

VAKSIN DNA: VAKSIN GENERASI KEEMPAT

Maksum Radji

Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi

Departemen Farmasi FMIPA-UI, Depok, 16424

ABSTRACT

Vaccines have been developed for a range of different infectious diseases. The complexity of microbial infections requires novel approaches to vaccine design. The first-generation of vaccines were live attenuated pathogens. Because of safety concerns, the second-generation of vaccines, chemically or physically inactivated pathogens were later developed. Purified or synthetic proteins represent a third generation, and recent advances in molecular biology and genetic engineering have led to the development of the fourth vaccine generation, which includes DNA and virus vector-based vaccines. This review discusses on the genetic elements and construction of DNA vaccines, comparison of DNA vaccines and conventional vaccines, the benefits and limitations of DNA vaccines, and the advances of genetic vaccine development over the last decade.

Keywords: *DNA vaccines, conventional vaccines.*

ABSTRAK

Berbagai jenis vaksin telah banyak dikembangkan untuk mengatasi dan mencegah penularan penyakit infeksi. Beberapa pendekatan teknologi perancangan vaksin telah mengalami perkembangan yang cukup pesat untuk mengatasi masalah-masalah yang berhubungan dengan kerumitan penanggulangan penyakit infeksi. Vaksin generasi pertama yang menggunakan mikroba patogen yang dilemahkan telah banyak digunakan, namun karena pertimbangan keamanan dari vaksin generasi pertama ini maka vaksin generasi kedua yang menggunakan mikroba patogen yang dimatikan, telah dikembangkan. Demikian pula dengan vaksin generasi ketiga yaitu vaksin rekombinan yang terdiri dari protein yang dimurnikan telah dikembangkan dan digunakan. Kemajuan dalam bidang biologi molekuler dan rekayasa genetika telah memungkinkan untuk mengembangkan vaksin generasi keempat yaitu vaksin DNA. Dalam review ini akan dibahas tentang konstruksi dan elemen genetik vaksin DNA, keuntungan dan berbagai kemajuan yang telah dicapai dalam penelitian tentang vaksin DNA.

Kata kunci: *vaksin DNA, vaksin konvensional.*

PENDAHULUAN

Vaksin telah lama dikenal sebagai suatu substansi yang digunakan untuk memperoleh respon imun terhadap mikroorganisme patogen. Vaksin pertama kali ditemukan pada tahun 1796 oleh Edward Jenner yaitu vaksin virus cacar. Sejak saat itu teknologi pembuatan vaksin telah berkembang dengan pesat dan berbagai jenis vaksin untuk mencegah penyakit infeksi telah banyak digunakan.

Vaksin konvensional baik vaksin generasi pertama yaitu vaksin yang mengandung mikroorganisme hidup yang telah dilemahkan dan vaksin generasi kedua yaitu vaksin yang mengandung mikroorganisme yang dimatikan, serta vaksin generasi ketiga yaitu vaksin rekombinan yang juga dikenal dengan vaksin sub unit yang mengandung fragmen antigenik dari suatu mikroorganisme yang dapat merangsang respon imun, dalam penggunaannya masih memiliki beberapa kelemahan (1, 2). Vaksin generasi pertama seringkali dapat bermutasi kembali menjadi virulen sehingga menimbulkan efek yang tidak diinginkan. Oleh sebab itu biasanya jenis vaksin yang dilemahkan ini tidak dianjurkan diberikan kepada penderita yang mengalami imunokompromais. Sedangkan vaksin generasi kedua adalah vaksin mengandung mikroorganisme yang dimatikan menggunakan zat kimia tertentu, biasanya dengan menggunakan formalin atau fenol, dalam peng-

gunaannya sering mengalami kegagalan atau tidak menimbulkan respon imun tubuh.

Untuk mengatasi berbagai kelemahan yang terjadi pada penggunaan vaksin generasi pertama dan kedua mulailah dikembangkan vaksin generasi yang ketiga yaitu vaksin rekombinan yang juga dikenal dengan vaksin sub unit. Vaksin sub unit dibuat melalui teknik rekayasa genetika untuk memperoleh fragmen antigenik dari mikroorganisme, sehingga disebut dengan vaksin rekombinan. Sebagai contoh, vaksin hepatitis B mengandung bagian protein selubung dari virus hepatitis B yang diproduksi melalui rekayasa genetika, oleh sel ragi. Vaksin rekombinan lebih aman dibandingkan dengan vaksin yang mengandung seluruh sel virus, karena fragmen antigenik yang terdapat dalam vaksin rekombinan tidak dapat bereproduksi dalam tubuh penerima, disamping itu vaksin rekombinan umumnya tidak menimbulkan efek samping. Namun demikian vaksin generasi ketiga inipun ternyata hanya dapat menimbulkan respon imun humoral dan tidak dapat menimbulkan respon imun seluler (3, 4).

Vaksin DNA

Transfer DNA plasmid secara langsung ke dalam jaringan mencit tanpa sistem penghantaran khusus telah berhasil dilakukan pertama kali pada tahun 1990 (5). DNA plamid yang disuntikkan secara intramuskular ke dalam tubuh mencit tersebut

ternyata dapat memproduksi protein yang dikode oleh sekuen DNA yang terdapat dalam DNA plamid tersebut di dalam jaringan mencit. Penelitian berikutnya telah membuktikan bahwa DNA dapat dimasukkan langsung secara *in vivo* untuk menghasilkan protein yang dikehendaki sesuai dengan sekuen DNA yang mengkode ekspresi protein tersebut (6). Sejak saat itu diyakini bahwa metode transfer DNA secara *in vivo* dapat diaplikasikan baik untuk terapi gen maupun untuk vaksinasi dengan DNA.

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mempelajari berbagai faktor yang mempengaruhi efisiensi dan sifat imunogenisitas dari DNA plamid, yang pada akhirnya dikenal dengan vaksin DNA untuk memberikan imunitas tubuh terhadap serangan berbagai mikroorganisme. Sampai saat ini berbagai hasil penelitian telah dipublikasikan bahwa imunisasi dengan DNA dapat menghasilkan protein asing atau antigen yang dapat menstimulasi respon imun, sehingga dapat mencegah berbagai penyakit infeksi pada binatang percobaan antara lain terhadap *Human immunodeficiency virus* (HIV) (7, 8, 9, 10, 11), virus Ebola (12), malaria (13, 14), *Mycobacterium tuberculosis* (15), virus influenza (16, 17), atau untuk meningkatkan sistem imunitas terhadap sel-sel tumor (18, 19).

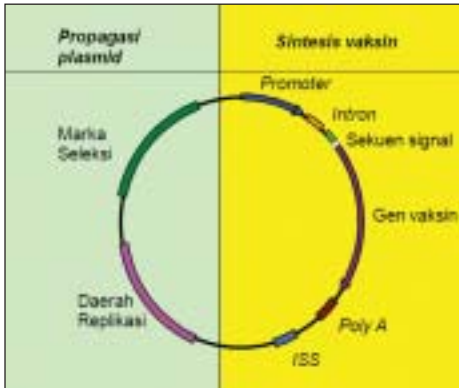
Perkembangan penelitian dalam bidang vaksin DNA ini telah berkembang pesat selama satu dekade terakhir dan beberapa uji klinik

penggunaan vaksin DNA pada manusia telah dilakukan terhadap berbagai jenis penyakit infeksi termasuk malaria, virus dengue, cytomegalovirus, virus Ebola, virus influenza, avian influenza viruses, West Nile virus (WNV), SARS coronavirus, virus hepatitis B dan HIV.

Konstruksi dan Elemen Genetik Vaksin DNA

Struktur dan elemen genetik dari suatu vaksin DNA terdiri dari dua unit utama yaitu yang pertama adalah unit propagasi plamid yang berfungsi sebagai pengendali replikasi dan perbanyakan plamid DNA secara *in vitro* dalam sel bakteri, sesuai dengan jumlah dan volume yang diinginkan pada saat diproduksi. Sedangkan unit yang kedua terdiri dari fragmen DNA yang mengandung gen vaksin yang telah dikloning ke dalam plamid DNA, dimana gen vaksin ini diharapkan mengekspresi protein asing di dalam sel hospes (tubuh manusia). Elemen genetik dari vaksin DNA dapat dilihat pada Gambar 1.

Plamid vaksin DNA mempunyai unit propagasi yang berfungsi untuk multiplikasinya dalam sel mikroba sebagai hospesnya yang terdiri dari fragmen DNA untuk replikasi dan marka seleksi. Produksi vaksin DNA secara *in vitro* biasanya menggunakan bakteri *Escherichia coli*. Plamid DNA ditransformasi ke dalam sel bakteri, kemudian diseleksi sel transforman *Escherichia coli* yang mengandung plamid DNA. Klon *Escherichia coli*



Gambar 1. Struktur dan elemen genetik dari vaksin DNA

yang membawa plasmid DNA ini kemudian dibiakkan dalam media yang sesuai dalam skala industri, kemudian plasmid DNA diisolasi, dimurnikan dan diformulasi menjadi vaksin DNA.

Setelah vaksin DNA disuntikkan ke dalam tubuh maka unit sintesis vaksin akan bekerja di dalam sel hospes atau sel manusia. Seperti yang terlihat pada Gambar 1. unit sintesis vaksin ini terdiri dari promotor, intron, sekuen DNA signal, gen vaksin yang mengkode protein atau antigen dari mikroba patogen dan transkripsional terminator (poly-A), serta *immune stimulatory sequences* (ISS) (20). Ekspresi dari protein asing atau antigen dalam sel hospes yang dikode oleh gen vaksin, dimulai oleh promotor dan diakhiri oleh terminator (poly-A). Untuk meningkatkan potensi vaksin DNA, biasanya dalam plasmid DNA ditambahkan ISS, yaitu nukleotida heksamer yang dapat berinteraksi dengan reseptor dan

meningkatkan sifat imonogenisitas dari vaksin DNA (21).

Mekanisme Aksi Vaksin DNA

Mekanisme vaksin DNA dalam merangsang sistem imun adalah setelah plasmid DNA disuntikkan ke dalam jaringan maka plasmid DNA akan bereplikasi secara otonom dan memproduksi protein asing atau antigen yang dikode oleh gen vaksin. Antigen ini langsung dapat menstimulasi sel B yang kemudian dapat memproduksi antibodi terhadap antigen atau protein asing yang dikode oleh plasmid DNA. Sel yang mengandung antigen asing tersebut kemudian dapat bersifat sebagai sel penyaji antigen (*antigen presenting cells*), yang kemudian dapat melalui jalur-jalur tertentu, baik melalui jalur *major histocompatibility complex* (MHC) I pada sel CD8+T atau MHC II pada sel CD4+T, sehingga mengalami proses yang berbeda dalam merangsang sistem imunotas tubuh. Protein asing juga dapat langsung masuk ke dalam suatu sel penyaji lainnya misalnya sel dendritik, sehingga dengan demikian selain dapat merangsang sistem imun humoral juga dapat merangsang sistem imun selular. Karena proses pembentukan antigen oleh sel hospes setelah vaksinasi DNA menyerupai produksi antigen pada saat terinfeksi dengan mikroorganisme secara alamiah, maka respon imun yang terjadi akibat vaksinasi DNA sama dengan respon imun yang diinduksi oleh mikroorganisme patogen.

Keuntungan Vaksin DNA

Vaksin DNA memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan vaksin konvensional. Pada umumnya efektifitas vaksin konvensional tergantung pada terbentuknya antibodi dalam mencegah penyakit infeksi. Namun demikian vaksin konvensional tidak mampu merangsang respon imun selular. Vaksin DNA selain dapat merangsang respon imun humoral melalui pembentukan antibodi, juga dapat merangsang imun selular melalui aktivasi sel T (*cell-mediated response immune*), sehingga dapat memberikan kekebalan terhadap mikroba patogen intraselular, misalnya terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, virus, parasit, atau sel kanker melalui sel T pembunuh (*killer T cells*) atau melalui efek sitotoksik.

Beberapa keuntungan lainnya dari vaksin DNA adalah: (i). Plasmid DNA mudah diproduksi dalam jumlah yang besar secara lebih ekonomis, dalam waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan vaksin konvensional; (ii). DNA sangat stabil, tahan terhadap perubahan suhu sehingga lebih mudah untuk disimpan dan didistribusikan; (iii). Sekuen DNA dapat diubah dengan mudah dalam laboratorium, sehingga vaksin DNA dapat disesuaikan dengan perubahan mikroorganisme patogen; (iv). Dapat direayasa gabungan beberapa plasmid DNA yang mempunyai spektrum luas untuk beberapa epitop antigen; (v). Vaksin DNA terbukti dapat meningkatkan imunitas tubuh terhadap virus dan bakteri dalam

waktu yang sangat lama; dan (vi). Tidak memerlukan perlakuan khusus terhadap mikroba patogen selama proses produksi.

Vaksin DNA termasuk vaksin yang aman jika digunakan pada manusia (22). Walaupun demikian dalam awal pengembangannya dikhawatirkan terjadinya efek yang tidak diinginkan jika vaksin DNA digunakan pada manusia, antara lain kekhawatiran bahwa DNA asing dapat terintegrasi ke dalam kromosom hospes sehingga dapat menyebabkan stimulasi gen yang tidak terkontrol yang dapat mengakibatkan terbentuknya sel kanker. Tetapi hal ini tidak perlu dirisaukan karena dalam beberapa uji pra-klinik pada binatang percobaan, integrasi vaksin DNA ke dalam kromosom hospes masih jauh lebih rendah dari pada mutasi spontan yang terjadi di alam (20). Kekhawatiran terjadinya induksi reaksi autoimun terhadap vaksinasi DNA yang dapat menyebabkan terbentuknya antibodi anti-DNA juga tidak terbukti selama uji klinik dengan vaksin DNA (23).

Penghantaran Vaksin DNA

Cara penghantaran vaksin DNA yang umum dilakukan adalah dengan cara penyuntikan. Namun demikian, beberapa cara penghantaran alternatif juga telah dikembangkan. Sistem penghantaran dengan cara "*particle-mediated epidermal delivery*" (PMED), telah dilakukan untuk vaksin DNA hepatitis B (23), dan vaksin DNA influenza (25). Penghantaran

vaksin DNA tanpa jarum (*needle-free injection*) telah digunakan dalam beberapa uji klinik vaksin DNA antara lain uji kilink vaksin DNA terhadap HIV menggunakan (*needle-free device Biojector*) yang dapat meningkatkan respon imun selular lebih dari 75% subjek uji klinik (26) dan digunakan juga pada uji klinik fase I vaksin DNA untuk virus Ebola (27).

Sistem penghantaran lainnya yang dikembangkan untuk vaksin DNA adalah teknik elektroporasi, dimana teknik ini menggunakan arus listrik dengan berbagai voltase setelah penyuntikan vaksin DNA untuk meningkatkan pasokan DNA ke dalam sel hospes. Elektroporasi dapat meningkatkan permeabilitas membran jaringan sel hospes, sehingga DNA akan lebih mudah masuk ke dalam sel. Teknik elektroporasi ini telah berhasil dilakukan pada beberapa uji praklinik pada binatang percobaan (28, 29). Namun demikian sistem penghantaran dengan epektroporasi ini masih perlu diteliti lebih lanjut keamanannya jika akan dilakukan pada manusia.

Formulasi Vaksin DNA

Salah satu faktor penting dalam meningkatkan potensi vaksin DNA untuk meningkatkan respon imun adalah formulasi dan ajuvan. Berbagai penelitian tentang formulasi vaksin DNA dan penggunaan ajuvan untuk meningkatkan imunogenisitas vaksin DNA telah dilakukan. Beberapa jenis ajuvan yang yang digunakan untuk vaksin DNA antara lain

adalah *poly-lactide coglycolide* (PLG) (30). *Poloxamers*, merupakan *nonionic block copolymers* apabila dikombinasikan dengan surfaktan kationik akan membentuk nanopartikel yang dapat bertindak sebagai pembawa dan sekaligus ajuvan untuk vaksin DNA *cytomegalovirus* (CMV). Dalam uji klinik fase I menunjukkan bahwa terjadi respon imun selular yang baik pada sebagian besar sukarelawan yang divaksinasi (31).

Vaxfectin merupakan salah satu contoh lainnya dalam sistem penghantaran dan ajuvan untuk vaksin DNA. *Vaxfectin* ini merupakan *cationic lipid-based adjuvant* yang mempunyai muatan positif yang akan terikat dengan DNA yang bermuatan negatif. Vaksin DNA yang diformulasi dengan *Vaxfectin* terbukti dapat meningkatkan respon imun humoral yang bertahan lama pada binatang percobaan (32, 33).

Pada uji klinik yang dilakukan terhadap manusia, vaksin DNA untuk virus influenza (H5N1), yang diformulasi dengan *Vaxfectin* terbukti aman dan dapat merangsang pembentukan antibodi terhadap H5 pada lebih dari 67% sukarelawan yang ikut dalam uji klinik (34).

Vaksin DNA yang Telah Disetujui

Walaupun sampai saat ini vaksin DNA untuk manusia belum ada yang disetujui dan masih dalam fase-fase uji klinik, namun beberapa vaksin DNA untuk binatang telah disetujui penggunaannya.

Vaksin DNA pertama yang di-

setujui untuk digunakan pada binatang adalah vaksin DNA untuk mencegah penyakit *West Nile virus* (WNV) yaitu *mosquito-borne virus* yang dapat menyebabkan ensefalitis dan kematian pada kuda. Vaksin DNA *West Nile virus* yang dikembangkan oleh *Fort Dodge Laboratories* ini disetujui peredarannya oleh *U.S Department of Agriculture* (USDA) pada tahun 2005. Vaksin DNA lainnya yang telah disetujui adalah vaksin DNA untuk melindungi ikan salmon dari infeksi *hematopoietic necrosis virus*, dimana virus ini dapat menyebabkan kematian ikan salmon. Vaksin DNA yang dikembangkan oleh Aqua Health, Novartis, Canada telah disetujui peredarannya pada tahun 2005. Disamping itu vaksin DNA yang digunakan untuk mengobati kanker kulit (*melanoma*) pada anjing, disetujui penggunaannya pada tahun 2007 oleh USDA.

KESIMPULAN

Vaksin DNA merupakan vaksin generasi keempat yang diharapkan dapat mencegah penyakit infeksi. Beberapa keuntungan vaksin DNA, selain dapat merangsang respon imun humoral dan imun selular, vaksin DNA dapat diproduksi dalam skala besar lebih ekonomis dibandingkan vaksin konvensional. Selain tidak memerlukan perlakuan khusus terhadap mikroba patogen selama proses produksi, plasmid DNA sangat stabil dan dapat direkayasa sedemikian rupa untuk memperoleh

gabungan beberapa plasmid DNA yang mempunyai spektrum luas yang bersifat multivalen. Walaupun saat vaksin DNA masih dalam fase uji klinik terhadap manusia, akan tetapi vaksin DNA diharapkan dapat mengatasi berbagai penyakit infeksi khususnya penyakit infeksi yang bersifat pandemik yang sangat sulit diatasi dengan vaksin konvensional.

DAFTAR PUSTAKA

1. Fine PE, AMI Carneiro, BJ Milstien. 1999. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes: a discussion document. *WHO Bull* 1999, **23**.
2. Girard MP, U Fruth, MP Kieny. 2005. A review of vaccine research and development: Tuberculosis. *Vaccine*, **23**: 5725-5731.
3. Du X, J Wang, Y Kang, W Xiao, G Zhao, B Wang. 2009. Suppression of the antigen-specific T cell immune response by co-immunization with the HBV DNA vaccine and recombinant HBsAg. *Acta Microbiologica Sinica*. **49**: 938-42.
4. Leonardi S, S Spina, L Spicuzza, N Rotolo N, M La Rosa. 2009. Hepatitis B vaccination failure in celiac disease: is there a need to reassess current immunization strategies? *Vaccine*. **27**(43): 6030-3.
5. Wolff JA, RW Malone, P Williams, W Chong, G Acsadi, A Jani, et al. 1990. Direct gene

- transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. **247**: 1465-1468.
6. Wolff JA, JJ Ludtke, G Acsadi, P Williams, A Jani. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Gen.* **1**: 363-369.
 7. Wang B, KE Ugen, V Srikantan, MG Agadjanyan, K Dang, Y Refaeli, et al. 1993. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiencyvirus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**(9): 4156-60.
 8. Amara RR, F Villinger, JD Altman, SL Lydy, SP O'Neil, SI Staprans, DC Montefiori, et al. 2002. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Vaccine*, **20**: 1949-1955.
 9. Lee D, BS Graham, YL Chiu, PB Gilbert, MJ McElrath, RB Belshe, et al. 2004. Breakthrough infections during phase 1 and 2 prime-boost HIV-1 vaccine trials with canarypox vectors (ALVAC) and booster dose of recombinant gp120 orgp160. *J Infect Dis*, **190**: 903-907.
 10. Mwau M, I Cebere, J Sutton, P Chikoti, N Winstone, EG Wee. 2004. A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIVspecific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J Gen Virol*. **85**: 911-919.
 11. Malavika G, E Kenneth, Ugen, BW David. 2004. DNA Vaccines against Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Past Decade. *Clin Microbiol Rev*. **17** (2): 370-389.
 12. Vastag B. 2004. Ebola vaccines tested in humans, monkeys. *JAMA*, **291**: 549-550.
 13. Martin T, SE Parker, R Hedstrom, T Le, SL Hoffman, J Norman, et al. 1999. Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum Gene Ther*, **10**(5): 759-68.
 14. Wang R, DL Doolan, TP Le, RC Hedstrom, KM Coonan, Y Charoenvit. 1998. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science*, **282**: 476-480.
 15. Taracha EL, R Bishop, AJ Musoke, AV Hill, SC Gilbert. 2003. Heterologous priming-boosting immunization of cattle with Mycobacterium tuberculosis 85A induces antigen-specific T-cell responses. *Infect Immun*, **71**: 6906-6914.
 16. Robinson HL, LA Hunt LA, RG Webster. 2009. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 1993, **11**(9): 957-60.
 17. Ulmer JB, JJ Donnelly, SE Parker, GH Rhodes, PL Felgner, VJ Dwarki, et al. 1993. Heterologous protection against influenza

- by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, **259**(5102): 1745-1749.
18. Liu M, B Acres, JM Balloul, N Bizouarne, S Paul, P Slos, *et al.* 2004. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **101**(Suppl 2): 14567- 14571.
 19. Pavlenko M, AK Roos, A Lundqvist, A Palmborg, AM Miller, V Ozenci, *et al.* 2004. A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Br J Cancer*, **91**: 688-694.
 20. Glenting J, S Wessel. 2005. Ensuring safety of DNA vaccines. *Microbial Cell Factorie* , **4**: 26
 21. Tudor D, C Dubuquoy, V Gaboriau, F Lefevre, B Charley, S Riffault. 2005. TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines. *Vaccine*, **23**:1258-1264.
 22. Schalk JA, FR Mooi, GAM Berbers, L van Aerts, H Ovelgonne, T Kimman. 2006. Preclinical and Clinical Safety Studies on DNA vaccines. *Human Vaccines*, **2**(2): 45-53.
 23. Liu MA, B Wahren, GB Karlsson Hedestam. 2006. DNA vaccines: recent developments and future possibilities. *Hum Gene Ther*, **17**(11): 1051-1061.
 24. Roy MJ, MS Wu, LJ Barr, JT Fuller, LG Tussey, S Speller, *et al.* 2000. Induction of antigen-specific CD8+ T cells, T helper cells, and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccine. *Vaccine*, **19**(7-8): 764-78.
 25. Drape RJ, MD Macklin, LJ Barr, S Jones, JR Haynes, HJ Dean. 2006. Epidermal DNA vaccines for influenza is immunogenic in humans. *Vaccine*, **24**(21): 4475-81.
 26. Tavel JA, JE Martin, GG Kelly, ME Enama, JM Shen J, PL Gomez, *et al.* 2007. Safety and Immunogenicity of a Gag-Pol Candidate HIV-1 DNA Vaccine Administered by a Needle-Free Device in HIV-1-Seronegative Subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **44**(5): 601-605.
 27. Martin JE, NJ Sullivan, ME Enama, II Gordon, M Roederer, RA Koup, *et al.* 2006. A DNA vaccine for Ebolavirus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial. *Clin Vaccine Immunol*, **11**: 1267-77.
 28. Otten G, M Schaefer, B Doe, H Liu, I Srivastava, J zur Megede, *et al.* 2004. Enhancement of DNA vaccine potency in rhesus macaques by electroporation. *Vaccine*, **22**(19):2489-93.
 29. Rosati M, A Valentin, R Jalah, V Patel, A von Gegerfelt, C Bergamaschi *et al.* 2008. Increased immune responses in rhesus macaques by DNA vaccination combined with electroporation. *Vaccine*, **26**(40): 5223-9.
 30. O'Hagan D, M. Singh, M Ugozzoli, C Wild C, S Barnett,

- M Chen, et al. 2001. Induction of Potent Immune Responses by Cationic Microparticles with Adsorbed Human Immunodeficiency Virus DNA Vaccines. *Journal of Virology*, **75**(19): 9037-9043.
31. Wloch MK, LR Smith, S Bout-saboualoy, L Reyes, C Han, J Kehler, et al. 2008. Safety and immunogenicity of a bivalent cytomegalovirus DNA vaccine in healthy adult subjects. *J Infect Dis*, **197**(12): 1634-42.
32. Lalor PA, RJ Webby, J Morrow, D Rusalov, DC Kaslow, A Rolland, et al. 2008. Plasmid DNAbased vaccines protect mice and ferrets against lethal challenge with ANietharn1203/04 (H5NI) influenza virus. *J Infect Dis*, **197**(12): 1643-52.
33. Pan CH, GS Jimenez, N Nair, Q Wei, RJ Adams, FP Polack, et al. 2008. Use of Vaxfectin Adjuvant with DNA Vaccine Encoding the Measles Virus Hemagglutinin and Fusion Proteins Protects Juvenile and Infant Rhesus Macaques against Measles Virus. *Clin Vaccine Immunol*, **15**(8):1214-21.
34. Smith L. 2008. Vaxfectin-formulated pandemic influenza DNA vaccines: preliminary clinical results. *Paper presented at: IBC Life Sciences' Next Generation Vaccines; National Harbor, MD 2008.*