NGS, también conocido como secuenciación paralela o *deep sequencing*, es una técnica mucho más barata y rápida, la cual ha permitido a los investigadores realizar estudios completos del genoma los cuales no se podrían haber logrado con la secuenciación de primera generación. NGS es una tecnología de secuenciación de DNA que se está convirtiendo rápidamente en una herramienta importante en el campo de la vacunología; consiste en la preparación de una biblioteca genómica, y la secuenciación y análisis de las secuencias. Esta técnica es capaz de generar hasta 1.5×10^8 secuencias en una sola corrida y los resultados se pueden utilizar para dilucidar el genoma, el transcriptoma, las modificaciones epigenéticas y realizar análisis metagenómicos, entre otras aplicaciones (104). Una vez realizado el análisis de las secuencias y empleando algoritmos bioinformáticos, las proteínas expuestas en la superficie del patógeno o las proteínas secretadas al medio extracelular pueden ser identificadas y servir como blancos potenciales para el diseño de vacunas, ya que es más probable que éstas sean expuestas al sistema inmune del huésped (16). Sin embargo, para diseñar vacunas eficaces, también es importante comprender la respuesta que el patógeno utiliza para evadir la respuesta inmune del huésped (96). Así, determinar

la variabilidad genética entre cepas de patógenos (105) o identificar las proteínas expresadas durante la etapa aguda y crónica de la infección (106) es crucial para la identificación de nuevos blancos antigenicos que no posean homología con proteínas en humano o animal; una estrategia de gran utilidad para mejorar la seguridad y eficacia de la vacuna (16). Como se mencionó anteriormente, una vez que se han identificado los epítopos para el desarrollo de la vacuna, se predice la inmunogenicidad utilizando diferentes algoritmos desarrollados para predecir su capacidad de unirse a las moléculas MHC I o MHC II, independientemente de su polimorfismo, cubriendo la mayor parte de la población (107).

CONCLUSIÓN

Las vacunas han sido la estrategia más efectiva para prevenir enfermedades humanas y animales. Hoy, sin embargo, se necesitan vacunas más efectivas contra nuevos agentes infecciosos emergentes o para enfermedades en las que el uso de organismos vivos atenuados no es posible debido a problemas de bioseguridad o donde la complejidad intrínseca del microorganismo aún no se comprende. El uso de herramientas como la RV junto con NGS en muestras de tejido infectado constituye una estrategia prometedora para identificar nuevos epítopos que sean seguros e inmunoprotectores para el diseño racional de vacunas mediante *phage display* utilizando bacteriófagos como vectores vacunales. El uso de bacteriófagos como vectores vacunales ofrece muchas características atractivas; debido a su tamaño, el fago se procesará como Ag particulado y se presentará tanto en moléculas de MHC I y MHC II, asegurando el establecimiento de una respuesta inmune celular y humoral. Dado que los fagos poseen propiedades adyuvantes intrínsecas, pueden inducir una respuesta inmune protectora en ausencia de adyuvante. Los bacteriófagos también cumplen con las características de una vacuna ideal, como la seguridad ya que no infectan células de eucariontes, su administración puede ser libre de agujas, ya que sobreviven el paso por el tracto gastrointestinal, son termoestables y baratas de producir. Por lo tanto,

los bacteriófagos son el vector ideal para el diseño racional de vacunas.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con el apoyo de PRODEP número: 511-6/18-8474.

REFERENCIAS

1. Clem AS. Fundamentals of Vaccine Immunology. *J Global Infect Dis.* 2011 Jan-Mar; 3(1): 73-8. doi:10.4103/0974-777x.77299.
2. Greenwood B. The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014 May; 369(1645):20130433. doi: 10.1098/rstb.2013.0433.
3. Pastoret PP and Jones P. Veterinary vaccines for animal and public health. *Dev Biol (Basel).* 2004; 119:15-29. PMID: 15742615.
4. Paul-Pierre P. Emerging diseases, zoonoses and vaccines to control them. *Vaccine.* 2009 Jun; 27(46):6435-38. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.06.021.
5. Mayr A. [Vaccination of animals and human health]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B.* 1985 Feb; 180(2-3): 175-89. German. PMID: 2986381
6. Goulart LR and de S. Santos P. Strategies for Vaccine Design Using Phage Display-Derived Peptides, in *Vaccine Design: Methods and Protocols, Volume 2: Vaccines for Veterinary Diseases.* S. Thomas, Editor. 2016, Springer New York: New York, NY. p. 423-435.
7. Wadia J, Eguchi A and Dowdy SF. DNA delivery into mammalian cells using bacteriophage lambda displaying the TAT transduction domain. *Cold Spring Harb Protoc.* 2013 (1). doi:10.1101/pdb.prot072660.
8. Aghebati Maleki L, Bakhshineja B, Baradaran B, Motallebnezhad M, Aghebati Maleki A, Nickho H, et al., Phage display as a promising approach for vaccine development. *J Biomed Sci.* 2016 Sep; 23(1): 66. doi:10.1186/s12929-016-0285-9.
9. Gorski A, Miedzybrodzki R, Jonczyk-Matysiak E, Zaczek M and Borysowski J. Phage-specific diverse effects of bacterial viruses on the immune system. *Future Microbiol.* 2019 Sep; 14(14):1171-74. doi: 10.2217/fmb-2019-0222
10. Gaubin M, Fanutti C, Mishal Z, Durrbach A, De Berardinis P, Sartorius R., et al. Processing of filamentous bacteriophage virions in antigen-presenting cells targets both HLA class I and class II peptide loading compartments. *DNA and Cell Biology.* 2003 Jan; 22(1):11-18. doi: 10.1089/10445490332112451
11. Slutter B and Jiskoot W. Sizing the optimal dimensions of a vaccine delivery system: a particulate matter. *Expert Opin Drug Deliv.* 2016. 13(2): 167-70. doi:10.1517/17425247.2016.1121989.
12. Kulkarni-Kale U, Bhosle S and Kolaskar AS. CEP: a conformational epitope prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2005. 33 (Web Server issue): W168-171. doi:33/suppl_2/W168 [pii]10.1093/nar/gki460.
13. Rinaudo CD, Telford JL, Rappuoli R and Seib KL. Vaccinology in the genome era. *J Clin Invest.* 2009. 119(9): 2515-25. doi:38330 [pii]10.1172/JCI38330.
14. Baxter D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occup Med (Lond).* 2007 Dec; 57(8): 552-56. doi:10.1093/occmed/kqm110.
15. Rollenhagen C, Sorensen M, Rizos K, Hurvitz R and Bumann D. Antigen selection based on expression levels during infection facilitates vaccine development for an intracellular pathogen. *Proc Natl Acad Sci.* 2004 Jun; 101(23): p. 8739-44. doi: 10.1073/pnas.0401283101[pii].
16. Prachi P, Donati C, Masciopinto F, Rappuoli R and Bagnoli F. Deep sequencing in pre- and clinical vaccine research. *Public Health Genomics.* 2013;16(1-2):62-8. doi: 10.1159/000345611. Epub 2013 Mar 18. PMID: 23548719.
17. Kool M, Fierens K and Lambrecht BN. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. *J Med Microbiol.* 2012. 61(7):927-34. doi:10.1099/jmm.0.038943-0.
18. Lauring AS, Jones JO and Andino R. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nat Biotechnol.* 2010 Jun; 28(6):573-79. doi: 10.1038/nbt.1635.
19. Lin IY, Van TT and Smooker PM. Live-Attenuated Bacterial Vectors: Tools for Vaccine and Therapeutic Agent Delivery. *Vaccines (Basel).* 2015. 3(4): 940-72. doi: 10.3390/vaccines3040940.
20. Hanley KA. The double-edged sword: How evolution can make or break a live-attenuated virus vaccine. *Evolution.* 2012 Dec; 4(4):635-43. doi:10.1007/s12052011-0365-y.
21. Plotkin S. History of vaccination. *Proc Natl Acad Sci.* 2014 Aug; 111(34): 12283-87 doi: 10.1073/pnas.1400472111.
22. Patronov A and Doytchinova I. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biology.* 2013 Jun; 3(1):120139. doi:10.1098/rsob.120139.
23. Arvas A. Vaccination in patients with immunosuppression. *Turk Pediatr Ars.* 2014 Sep; 49(3): 181-5. doi: 10.5152/tpa.2014.2206
24. Sridhar S, Brokstad KA and Cox RJ. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines.* 2015 Apr; 3(2):373-89. doi:10.3390/vaccines3020373.
25. Stauffer F, El-Bacha T, Da Poian AT Advances in the Development of Inactivated Virus Vaccines. In *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.* 2006. 1(3): 291-6. doi:10.2174/15748910677877673.
26. Kotloff KL, Wasserman SS, Losonsky GA, Thomas Jr W, Nichols R, Edelman R., et al., Safety and Immunogenicity of Increasing Doses of a Clostridium

- difficile Toxoid Vaccine Administered to Healthy Adults. *Infect Immun.* 2001 Feb; 69(2): 988-95. doi:10.1128/iai.69.2.988-995.2001.
27. Wilton T, Dunn G, Eastwood D, Minor PD and J. Martin J. Effect of formaldehyde inactivation on poliovirus. *J Virol.* 2014. Aug; 88(20):11955-64. doi: 10.1128/jvi.01809-14.
 28. Lipinski T, Fitieh A, St Pierre J, Ostergaard HL, Bundle DR, Touret N. Enhanced immunogenicity of a tricomponent mannan tetanus toxoid conjugate vaccine targeted to dendritic cells via Dectin-1 by incorporating beta-glucan. *J Immunol.* 2013 Apr; 190(8):4116-28. doi:10.4049/jimmunol.1202937.
 29. Yu R, Fang T, Liu S, Song X, Yu C, Li J, et al. Comparative Immunogenicity of the Tetanus Toxoid and Recombinant Tetanus Vaccines in Mice, Rats, and Cynomolgus Monkeys. *Toxins (Basel).* 2016 Jun; 8(7):194. doi: 10.3390/toxins8070194
 30. Patronov A, Doytchinova I. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biol.* 2013 Jan; 3(1):120139. doi: 10.1098/rsob.120139
 31. Coban C, Kobiyama K, Jounai N, Tozuka M, Ishii KJ. DNA vaccines: a simple DNA sensing matter? *Hum Vaccin Immunother.* 2013 Oct; 9(10):2216-21. doi: 10.4161/hv.25893.
 32. Dalpke AH, Heeg K. CpG-DNA as immune response modifier. *Int J Med Microbiol.* 2004 Oct; 294(5):345-54. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.07.005.
 33. Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, Weiner DB. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin Infect Dis.* 2011 Aug;53(3):296-302. doi: 10.1093/cid/cir334.
 34. Harty JT, Bevan MJ. Responses of CD8+ T cells to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol.* 1999 Jun; 11(1):89-93. doi:10.1016/S0952-7915(99)80016-8.
 35. Liu MA. DNA vaccines: a review. *J Intern Med.* 2003 Apr; 253(4):402-10. doi: 10.1046/j.1365-2796.2003.01140.x
 36. Khan KH. DNA vaccines: roles against diseases. *Germs.* 2013 Mar; 3(1):26-35. doi: 10.11599/germs.2013.1034.
 37. Tan M, Jiang, X Recent advancements in combination subunit vaccine development. *Hum Vaccin Immunother.* 2017 Jan; 13(1):180-5. doi: 10.1080/21645515.2016.1229719.
 38. Moyle PM, Toth I. Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities. *Chem Med Chem.* 2013 Jan; 8(3):360-76. doi: 10.1002/cmdc.201200487.
 39. Vartak A, Sacheck SJ. Recent Advances in Subunit Vaccine Carriers. *Vaccines (Basel).* 2016 Apr;4(2):12. doi: 10.3390/vaccines4020012.
 40. Foged C. Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems. *Ther Deliv.* 2011 Aug; 2(8):1057-77. doi: 10.4155/tde.11.68.
 41. Wang M, Jiang S, Wang Y. Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. *Bioengineered.* 2016 Apr;7(3):155-65. doi: 10.1080/21655979.2016.1191707
 42. Garcon N, Leroux G, Cheng WF. Vaccine Adjuvants in Understanding Modern Vaccines Perspectives in Vaccinology, 2011 Aug; 89-113. doi.org/10.1016/j.pervac.2011.05.004
 43. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity.* 2010 Oct;33(4):492-503. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.002
 44. Mohan T, Verma P, Rao DN. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *Indian J Med Res.* 2013 Nov;138(5):779-95. PMID: 24434331; PMCID: PMC3928709.
 45. Gupta RK, Relyveld EH, Lindblad EB, Bizzini B, Ben-Efraim S, Gupta CK. Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine.* 1993;11(3):293-306. doi: 10.1016/0264-410x(93)90190-9.
 46. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol.* 2013 May; 4:114. doi: 10.3389/fimmu.2013.00114.
 47. Snapper CM. Distinct Immunologic Properties of Soluble Versus Particulate Antigens. *Front Immunol.* 2018 Mar; 9:598. doi: 10.3389/fimmu.2018.00598.
 48. O'Hagan DT, Friedland LR, Hanon E, Didierlaurent AM. Towards an evidence based approach for the development of adjuvanted vaccines. *Curr Opin Immunol.* 2017 Aug; 47:93-102. doi: 10.1016/j.co.2017.07.010
 49. O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, Rappuoli R, Giudice GD. The history of MF59® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev Vaccines.* 2013 Jan;12(1):13-30. doi: 10.1586/erv.12.140.
 50. Burrell LS, Johnston CT, Schulze D, Klein J, White JL, Hem SL. Aluminium phosphate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part I: composition and structure. *Vaccine.* 2000 Sep;19(2-3):275-81. doi: 10.1016/s0264-410x(00)00160-2.
 51. Burrell LS, Johnston CT, Schulze D, Klein J, White JL, Hem SL. Aluminium phosphate adjuvants prepared by precipitation at constant pH. Part II: physicochemical properties. *Vaccine.* 2000 Sep;19(2-3):282-7. doi: 10.1016/s0264-410x(00)00162-6
 52. De Gregorio E, Caproni E, Ulmer JB. Vaccine adjuvants: mode of action. *Front Immunol.* 2013 Jul;4:214. doi: 10.3389/fimmu.2013.00214
 53. Lambrecht BN, Kool M, Willart MA, Hammad H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol.* 2009 Feb;21(1):23-9. doi: 10.1016/j.co.2009.01.004
 54. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2019 Apr; 19(8):477-89. doi: 10.1038/s41577-019-0165-0.

55. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* 2013 Jun;13(6):397-411. doi: 10.1038/nri3452.
56. Awate S, Wilson HL, Lai K, Babiuk LA, Mutwiri G. Activation of adjuvant core response genes by the novel adjuvant PCEP. *Mol Immunol.* 2012 Jul;51(3-4):292-303. doi: 10.1016/j.molimm.2012.03.026.
57. Schijns VE, Lavelle EC. Trends in vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines.* 2011 Apr;10(4):539-50. doi: 10.1586/erv.11.21
58. Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan DT, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine.* 2011 Feb;29(9):1812-23. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.090.
59. Ott G, Barchfeld GL, Chernoff D, Radhakrishnan R, van Hoogeveest P, Van Nest G. MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharm Biotechnol.* 1995;6:277-96. doi: 10.1007/978-1-4615-1823-5_10.
60. Seubert A, Monaci E, Pizza M, O'Hagan DT, Wack A. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *J Immunol.* 2008 Apr;180(8):5402-12. doi: 10.4049/jimmunol.180.8.5402
61. Théry C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 2001 Feb;13(1):45-51. doi: 10.1016/s0952-7915(00)00180-1.
62. Andrianov AK, Marin A, Chen J. Synthesis, properties, and biological activity of poly[di(sodium carboxylatoethylphenoxy)phosphazene]. *Biomacromolecules.* 2006 Jan;7(1):394-9. doi: 10.1021/bm050790a.
63. Awate S, Eng NF, Gerdts V, Babiuk LA, Mutwiri G. Caspase-1 Dependent IL-1 β Secretion and Antigen-Specific T-Cell Activation by the Novel Adjuvant, PCEP. *Vaccines.* 2014 Jun;2(3):500-14. doi:10.3390/vaccines2030500.
64. Nascimento IP, Leite LC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Braz J Med Biol Res.* 2012 Dec;45(12):1102-11. doi: 10.1590/s0100-879x2012007500142
65. González-Cano P, Gamage LNA, Marciniuk K, Hayes C, Napper S, Hayes S, Griebel PJ. Lambda display phage as a mucosal vaccine delivery vehicle for peptide antigens. *Vaccine.* 2017 Dec;35(52):7256-7263. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.010
66. Gamage LN, Ellis J, Hayes S. Immunogenicity of bacteriophage lambda particles displaying porcine Circovirus 2 (PCV2) capsid protein epitopes. *Vaccine.* 2009 Nov 5;27(47):6595-604. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.08.019.
67. Orlova EV. Bacteriophages and Their Structural organization, in *Bacteriophages* Ipek Kurtboke, IntechOpen, 2012 Mar; p 3-30. doi: 10.5772/34642.
68. Wommack KE, Colwell RR. Viriplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000 Mar;64(1):69-114. doi: 10.1128/mmbr.64.1.69-114.2000.
69. Haq I.U, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol J.* 2012 Jan;9(9):1-8. doi: 10.1186/1743-422X-9-9.
70. Wittebole X, De Roock S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence.* 2014 Jan;5(1):226-35. doi: 10.4161/viru.25991.
71. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985 Jun;228(4705):1315-7. doi: 10.1126/science.4001944.
72. Greenwood J, Willis AE, Perham RN. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage: Peptides from Plasmodium falciparum circumsporozoite protein as antigens. *J Mol Biol.* 1991 Aug; 220(4): 821-27. doi: 10.1016/0022-2836(91)90354-9.
73. Trovato M, Krebs SJ, Haigwood NL, De Berardinis P. Delivery strategies for novel vaccine formulations. *World J Virol.* 2012 Feb;1(1):4-10. doi: 10.5501/wjv.v1.i1.4.
74. Sidhu SS. Engineering M13 for phage display. *Biomol Eng.* 2001 Sep;18(2):57-63. doi: 10.1016/s1389-0344(01)00087-9
75. Hashiguchi S, Yamaguchi Y, Takeuchi O, Akira S, Sugimura K. Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Nov;402(1):19-22. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.09.094.
76. Fuh G, Sidhu SS. Efficient phage display of polypeptides fused to the carboxy-terminus of the M13 gene-3 minor coat protein. *FEBS Lett.* 2000 Sep;480(2-3):231-4. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01946-3.
77. Hashemi H, Bamdad T, Jamali A, Pouyanfar S, Mohammadi MG. Evaluation of humoral and cellular immune responses against HSV-1 using genetic immunization by filamentous phage particles: a comparative approach to conventional DNA vaccine. *J Virol Methods.* 2010 Feb;163(2):440-4. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.11.008.
78. Molenaar TJ, Michon I, de Haas SA, van Berkell TJ, Kuiper J, Biessen EA. Uptake and processing of modified bacteriophage M13 in mice: implications for phage display. *Virology.* 2002 Feb;293(1):182-91. doi: 10.1006/viro.2001.1254.
79. Moon JS, Kim WG, Kim C, Park GT, Heo J, Yoo SY, et al., M13 Bacteriophage-Based Self-Assembly Structures

- and Their Functional Capabilities. *Mini Rev Org Chem.* 2015 Jun;12(3):271-81. doi: 10.2174/1570193X1203150429105418
80. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: signal Os that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev.* 2012 Sep;249(1):158-75. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.
 81. Hashiguchi S, Yamaguchi Y, Takeuchi O, Akira S, Sugimura K. Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Nov;402(1):19-22. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.09.094
 82. Mora M, Veggi D, Santini L, Pizza M, Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Drug Discov Today.* 2003 Jun; 8(10):459-64. doi: 10.1016/S1359-6446(03)02689-8
 83. Sette A, Rappuoli R. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity.* 2010 Oct;33(4):530-41. doi: 10.1016/j.jimmuni.2010.09.017
 84. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol.* 2000 Oct;3(5): 445-50. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00119-3
 85. Khalili S, Jahangiri A, Borna H, Ahmadi Zanoos K, Amani J. Computational vaccinology and epitope vaccine design by immunoinformatics. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2014 Sep;61(3):285-307. doi: 10.1556/AMicr.61.2014.3.4.
 86. Lo YT, Pai TW, Wu WK, Chang HT. Prediction of conformational epitopes with the use of a knowledge-based energy function and geometrically related neighboring residue characteristics. *BMC Bioinformatics.* 2013;14 Suppl 4(Suppl 4):S3. doi: 10.1186/1471-2105-14-S4-S3. Epub 2013 Mar 8.
 87. Flaherty DK. Immunology for Pharmacy, in Immunology for Pharmacy, Elsevier/Mosby, Editor. 2012, Elsevier/Mosby. p. 23-30.
 88. Michalik M., Djahanshiri B., Leo J.C., Linke D. Reverse Vaccinology: The Pathway from Genomes and Epitope Predictions to Tailored Recombinant Vaccines. In: Thomas S. (eds) Vaccine Design. Methods in Molecular Biology, vol 1403. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7_4.
 89. La Gruta NL, Gras S, Daley SR, Thomas PG, Rossjohn J. Understanding the drivers of MHC restriction of T cell receptors. *Nat Rev Immunol.* 2018 Jul;18(7):467-478. doi: 10.1038/s41577-018-0007-5.
 90. Molero-Abraham M, Lafuente EM, Flower DR, Reche PA. Selection of conserved epitopes from hepatitis C virus for pan-populational stimulation of T-cell responses. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:601943. doi: 10.1155/2013/601943.
 91. Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perez M, Reche PA. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *J Immunol Res.* 2017;2017:2680160. doi: 10.1155/2017/2680160. Epub 2017 Dec 28.
 92. Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. Vacceed: a high-throughput in silico vaccine candidate discovery pipeline for eukaryotic pathogens based on reverse vaccinology. *Bioinformatics.* 2014 Aug;30(16):2381-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btu300.
 93. Rizwan M, Naz A, Ahmad J, Naz K, Obaid A, Parveen T, Ahsan M, Ali A. VacSol: a high throughput in silico pipeline to predict potential therapeutic targets in prokaryotic pathogens using subtractive reverse vaccinology. *BMC Bioinformatics.* 2017 Feb;18(1):106. doi: 10.1186/s12859-017-1540-0.
 94. De Groot AS, Berzofsky JA. From genome to vaccine-new immunoinformatics tools for vaccine design. *Methods.* 2004 Dec;34(4):425-8. doi: 10.1016/jymeth.2004.06.004
 95. Resource, I.E.D.A. IEEDB. 2020; Available from: <http://tools.iedb.org/main/>.
 96. ProInmune. 2020; Available from: <https://www.proimmune.com/>.
 97. EpiVax. Epivax. 2020; Available from: <https://epivax.com/>.
 98. De Groot AS, Martin W. Reducing risk, improving outcomes: bioengineering less immunogenic protein therapeutics. *Clin Immunol.* 2009 May;131(2):189-201. doi: 10.1016/j.clim.2009.01.009.
 99. Moise L, Gutierrez A, Kibria F, Martin R, Tassone R, Liu R, Terry F, Martin B, De Groot AS. iVAX: An integrated toolkit for the selection and optimization of antigens and the design of epitope-driven vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(9):2312-21. doi: 10.1080/21645515.2015.1061159.
 100. Schönbach C, Ranganathan S, Brusic V. Immunoinformatics. 2007: Springer New York, NY. e-ISBN 978-0-387-72968-8
 101. Moise L, Gutierrez AH, Bailey-Kellogg C, Terry F, Leng Q, Abdel Hady KM, et al. The two-faced T cell epitope: examining the host-microbe interface with JanusMatrix. *Hum Vaccin Immunother.* 2013 Jul;9(7):1577-86. doi: 10.4161/hv.24615.
 102. De Groot AS, Bishop EA, Khan B, Lally M, Marcon L, Franco J, et al. Engineering immunogenic consensus T helper epitopes for a cross-clade HIV vaccine. *Methods.* 2004 Dec;34(4):476-87. doi: 10.1016/jymeth.2004.06.003.
 103. Buermans HP, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Oct;1842(10):1932-1941. doi: 10.1016/j.bbadiis.2014.06.015.
 104. Azhikina T, Skvortsov T, Radaeva T, Mardanov A, Ravin N, Apt A, Sverdlov E. A new technique for obtaining whole pathogen transcriptomes from infected host tissues. *Biotechniques.* 2010 Feb;48(2):139-44. doi: 10.2144/000113350.

105. Akala SL, Plowe CV. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'. *Parasite Immunol*. 2009 Sep;31(9):560-73. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01138.x.
106. Luciani F. High-throughput sequencing and vaccine design. *Rev Sci Tech*. 2016 Apr;35(1):53-65. doi: 10.20506/rst.35.1.2417.
107. Zhao L, Zhang M, Cong H. Advances in the study of HLA-restricted epitope vaccines. *Hum Vaccin Immunother*, 2013 Aug; 9(12):2566-77. doi: 10.4161/hv.26088.