Review Article

DNA Vaccine: The Third Generation Vaccine

Roghayeh Teimourpour[1], Zahra Meshkat[2*], Mohsen Arzanlou[1], Hadi Peeridogaheh[1]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran.

[2]Antimicrobial Resistance Research Canter, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Corresponding Author:
Zahra Meshkat,
Antimicrobial Resistance Research Canter, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Email:
meshkatz@mums.ac.ir

Received: 12 Dec, 2015

Accepted: 19 Mar, 2016

Abstract

Background and Objectives: After live attenuated and subunit vaccines, DNA vaccines were introduced as a third generation vaccine in the field of vaccinology. This type of vaccine is a promising approach to deal with infectious agents in the future. Although, many aspects of this type of vaccine has not yet been identified, its use has been initiated in humans and clinical trials, and several DNA vaccines have been developed against veterinary infectious diseases. This generation of vaccine has provided new approaches to deal with and control existing diseases. In addition to infectious diseases, this type of vaccine can also be used against different types of tumors. Despite numerous attempts, only one type of DNA vaccine has been approved for use in human. The present study focuses on biology, advantages, and disadvantages of DNA vaccine and investigates its capacity in stimulating different types of immune responses.

Keywords: Vaccines, DNA; Vaccines, Subunit; Clinical trial.

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره دهم، دی ۹۵
صفحه ۸۶ الی ۹۹

مقاله مروری
(Review Article)

DNA واکسن: واکسن نسل سوم

رقیه تیمورپور[۱]، زهرا مشکات[۲*]، محسن ارزنلو[۱]، هادی پیری دوگاهه[۱]

چکیده

زمینه و هدف: پس از واکسن‌های تخفیف حدت‌یافته و زیرواحدی، DNA واکسن به‌عنوان واکسن نسل سوم در زمینه واکسن‌شناسی معرفی گردید. این نوع واکسن یک روش امیدبخش جهت مقابله با عوامل عفونی در آینده است. اگرچه بسیاری از جنبه‌های این نوع واکسن، هنوز به‌خوبی مشخص نشده است، اما استفاده از آن در انسان و کارآزمایی بالینی آغاز گردیده و چندین DNA واکسن برضد بیماری‌های دامی توسعه یافته است. این نسل از واکسن، مسیر جدیدی را برای مبارزه و کنترل بیماری‌های موجود فراهم کرده است. علاوه بر بیماری‌های عفونی، این نوع واکسن جهت مقابله با انواع مختلف تومورها نیز قابل‌استفاده است. باوجود تلاش‌های بسیار، تنها یک نوع DNA واکسن جهت استفاده در انسان تأیید شده است. مطالعه حاضر بر روی بیولوژی، مزایا و معایب DNA واکسن متمرکز شده و توانایی آن را در تحریک انواع مختلف پاسخ‌های ایمنی مورد بررسی قرار داده است.

کلید واژه‌ها: دی ان آ واکسن؛ واکسن زیرواحدی؛ کارآزمایی بالینی.

[۱]گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

[۲]مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
زهرا مشکات، مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
meshkatz@mums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:
**Teimourpour R, Meshkat Z, Arzanlou M, Peeridogaheh H. DNA Vaccine: The third generation vaccine.
Qom Univ Med Sci J 2016;10(10):86-99. [Full Text in Persian]**

مقدمه

امروزه، واکسیناسیون برای مقابله با بیماری‌های عفونی، لازم و ضروری است. واکسن‌ها، میزان مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی را در سطح جهان کاهش داده‌اند. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است ۸۰٪ بیماری‌های عفونی در جهان مربوط به بیماری‌هایی است که منجر به مرگ بیش از ۲۰ میلیون نفر در جهان شده است (۱). واکسن، نقش کلیدی را در مهار بیماری‌های عفونی به عهده دارد، و یک روش مقرون به‌صرفه برای مهار بیماری‌های عفونی می‌باشد. همچنین واکسن‌ها، میزان مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی مانند سرخک، اوریون، فلج اطفال و دیفتری را به شدت کاهش داده‌اند. واکسن‌های قدیمی یا اولین نسل از واکسن‌ها، از میکروارگانیسم‌های زنده و تخفیف حدت‌یافته تهیه شده‌اند که ممکن است چندین مشکل را درپی داشته باشد. بنابراین، در حال حاضر تحقیقاتی در حال انجام است تا براساس آنها بتوان واکسنی طراحی کرد که هم مقرون به صرفه بوده و هم به‌صورت اختصاصی، سیستم ایمنی را برضد پاتوژن تحریک کند (۲).

Edward Jenner اولین تلاش‌ها را برای واکسیناسیون برضد آبله در سال ۱۷۹۶ آغاز کرد. او مواد عفونی گرفته‌شده از زنی مبتلا به آبله گاوی را به بازوی یک پسر جوان تلقیح کرد که در نتیجه پسر در مقابل این ویروس مهلک مقاوم شد. آبله، اولین بیماری بود که توسط دانشمندان از طریق مایه‌کوبی افراد در معرض خطر با عامل عفونی مهار گردید (۳). Louis Pasteur (سال ۱۸۸۵) با انجام مطالعه بر روی واکسن هاری و سیاه‌زخم، فرم تخفیف حدت‌یافته از ویروس را تهیه و برای ایمن‌سازی از آن استفاده کرد. این واکسن‌ها حاوی آنتی‌ژن‌هایی بودند که به‌طور مصنوعی بدن را جهت تولید آنتی‌بادی خنثی‌کننده تحریک می‌کرد تا بدن در مقابل عامل عفونی مقاوم گردد (۴). واکسن‌های قدیمی یا نسل اول، از میکروارگانیسم‌های زنده یا تخفیف حدت‌یافته تشکیل شده‌اند. برای تهیه این دسته از واکسن‌ها، تمامی میکروارگانیسم لازم و ضروری است. اگرچه واکسن‌ها برای مهار بیماری بسیار مفیدند، اما واکسن‌های قدیمی یا نسل اول خود دارای مشکلاتی بوده‌اند ازجمله اینکه سویه تخفیف حدت‌یافته می‌توانست به فرم عفونی و خطرناک بازگشته و منجر به عفونت پایدار و مهلک شود. بنابراین، برای کاهش خطرات ناشی از واکسن نسل اول، واکسن‌های نسل دوم تهیه گردید (۵). واکسن‌های نسل دوم، واکسن‌های زیرواحدی هستند که از چند آنتی‌ژن پروتئینی یا اجزای پروتئینی نوترکیب تشکیل یافته‌اند، DNA واکسن‌ها در واقع واکسن‌های نسل سوم هستند (۶). تکنولوژی DNA نوترکیب، نقش مهمی در تهیه این نوع واکسن‌ها ایفا می‌کند. وقتی DNA واکسن وارد سلول میزبان می‌شود، سیستم‌های رونویسی و ترجمه داخل سلول را از روی DNA واکسن رونویسی کرده و سپس از روی mRNA، آنتی‌ژن‌های پاتوژن ساخته می‌شود. این آنتی‌ژن‌ها یا پروتئین‌ها به‌عنوان پروتئین‌های بیگانه توسط سیستم ایمنی شناسایی شده و طیف گسترده‌ای از پاسخ‌های ایمنی بر ضد آنها تولید می‌شود. در مقایسه با واکسن‌های قدیمی که نیازمند فرآیندهای پیچیده تولید، محیط‌های کشت سلولی و محیط‌های غنی‌شده بوده‌اند، DNA واکسن به‌سادگی تهیه و فرآوری می‌شود (۷). نگهداری از DNA واکسن، نیازمند زنجیره سرمایش و حفظ در شرایط خاص نبوده و به شرایط محیطی بسیار مقاوم است. تهیه زنجیره سرمایش و فراهم‌کردن شرایط مناسب نگهداری از واکسن، یکی از معضلات، به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه است (۱۰-۸).

تاریخچه DNA واکسن

Wolf (سال ۱۹۹۰) نشان داد تزریق داخل عضلانی DNA، منجر به تحریک سیستم ایمنی می‌شود. بعد از آن Ulmer و همکاران نشان دادند تجویز داخل عضلانی پلاسمید، کدکننده پروتئین ویروسی آنفولانزا منجر به تحریک پاسخ‌های لنفوسیت‌های سایتوتوکسیک به‌طور اختصاصی بر ضد این آنتی‌ژن می‌گردد که می‌تواند باعث ایجاد مصونیت در مواجهه با ویروس آنفولانزا شود (۱۱). این یافته‌ها، اولین شواهدی بود که نشان داد تجویز DNA می‌تواند منجر به تحریک پاسخ‌های ایمنی بر ضدآنتی‌ژن بیان‌شده توسط DNA پلاسمیدی شود. در اولین کارآزمایی بالینی DNA (سال ۱۹۹۸)، واکسن بر ضد بیماری ایدز در مورد انسان گزارش گردید (۱۲).

اهمیت DNA واکسن

در سال ۲۰۱۲، ۷۰۹ طرح تحقیقاتی با استفاده از DNA واکسن در زمینه‌های مختلف درمان سرطان، هپاتیت، مالاریا، آنفولانزا،

ویروس‌های Ebola و Dengue در مرکز ملی سلامت آمریکا به‌ثبت رسیده است (۷). سه DNA واکسن در مورد ویروس HIV نیز در فاز یک کارآزمایی بالینی جهت درمان، مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت. DNA واکسن VGX-3100 توسط شرکت داروسازی VGX برضد سرطان ناشی از پاپیلوما ویروس ارائه گردید که در فاز دوم کار آزمایی بالینی قرار داشت (۱۳). همچنین این شرکت DNA واکسن WT1 را عرضه کرد که در فاز دوم کار آزمایی بالینی بوده و جهت درمان لوسمی مایلوئیدی مزمن استفاده می‌شود. هم‌اکنون به‌طور تقریبی، ۲۸۴ ژن به‌منظور ژن‌درمانی با استفاده از DNA واکسن در سرتاسر جهان، در فاز کارآزمایی بالینی در حال بررسی هستند (۱۴). از DNA واکسن‌ها جهت ژن‌درمانی و واکسیناسیون نیز استفاده می‌شود. شرکت‌های داروسازی می‌توانند مقدار زیادی DNA واکسن جهت واکسیناسیون بیش از ۲ میلیون دوز براساس DNA واکسن تهیه کنند. به‌تازگی در آمریکا، واکسن Vaxfectin (R) که یک DNA واکسن با یک ادجوانت خاص برضد آنفولانزا H1N1 است، ۱/۲۵ میلیون دلار بودجه تحقیقاتی دریافت کرده و مطالعه در این زمینه وارد فاز حیوانی شده است. این واکسن برای جلوگیری از همه‌گیری آنفولانزا طراحی شده است. با استفاده از DNA واکسن، قابلیت تولید بیش از ۲ میلیون دوز واکسن در مدت زمان کوتاه فراهم می‌شود که می‌تواند از پاندمیک‌شدن بیماری‌های عفونی جلوگیری کند (۱۵).

امروزه چهار اجازه‌نامه رسمی در مورد استفاده از DNA واکسن در زمینه دامپزشکی وجود دارد:

۱- واکسن تولیدکننده هورمون رشد برای خوک‌ها در استرالیا؛
۲- ویروس هماتوپوئتیک نکروزیس برای ماهی آزاد در کانادا؛
۳- ویروس نیل غربی برای اسب‌ها در آمریکا؛
۴- ملانوما برای سگ‌ها در آمریکا.

ساختار DNA واکسن

DNA واکسن از یک پلاسمید تشکیل شده که در واقع یک DNA کوچک حلقوی است و می‌تواند در داخل سلول شروع به تکثیر کند (۱۲). DNA واکسن به لحاظ ژنتیکی، قابلیت دستکاری شدن را دارد و می‌توان به کمک آن یک یا چندین آنتی‌ژن اختصاصی، از انواع مختلف عوامل عفونی و پاتوژن‌ها را در سلول میزبان، تولید و بیان کرد. وقتی DNA واکسن به سلول میزبان تزریق می‌شود سلول میزبان شروع به خوانش از روی این پلاسمید کرده و پروتئین‌ها و آنتی‌ژن‌های بیگانه در داخل سلول میزبان تولید می‌شود و این آنتی‌ژن‌ها توسط سلول میزبان پردازش شده و در سطح سلول عرضه می‌گردد که به این ترتیب سلول‌های ایمنی از حضور آنها، آگاه و سیستم ایمنی علیه آنها فعال می‌شود (۱۶). همچنین وقتی سیستم ایمنی جهت پاسخ اولیه برضد آنتی‌ژن بیگانه آماده می‌شود، ایمنی محافظتی و خاطره‌ای نیز بر ضد آن پاتوژن، تولید و منجر به مصونیت در مواجهه با پاتوژن‌ها می‌گردد (۱۷). یک مولکول DNA، یک پلیمر خطی از داکسی ریبونوکلئوتید است که توسط پیوندهای فسفو دی استر به یکدیگر متصل می‌شوند. دو سر پلاسمید DNA به‌وسیله پیوند کووالانسی به یکدیگر متصل و تشکیل یک لوپ بسته را می‌دهند. پلاسمید حلقوی از DNA کروموزومی جدا بوده و به‌تنهایی قابلیت تکثیر را دارد (۱۸).

پلاسمیدها به‌طور طبیعی در باکتری‌ها حضور دارند، اما گاهی اوقات در ارگانیسم‌های یوکاریوت نیز یافت می‌شوند. پلاسمیدها به‌عنوان رپلیکون شناخته می‌شوند؛ چراکه قابلیت تکثیر خودبه‌خودی و مستقل را در داخل میزبان مناسب دارند. همچنین به آنها عناصر ژنتیکی متحرک نیز می‌گویند؛ زیرا می‌توانند از یک باکتری به باکتری دیگر منتقل شوند. اندازه پلاسمیدها متفاوت بوده و بین ۱۰۰۰-۱ کیلوبایت است (۱۹). در یک سلول از یک پلاسمید مشابه و یکسان می‌تواند بین یک تا هزاران کپی وجود داشته باشد. یک پلاسمید دارای چندین شکل فضایی است؛ یعنی چنانچه یک نوع پلاسمید بر روی ژل آگارز الکتروفورز شود چندین شکل فضایی از خود نشان می‌دهد. دو شکل فضایی از پلاسمید به‌نام‌های حلقوی باز و خطی می‌توانند مشکل‌ساز باشند. در باکتری، پلاسمید بیشتر به حالت فراپیچیده حضور دارد، اما درصد کمی از آن می‌تواند به‌صورت حلقوی بسته و حلقوی باز باشد؛ چراکه خارج کردن پلاسمید از داخل باکتری، منجر به تخریب و شکستن آن می‌شود (۲۰). ایزوفرم‌های حلقوی باز و خطی در هر دو رشته دچار پارگی هستند. پلاسمید خطی برای اهداف بالینی نامطلوب است؛ زیرا احتمال نوترکیبی و الحاق با DNA ژنومی وجود دارد.

البته این شکل از پلاسمید نسبت به ایزوفرم‌های فراپیچیده و حلقوی باز، مستعد تخریب است. اندازه پلاسمید برای اهداف بالینی نیز موضوعی است که اهمیت داشته و باید مورد توجه قرار گیرد و به‌طور معمول بین ۱۲-۳ کیلو جفت باز است. با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع، انواع ایزوفرم‌های پلاسمید را می‌توان از هم جدا کرد تا نوع خطی که ممکن است در طی فرآیند تخلیص پلاسمید تولید شود حذف گردد. DNA واکسنی که برای اهداف بالینی تهیه می‌شود باید عاری از هرگونه DNA ژنومی باکتریایی، پروتئین و اندوتوکسین بوده و تنها حاوی ایزوفرم فراپیچیده باشد (۲۱). DNA واکسن براساس تکنولوژی DNA نوترکیب ایجاد می‌شود. این تکنولوژی جهت فراهم‌کردن ژن‌هایی که در ارگانیسم به‌طور طبیعی وجود ندارد مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تکنولوژی یک‌سری ژن‌های خاص از یک ارگانیسم به ارگانیسمی که فاقد این ژن‌ها است منتقل می‌گردد. ابزار مورد استفاده جهت این انتقال شامل: پلاسمید، نوکلئازها، لیگازها، آنزیم‌های تغییردهنده DNA و توپوایزومرازها می‌باشد (۲۳،۲۲). ابزار مورد استفاده جهت انتقال ژن‌ها به داخل پلاسمید نیز متشکل از پلاسمید، نوکلئازها، لیگازها، آنزیم‌های تغییردهنده DNA و توپوایزومرازها می‌باشد.

✓ **نوکلئازها**

نوکلئازها، مولکول DNA را از طریق شکستن باندهای فسفو دی استر تخریب می‌کنند. دو نوع اگزونوکلئاز و اندونوکلئاز وجود دارد. اگزونوکلئازها از انتهای مولکول DNA یک نوکلئوتید را برمی‌دارند، درحالی‌که اندونوکلئازها می‌توانند باندهای فسفودی‌استر را در داخل مولکول DNA برش دهند (۲۱).

✓ **آنزیم‌های تغییردهنده**

چندین آنزیم تغییردهنده مولکول DNA از طریق اضافه‌کردن یا برداشتن گروه‌های خاص شیمیایی، منجر به تغییر DNA می‌شوند. بعضی از انواع این آنزیم‌ها شامل:

۱-آلکالین فسفاتاز: گروه فسفات موجود در انتهای '۵ DNA را برمی‌دارد.

۲- پلی‌نوکلئوتید کیناز: اثر مخالف آنزیم آلکالین فسفاتاز را دارد.

۳- ترمینال نوکلئو تیدیل ترانسفراز: یک یا چند داکسی ریبونوکلئوتید را به انتهای '۳ مولکول DNA اضافه می‌کند.

۴- توپوایزومرازها: از طریق اضافه‌کردن و برداشتن فراپیچیده، شکل فضایی DNA را تغییر می‌دهند (۲۴).

✓ **لیگازها:** آنزیم لیگاز یک رشته شکسته‌شده از DNA دورشته‌ای را ترمیم می‌کند، همچنین دو قطعه DNA دو رشته‌ای را به‌هم وصل می‌کند (۲۵).

اجزای DNA واکسن

یک DNA واکسن دارای قسمت‌های زیر است:

✓ **ژن مورد نظر:** ژن‌های متفاوت از منابع مختلف را می‌توان در این DNA واکسن کلون کرد.

✓ **پروموتر:** در بسیاری از وکتورهای طراحی‌شده، برای استفاده رد ایمونیزاسیون از پروموترهای ویروسی استفاده می‌شود. پروموترها به‌طور معمول ویروسی هستند. پروموترهای ویروسی به‌طور معمول از سایتومگالو ویروس و ویروس SV40 جدا شده‌اند. به‌طورکلی پروموترهای حاصل از ویروس‌ها در مقایسه با پروموترهای یوکاریوتی، سطح بالاتری از بیان ژن را فراهم می‌سازند، به‌ویژه پروموتر سایتومگالو ویروس که در مقایسه با سایر پروموترها، سطح بالاتری از بیان ژن را در سلول‌های ترانسفکت‌شده یوکاریوتی فراهم می‌کند (۵). با این وجود، در برخی موارد استفاده از پروموتر سایتومگالو ویروس چندان مطلوب نیست، برای مثال هنگام استفاده همزمان IFN-γ یا TNF-α با DNA واکسن، این دو سایتوکاین اثر مهاری روی بیان ژن از پلاسمید حاوی پروموتر سایتومگالو ویروس دارند. در واقع، این دو سایتوکاین منجر به کاهش رونویسی از ژن‌های تحت کنترل پروموتر سایتومگالو ویروس می‌شوند، در نتیجه چنین پروموترهایی برای اهداف ژنتیک ایمونیزاسیون و ژن‌درمانی سایتوکاینی سرطان (cancer cytokine gene therapy) مناسب نبوده و باید از پروموترهای دیگری مانند MHC-I استفاده کرد که در بررسی‌های آزمایشگاهی وکتورهای حاوی این پروموتر در مقایسه با وکتورهای حاوی پروموترهای سایتومگالو ویروس از قدرت تکثیری و تولید پروتئین بالاتری برخوردار است، همچنین می‌توان از پروموتر دسمین نیز استفاده کرد که این پروموتر، بیان پروتئین دسمین را در عضلات کنترل می‌کند. از این پروموتر به‌طور گسترده در بیان آنتی‌ژن سطحی هپاتیت B استفاده شده و

سیستم ایمنی هومورال و سلولی قوی بر ضد این آنتی‌ژن ایجاد می‌شود.

✓سطح ایمنی ایجادشده در وکتوری که حاوی این پروموتر است قابل‌مقایسه با وکتوری است که از پروموتر سایتومگالو ویروس استفاده کرده و این یافته‌ها نشان می‌دهد پروموتر دسمین نیز به اندازه پروموتر سایتومگالو ویروس قوی و مؤثر است (۲۶). پروموترهای دیگری مانند پروموتر کراتین کیناز و متالوتیونین نیز وجود دارند که مخصوص سلول‌های عضلانی و کراتینوسیت‌ها هستند. اگرچه میزان شروع رونویسی با استفاده از یک پروموتر قوی افزایش می‌یابد، اما در مواردی که بیان یک ژن منجر به مرگ سلولی گردد از پروموترهای ضعیف‌تری استفاده می‌شود. در این موارد، به جای استفاده از پروموتر قوی سایتومگالوویروس، از پروموتر SV40 که نسبت به سایتومگالو ویروس ضعیف‌تر است استفاده می‌شود. سیستم بیانی اختصاصی بافتی، یک استراتژی دیگر بوده که در آن از پروموترهایی که می‌توانند ژن‌های موردنظر را فقط در بافت‌های خاصی بیان کنند استفاده می‌شود. به کمک این سیستم می‌توان با حداقل‌رساندن امکان تحریک پاسخ ایمنی برضد پروتئین تولیدشده، یک بیان پایدار برای پروتئین فراهم کرد (۲۷)، همچنین وکتورهایی طراحی کرد که با کمک آنها، ژن‌های خاصی وارد بدن شود؛ بدون اینکه سطح ایمنی ناخواسته بر ضد آن تحریک گردد، درحالی‌که پروتئین به‌طور مداوم در بدن ساخته می‌شود. غیر از بهینه‌کردن توالی ژن جهت رسیدن به بالاترین سطح بیان نیز می‌توان خود چهارچوب واکسن را بهینه کرد برای مثال خود واکسن می‌تواند حاوی توالی‌های خاصی مانند CPG باشد که به‌عنوان ادجوانت عمل می‌کنند (۲۹،۲۸).

✓مبدأ تکثیر

این بخش از *E. coli* جدا شده و در DNA واکسن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در واقع، این بخش منجر به افزایش تعداد کپی پلاسمید داخل باکتری می‌شود که امکان تهیه مقادیر زیادی از DNA پلاسمیدی را فراهم می‌سازد (۲۶).

✓نشانگر انتخابی

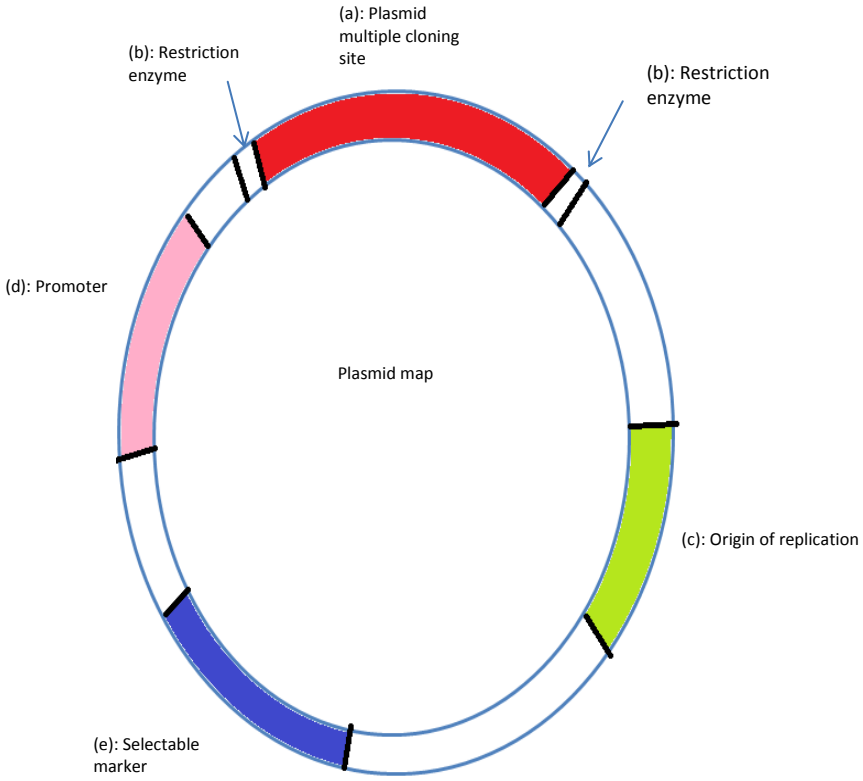
نشانگر انتخابی مانند ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، تریکلوزان و نشانگرهای انتخابی RNA است که انتخاب باکتری ترانسفورم‌شده را تسهیل می‌کند. نشانگرهایی که بیشتر از همه مورد استفاده قرار می‌گیرد مربوط به ژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی مانند ژن مقاوم به آمپی‌سیلین است (۲۷). با این وجود، چون استفاده از ژن مقاوم به آمپی‌سیلین در سلول‌های یوکاریوتی قابل‌استفاده نیست به جای ژن مقاوم به آمپی‌سیلین از ژن مقاوم به کانامایسین یا نئومایسین استفاده می‌شود (۳۰).

✓توالی سیگنال پلی‌آدنیله‌شده

در قسمت پایین دست پروموتر، یک توالی پلی‌آدنیله مانند توالی پلی‌آدنیله هورمون رشد گاوی و توالی پلی‌آدنیله SV40 وجود دارد که این توالی‌ها منجر به پایداری و ثبات mRNA رونویسی‌شده می‌شوند و نقش آنها فراهم‌نمودن یک بیان پایدار و مؤثر است (۲۶).

✓توالی کوزاک

توالی‌های اطراف کدون شروع AUG در داخل Mrna، شناسایی آن را توسط ریبوزوم‌های یوکاریوتی تحت تأثیر قرار می‌دهد. مطالعات نشان داده است توالی کوزاک، نقش بسیار مهمی در حداکثر بیان پروتئین دارد. این توالی به‌طور عمده بیشتر به‌صورت (-6GCCA/GCCAUGG+4) می‌باشد (۲۵). همچنین مطالعات نشان می‌دهد بیشترین ترجمه، زمانی به دست می‌آید که در جایگاه (۳-) یک باز پورین یا در موقعیت (۴+) یک گوانین وجود داشته باشد. بنابراین، با استفاده از این توالی کوزاک می‌توان سطح بیان این دسته از ژن‌ها را افزایش داد. ژن‌های پروکاریوتیک و بعضی از ژن‌های یوکاریوتی، این توالی کوزاک را ندارند بنابراین، با استفاده از این توالی کوزاک می‌توان سطح بیان این دسته از ژن‌ها را نیز افزایش داد (۲۶).



شکل: نقشه یک پلاسمید.

a) محل ورود ژن مورد نظر به داخل پلاسمید؛ b) محل برش DNA پلاسمید توسط آنزیم‌های محدودالاثر؛ c) محل همانندسازی پلاسمید؛ d) ژن مربوط به پروموتر؛ e) ژن مربوط به مارکر انتخابی که عمدتاً ژن مقاومت دارویی می‌باشد.

تحریک سیستم ایمنی

یکی از مهم‌ترین مزایای استفاده از DNA واکسن، تحریک همزمان سیستم ایمنی هومورال و سلولی می‌باشد (۱۵). درحالی‌که واکسن‌های قدیمی به‌طور معمول، منجر به تحریک سیستم ایمنی هومورال می‌شود. با این وجود، ایمنی‌زایی این دسته از DNA واکسن‌ها در انسان، نیازمند بهینه‌سازی است. DNA واکسن می‌تواند سیستم ایمنی سلولی و هومورال را برضد یک عامل پاتوژن تحریک کند. یک نوع از واکسن نیز می‌تواند ایمنی لازم را برضد دو یا چندین بیماری و عامل عفونی تحریک کند (۲۹).

DNA واکسن‌ها سه هدف عمده سلولی دارند:

۱- به‌طور مستقیم سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن، به‌خصوص سلول‌های دندرتیک را ترانسفکت می‌کنند.

۲- سلول‌های پیکری را ترانسفکت می‌کنند.

۳- در فرآیند آماده‌سازی متقابل، پروتئین را از سلول پیکری یا سلول عرضه‌کننده آنتی‌ژن ترانسفکت‌شده، تولید و ترشح کرده که این پروتئین توسط سلول‌های دندرتیک ترانسفکت‌نشده، سلول‌های T عرضه می‌شود. عرضه آنتی‌ژن از سلول‌های دندرتیک از طریق MHC-I و MHC-II صورت گرفته و به‌ترتیب سلول‌های +TCD4 و +TCD8 فعال می‌شوند (۳۱). وقتی ایمن‌سازی DNA از طریق پوست صورت گیرد عمده سلول‌هایی که ترانسفکت می‌شوند کراتینوسیت‌ها و سلول‌های لانگرهانس هستند. بعد از ایمن‌سازی با DNA، سلول‌های دندرتیک بالغ شده و شروع به مهاجرت می‌کنند. سلول‌های لانگرهانس و دندرتیک که به تعداد کمی در عضله حضور دارند پس از مواجهه با واکسن از طریق لنف به غدد لنفاوی مهاجرت کرده و در آنجا با سلول‌های T برخورد می‌کنند، سپس سلول‌های کراتینوسیت و میوسیت در محل تزریق ترانسفکت می‌شوند. در این مرحله، ابتدا آنتی‌ژن در این سلول‌ها ساخته شده و سپس به فضای خارج سلولی ترشح می‌شود. در ادامه، این آنتی‌ژن به‌وسیله سلول‌های دندرتیک، جذب و پردازش شده و توسط MHC-II به سلول‌های +TCD4 تحریک‌نشده عرضه می‌گردد. سلول‌های +TCD8 نیز از طریق فرآیند آماده‌سازی متقابل فعال می‌شوند (۳۲).

فرآیند آماده‌سازی متقابل به این صورت است که تحت شرایط خاصی، پپتیدهای مشتق‌شده از آنتی‌ژن‌های برون‌زاد می‌توانند وارد مسیر MHC-I شوند. در واقع در این پدیده، سلول‌های دندرتیک می‌توانند آنتی‌ژن را از مونوسیت‌های در حال مرگ، دریافت و آنها را پردازش کرده و از طریق MHC-I به سلول‌های +TCD8، عرضه و آنها را فعال کنند. در حضور سیگنال خطر مانند حضور سلول‌های درحال مرگ، سلول‌های دندرتیک موجود در محیط می‌توانند آنتی‌ژن را از سلول‌های درحال مرگ، دریافت و به سلول‌های +TCD8 عرضه کنند (۳۳).

در ایمن‌سازی، راه تزریق آنتی‌ژن بسیار مهم است. راههای داخل عضلانی، صفاقی، جلدی، وریدی، دهانی، رکتوم، داخل چشمی و بینی برای تزریق DNA واکسن در حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش‌های بسیار متداول برای تزریق شامل مخلوط واکسن در آب نمک و تزریق آن به‌وسیله سوزن و تفنگ ژنیوالکتروپوریشن می‌باشد (۳۲). DNA واکسن مخلوط در آب‌نمک به‌طور معمول به‌صورت داخل عضلانی به عضله اسکلتی و یا به‌صورت داخل جلدی به فضای خارج سلول تزریق می‌شود. از طریق ایجاد التهاب و آسیب گذرا در فیبرهای عضله، میزان نفوذ وکتور به داخل عضله افزایش می‌یابد. این آسیب گذرا از طریق تزریق محلول سوکروز و میوتوکسین‌ها صورت می‌گیرد (۷). روش تفنگ ژنی، یک روش متداول است. در این روش، DNA جذب میکروپارتیکل‌های تنگستن یا طلا شده و سپس وارد سلول هدف می‌شود. با استفاده از سوزن، مقادیر متفاوتی از DNA (۱ میلی‌گرم تا ۱۰ میکروگرم)، قابل‌تزریق به حیوان است، اما از طریق روش تفنگ ژنی، ۱۰۰۰-۱۰۰ برابر مقدار تزریقی کمتر است. یکی از دلایل عدم کارآیی DNA واکسن مربوط به کافی‌نبودن جذب DNA به‌وسیله سلول‌ها در محل تزریق است. به‌منظور افزایش جذب DNA و بیان ژن در شرایط درون‌تنی، به‌تازگی از تکنیک الکتروپوریشن استفاده می‌شود (۳۳). روش الکتروپوریشن می‌تواند برضد چندین مانع ازجمله میزان پایین ترانسفکت سلول‌ها، تحریک ناکافی سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن در محل تزریق و افزایش نفوذپذیری غشای سلول به‌صورت گذرا غلبه کند (۱۸). در نتیجه جذب DNA واکسن در سلول‌های میزبان افزایش یافته و منجر به تحریک APCها می‌شود.

به کمک این روش می‌توان پاسخ‌های سلول‌های سایتوتکسیک را بهتر تحریک کرد. در این تکنیک از جریان الکتریکی برای ایجاد منافذ به‌طور موقت در غشا و دیواره سلول باکتری استفاده می‌شود. این منافذ ایجادشده، امکان ورود DNA به داخل سلول را تسهیل می‌کنند. کارآیی مؤثر این تکنیک در عرضه DNA واکسن در انسان و پرایمات به اثبات رسیده است. جهت تزریق از راه داخل عضلانی در موش (حیوانات کوچک و بزرگ) به ترتیب ۱۰۰-۱۰ میکروگرم، ۵/۵-۰/۲ میلی‌گرم و ۳۰۰-۱۰۰ میکروگرم DNA لازم است (۳۴). درحالی‌که در تفنگ ژنی ۱-۰/۱ میکروگرم برای تزریق به موش کافی است. تزریق DNA بدون استفاده از سوزن باعث می‌شود ایمن‌سازی؛ آسان‌تر، ارزان‌تر و بدون درد باشد. اگرچه استفاده از تفنگ ژنی منجر به افزایش کیفیت تزریق می‌شود، اما در مقدار DNA تزریق‌شده محدودیت وجود دارد برای اینکه مقدار کافی از DNA تزریق گردد لازم است چندین‌بار تزریق صورت گیرد (۳۵). یک روش دیگر که منجر به افزایش جذب DNA شده و از تخریب آن جلوگیری می‌کند کپسوله‌کردن با ذرات نانو یا میکروکپسول است. مطالعات نشان داده است کمپلکس DNA با کیتوزان منجر به افزایش پاسخ ایمنی می‌شود. فرمولاسیون DNA با ترکیب پلی‌لاکتیک گلیسرولیک اسید و تولید ذرات میکروپارتیکل بهتر می‌تواند APCها را تحریک کند (۳۶). چنانچه این میکروپارتیکل از طریق داخل عضلانی تزریق گردد در مقایسه با زمانی‌که به تنهایی تزریق می‌شود، سطح بالاتری از آنتی‌بادی را تولید می‌کند. DNA واکسن را می‌توان از طریق باکتری‌های خاصی مانند *شیگلا فلکسنری*، به‌عنوان وکتور به سلول‌های APC عرضه کرد (۱۹).

مکانیسم عملکرد واکسن

مکانیسم عملکرد DNA واکسن به شرح زیر است:

۱- DNA واکسن‌ها از راههای مختلف وارد بدن می‌شود.

۲- DNA واکسن وارد سلول میزبان می‌شود.

۳- ژن موجود در DNA واکسن در داخل سلول میزبان بیان می‌شود، سپس پردازش و توسط MHC به APCها عرضه می‌گردد. DNA واکسن مانند یک عفونت ویروسی بوده و قادر به فعال‌نمودن سیستم ایمنی سلولی و هومورال می‌باشد. وقتی واکسن به داخل عضله یا پوست تزریق شود در داخل سلول

پروتئین خارجی تولید می‌شود، سپس پروتئین تولیدشده توسط پروتئازهای میزبان به پپتیدهای آنتی‌ژنی تبدیل می‌گردد (۳۷). این پپتیدهای آنتی‌ژنی، وارد شبکه اندوپلاسمیک شده و در آنجا به مولکول‌های MHC-I وصل می‌شوند، سپس این پپتید همراه MHC-I در سطح سلول عرضه شده و می‌تواند سلول‌های +TCD8 را تحریک کند. CTL فعال‌شده از طریق دو مکانیسم (متلاشی‌شدن سلول‌های آلوده و تحریک تولید کموکاین‌ها)، منجر به متلاشی‌شدن سلول‌های آلوده به ویروس می‌شود (۳۸).

پروتئین‌های آنتی‌ژنی از طریق MHC-II به سطح سلول عرضه می‌شوند. در این روش، سلول‌های +TCD4 تحریک شده و می‌توانند پروتئین‌های برون‌زاد را که توسط سلول‌های APC اندوسیتوز شده، شناسایی کنند.

پس از فعال‌شدن سلول‌های +TCD4، این سلول‌ها قادرند سلول‌های B را نیز تحریک کنند که در نهایت، سلول‌های B فعال‌شده، تولید آنتی‌بادی اختصاصی برضد آنتی‌ژن می‌کنند (۳۹).

مزایای DNA واکسن

DNA واکسن، کاربردهای بالینی مهمی دارد. انتقال ژن‌های مختلف از طریق ویروس‌هایی که به لحاظ ژنتیکی دچار تغییر شده‌اند مانند لنتی ویروس، آدنو ویروس و رترو ویروس بسیار مفید هستند؛ چون میزان و پایداری ترانسفکشن در آنها بسیار زیاد است. همراه DNA واکسن می‌توان الیگونوکلئوتیدهایی را به‌داخل سلول میزبان وارد کرد که این الیگونوکلئوتیدها می‌توانند پردازش ژن و بیان ژن را در داخل سلول تغییر دهند ازجمله این الیگونوکلئوتیدها می‌توان به siRNAها اشاره کرد (۶). siRNAها در واقع مولکول‌های RNA دو رشته بوده که در کنترل رونویسی و بیان ژن‌ها نقش دارند. عملکرد اختصاصی آنها نیز سبب شده تا امروزه برای مبارزه با سرطان مورد توجه قرار گیرند (۴۰).

DNA واکسن در مقایسه با واکسن‌های قدیمی، خطر بالایی ندارد. سیستم ایمنی کلاس I و MHC-II توسط DNA واکسن تحریک می‌شود که این یک ویژگی بسیار مهم DNA واکسن‌ها می‌باشد. می‌توان یک DNA واکسن را طوری طراحی کرد که بتواند چندین آنتی‌ژن را در یک زمان از چندین پاتوژن مختلف کد کند و بدین ترتیب با طراحی یک DNA واکسن می‌توان ایمنی را برضد چندین پاتوژن تحریک کرد. DNA واکسن‌ها، از واکسن‌های تخفیف حدت‌یافته، بسیار ایمن‌تر هستند؛ چراکه این واکسن‌ها ممکن است دچار برگشت شوند. چنانکه یک DNA واکسن چندین بار تزریق شود آنتی‌بادی بر ضد خود واکسن تولید نمی‌شود (۲۲،۱۰). برخلاف ایمن‌سازی با پروتئین، پروتئینی‌که توسط DNA واکسن در داخل سلول تولید می‌شود، شکل فضایی بهتر و نزدیک‌تری به پروتئین اصلی دارد و به‌درستی گلیکوزیله شده و مشابه پروتئین اصلی دچار تغییرات پس از ترجمه می‌شود و به این ترتیب چون پروتئین تولیدشده ساختار فضایی بهتری دارد، آنتی‌بادی خنثی‌کننده با کیفیت بالاتری تولید می‌گردد. همچنین در مقایسه با واکسن‌های قدیمی، نسبت به دما مقاوم‌تر است و نیازمند تهیه زنجیره سرمایش نیست (۴۱).

محدودیت‌های DNA واکسن

از مهم‌ترین محدودیت‌های DNA واکسن این است که تنها برای عرضه آنتی‌ژن‌های پروتئینی قابل‌استفاده است و نمی‌تواند آنتی‌ژن‌های غیرپروتئینی را تولید کند. همچنین این واکسن‌ها می‌توانند روی ژن‌هایی که رشد سلول را کنترل می‌کنند تأثیر بگذارند. همچنین امکان ایجاد تحمل نسبت به آنتی‌ژن‌هایی که توسط DNA واکسن تولید می‌شود نیز وجود دارد، هرچند گفته می‌شود DNA واکسن (مانند آنتی‌بادی ضد DNA)، می‌تواند تومورزا باشد و به داخل ژنوم سلول میزبان الحاق شده و منجر به بروز پاسخ‌های خودایمنی گردد، اما در این موارد، به‌خصوص درمورد انسان و پریمات‌ها شواهد کمی وجود دارد (۲۳). در مدل حیوانی، میزان الحاق به داخل ژنوم سلول، محاسبه و مورد مطالعه قرار گرفته است که این میزان بسیار کمتر از میزان جهش خودبه‌خودی در ژنوم پستانداران و سلول‌های یوکاریوتی است (۱). مطالعه‌ای در ماهی نشان داد ایمن‌سازی با DNA واکسن، منجر به تحریک پاسخ ایمنی می‌شود، بدون اینکه اتوآنتی‌بادی ضد DNA و الحاق به کروموزوم سلول میزبان رخ دهد. آزمایشها نشان داده است تزریق DNA واکسن ضد HIV-1 با شامپانزه‌های کودک، بالغ و باردار به‌طورکلی ایمن بوده و می‌تواند ایمنی مؤثر را از نوع هومورال و سلولی بر ضد HIV تولید کند. همچنین در اولین مطالعه بالینی DNA واکسن برضد HIV، هیچ‌گونه

واکنش موضعی، سیستماتیک، بیماری خودایمنی و آنتی‌بادی ضدDNA مشاهده نگردید (۴۱،۳۵). این یافته‌ها نشان داد تزریق DNA واکسن به بدن انسان و حیوان به‌طورکلی ایمن بوده و به‌منظور ایمن‌سازی بر ضد عوامل بیماری‌زا، بسیار مؤثر و کارآمد است. به‌تازگی دیگر مطالعه بالینی نشان داده است تزریق داخل جلدی DNA واکسن، منجر به ترانسفکت فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیت‌های پوست شده، درحالی‌که تزریق داخل عضلانی باعث ترانسفکت سلول‌های مایوسیت می‌شود. چنانچه DNA واکسن از طریق تفنگ ژنی وارد بدن گردد، به‌طور عمده بیشتر سلول‌های اپیدرمیس ترانسفکت شده و نیازمند مقدار کمتری DNA هستند. همچنین تعداد APC در پوست نسبت به عضله بیشتر است، بنابراین مقدار کمتری DNA برای تحریک پاسخ ایمنی لازم است (۳۶،۲۶).

آینده DNA واکسن

زمینه مطالعه روی DNA واکسن، بسیار گسترده بوده و با تحقیق بیشتر در این زمینه، می‌توان کیفیت ایمنی‌زایی آن را افزایش داد. بهبود بیان ژن و مهندسی ژنتیک DNA پلاسمیدی منجر به افزایش پاسخ آنتی‌بادی به محصولات ژنی می‌شود (۴۲).

DNA واکسن، یک شاخه جدید از علم پزشکی می‌باشد. در این زمینه تحقیقات متعددی در حال انجام است که در بعضی از آنها، DNA واکسنی وارد فاز کارآزمایی بالینی شده است. با افزودن ادجوانت‌های مناسب به DNA واکسن و یا استفاده از تنظیم‌کننده‌های ایمنی، می‌توان ایمنی‌زایی آن را افزایش داد (۵). همراه‌کردن ایمنی‌درمانی با شیمی‌درمانی و رادیودرمانی، منجر به بهبود و افزایش تأثیرپذیری درمان می‌شود. در آینده DNA واکسن ممکن است به شکل میکرواسفرها، نانوبیدها و میکرونانوپروجکشن، تهیه و استفاده شود. بنابراین، در آینده واکسیناسیون بدون درد، مؤثر و ایمن خواهد بود. همچنین واکسن‌هایی که در آینده تولید خواهند شد از راه دهانی یا بینی و بدون استفاده از سوزن بوده که استفاده از واکسن را آسان‌تر می‌کند (۴۲).امروزه، این نانوواکسن‌ها در مراحل آزمایشی هستند، اما چشم‌انداز امیدبخشی برای آنها متصور است. DNA واکسن چندین مزیت دارد که ازجمله می‌توان به ساخت و تهیه آسان، پایداری زیستی، مقرون به صرفه‌بودن، ایمن‌بودن و انتقال آسان اشاره کرد (۱۱).

بهبود ایمنی‌زایی واکسن

از معایب DNA واکسن، ایمنی‌زایی پایین آن است. به‌منظور بهبود ایمنی‌زایی این واکسن‌ها، تلاش‌های گسترده‌ای صورت گرفته، که ازجمله استفاده از ژن‌های مربوط به مولکول‌های کمک محرک، سایتوکاین‌ها و استفاده از روش‌های مختلف عرضه واکسن می‌باشد. امروزه، از استراتژی Prime-boost جهت افزایش ایمنی‌زایی DNA واکسن استفاده می‌شود. در این روش، DNA واکسن همراه با یک آنتی‌ژن ثانوی تزریق می‌گردد (۴۳). این آنتی‌ژن ثانویه می‌تواند یک پروتئین زیرواحدی، یک میکروارگانیسم غیرفعال‌شده یا یک وکتور ویروسی نوترکیب مانند آدنوویروس یا پاکس‌ویروس نوترکیب باشد. این روش در افزایش ایمنی‌زایی واکسن بسیار مؤثرتر از زمانی است که واکسن به تنهایی تزریق می‌شود؛ زیرا تکنیک تزریق واکسن و سیستم‌های عرضه آنتی‌ژن در واکسیناسیون DNA می‌تواند نقش مهمی را در تحریک پاسخ‌های ایمنی ایفا کند، همچنین انتخاب روش مناسب تزریق واکسن در ایجاد پاسخ ایمنی مناسب، نقش به‌سزایی دارد (۴۴). واکسیناسیون بیشتر از طریق پوست (به دلیل نوع سلول‌ها ازجمله سلول‌های لانگرهانس و تجمع آنها در این منطقه)، صورت می‌گیرد. الکتروپوریشن یک تکنیک جدید بوده که در آن DNA با ورود به داخل سیتوپلاسم سلول میزبان باعث افزایش ترانسفکت سلول می‌شود (۳۵). باکتری‌های داخل سلولی مانند *سالمونلا تیفی*، *شیگلا فلکسنری* و *لیستریا مونوسیتوژنز* به‌عنوان وکتور در عرضه DNA واکسن به سلول میزبان نیز کاربرد دارند. به‌طورکلی، میکروارگانیسم‌هایی که به لحاظ تاکسونومی به یکدیگر نزدیک هستند مانند *اشرشیاکلی* و *سالمونلا انتریکا*، از کدون‌های مشابهی برای سنتز پروتئین‌ها استفاده می‌کنند؛ درحالی‌که ارگانیسم‌هایی که به لحاظ تاکسونومی از یکدیگر دور هستند از کدون‌های مختلف و متفاوتی استفاده می‌کنند (۴۴).

مشخص شده است ژن‌های حاوی کدون‌های نادر، در مقایسه با ژن‌هایی که دارای کدون متواتر هستند؛ بیان متفاوت داشته و کمتر بیان می‌شوند. بنابراین، با تغییر در توالی ژن از طریق تغییر و دستکاری می‌توان بیان ژن را در DNA واکسن افزایش داد. در این تکنیک، کدون‌هایی که تواتر پایینی برای یک اسیدآمینه

دارند، جایگزین کدون‌هایی که تواتر و فراوانی بالایی دارند، می‌شوند. امروزه، تکنیک بهینه‌سازی کدون در مورد DNA واکسن HIV مورد استفاده قرار گرفته است (۴۵).

DNA واکسن خود به دلیل داشتن موتیف CPG، اثر تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی را دارد و به‌عنوان ادجوانت مطرح است. موتیف CPG با TLR-9 واکنش داده و منجر به بالغ‌شدن تمایز و تکثیر سلول‌های B، کشنده طبیعی، مونوسیت، ماکروفاژ و لنفوسیت می‌شود (۴۵). همچنین DNA واکسنی که همراه با موتیف CPG تزریق شده، می‌تواند منجر به افزایش پاسخ ایمنی هومورال و مقاومت بالاتر گردد. CPG نیز به‌عنوان یک سیگنال خطر (Danger signal) عمل کرده و منجر به افزایش بیان mRNA IL-12 و فعال‌شدن Th1 می‌شود (۲۹). در واکسن آنتراکس که تنها واکسن مجوزیافته بر ضد آنتراکس انسانی است، از الیگونوکلئوتید CPG، به‌منظور تسریع و تقویت پاسخ ایمنی برضد آنتراکس استفاده می‌شود. موتیف CPG باعث تحریک پاسخ‌های ایمنی ذاتی، القای تولید IFN-α، IFN-β، IL-12 و IL-18 از ماکروفاژ، مونوسیت، IFN-γ و IL-18 از سلول کشنده طبیعی می‌شود که این سایتوکاین‌ها در نهایت، باعث تحریک و تمایز سلول‌های تحریک‌نشده به سلول‌های Th1 می‌شوند. این سایتوکاین‌ها، به‌خصوص IL-12 منجر به بلوغ سلول دندرتیک، همچنین افزایش بیان مولکول‌های CD86، CD40 و MHC-II در سطح سلول دندرتیک می‌شوند (۴۶). مطالعات نشان داده است APCهای موجود در محل تزریق DNA واکسن که به‌طور مستقیم به‌وسیله آن ترانسفکت می‌شوند ابتدا آنتی‌ژن واکسن را بیان، سپس پردازش و در مرحله بعد، آنتی‌ژن را عرضه می‌کنند. در ادامه، به غدد لنفاوی مهاجرت کرده ودر آنجا با سلول‌های تحریک‌نشده سلول T برخورد می‌کنند، وقتی سلول‌های T سلول به این صورت فعال شوند شروع به مهاجرت به سمت طحال کرده و تبدیل به سلول‌های T حافظه‌ای می‌شوند (۴۷). امروزه، چندین رسپتور سیستم ایمنی ازجمله TLR به‌عنوان ادجوانت جهت افزایش اثربخشی DNA واکسن مورد استفاده قرار گرفته است.

به‌منظور افزایش ایمنی‌زایی DNA واکسن می‌توان آن را به‌گونه‌ای طراحی کرد که به‌طور اختصاصی وارد سلول‌های APC شود برای مثال چنانچه ژن مورد نظر به ژن کدکننده زنجیره آنتی‌بادی وصل گردد این آنتی‌بادی می‌تواند به‌طور اختصاصی به رسپتور CD205 در سطح دندرتیک سل سلول دندرتیک، متصل و به‌طور اختصاصی تنها دندرتیک سل سلول دندرتیک را فعال کند (۴۴).

فلاژلین یک آگونیست TLR5 است که می‌تواند پاسخ ایمنی ذاتی را تحریک کند. تزریق جلدی پلاسمیدهای کدکننده فلاژلین و نوکلئوپروتئین ویروس آنفولانزا باعث تقویت پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال می‌شود (۳۸). امروزه، ۱۵ سال از اولین DNA واکسنی که وارد فاز کارآزمایی بالینی‌شده می‌گذرد، اما تاکنون هیچ DNA واکسنی در انسان مجوز برای استفاده دریافت نکرده است. با این وجود، بسیاری از محققان در تلاشند تا از طریق روش‌هایی مانند بهینه‌سازی کدون‌ها، انتخاب آنتی‌ژن مناسب، مولکول‌های سیگنال‌دهنده ایمنی ذاتی به‌عنوان ادجوانت، استراتژی Prime-boost، کیفیت DNA واکسن را افزایش دهند (۴۸،۱۱).

نتیجه‌گیری

DNA واکسن، ترکیبی از داکسی ریبونوکلئیک اسید است که آنتی‌ژن‌های اختصاصی را کد کرده و توانایی تحریک سیستم ایمنی سلولی و هومورال را نیز دارد. از زمان معرفی آن در بیش از ۲۰ سال قبل، پیشرفت‌های زیادی در این حوزه صورت گرفته مانند استفاده از الکتروپوریشن و سایر تکنیک‌های پیشرفته جهت انتقال واکسن به بدن، کشف ادجوانت‌های ژنتیکی، استفاده از استراتژی Prime-boost و غیره تا بتوان اثربخشی آن را ارتقا داد. آنچه مشخص است این است که توسعه و کاربرد واکسن برپایه اسید نوکلئیک به سرعت در حال متحول شدن بوده، به‌طوری‌که تخمین زده می‌شود ارزش تجاری آن تا سال ۲۰۱۹ به بیلیون‌ها دلار برسد.

References:

1. Plotkin S. History of vaccination. Proc Natl Acad Sci U S A 2014;111(34):12283–7.
2. Clem AS. Fundamentals of vaccine immunology. J Glob Infect Dis 2011;3(1):73–78.
3. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. Proc (Bayl Univ Med Cent) 2005;18(1):21–5.
4. Topley WWC. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 10th ed. London: wiley; 2005.
5. Plotkin SA. Vaccines: The Fourth Century. Clin vaccine immunol 2009;16(12):1709–19.
6. Bernadette F, Matthew PM, Natalie AH, Thomas HS, Colleen EL, David BW. Clinical applications of DNA vaccines: Current progress. Clin Infect Dis 2011;53(3):296-302.
7. Fındık A, Çiftci A. Bacterial DNA vaccines in veterinary medicine: A review. J Vet Adv 2012;2(4):139-48.
8. Teimourpour R, Sadeghian A, Meshkat Z, Esmaelizad M, Sankian M, Jabbari AR. Construction of a DNA vaccine encoding Mtb32C and HBHA genes of mycobacterium tuberculosis. Jundishapur J Microbiol 2015;8(8):e21556.
9. Baghani A, Safdari H, Teimourpour R, Meshkat Z. Designing and construction Pcdna3.1 Vector Encoding Cfp10 Gene of Mycobacterium tuberculosis. Jundishapur J Microbiol 2015;8(10):e23560.
10. Mirshahabi H, Meshkat Z, Soleimanjahi H, Mohamad Hassan Z. Construction a DNA vaccine containing human papillomavirustype 16 early genes as a potential vaccine for cervicalcancer prevention and therapy. Iran J Pathol 2009;4(2):65-70.
11. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: Ready for prime time? Nat Rev Genet 2008;9(10):776-88.
12. Lewis PJ, Babiuk LA. DNA vaccines: A review. Adv Virus Res 1999;54:129-88.
13. Humeau LTC, Trimble C, Morrow M, Shen X, Dallas M, Weiner D, et al. DNA vaccine VGX-3100 with electroporationinduces regression of cervical intraepithelialneoplasia 2/3 and clears HPV infection withrobust T cellresponses: Results of a randomized,double-blind, placebo-controlled Phase II trial. J Immuno Ther Cancer 2014;2(Suppl 3):17.
14. Oka Y, Tsuboi A, Kawakami M, Elisseeva OA, Nakajima H, Udaka K, et al. Development of WT1 peptide cancervaccine against hematopoietic malignancies and solid cancers. Curr Med Chem 2006;13(20):2345-52.
15. Dhama K, Mahendran M, Gupta PK, Rai A. DNA vaccines and their applications in veterinary practice: Current perspectives. Vet Res Commun 2008;32(5):341-56.
16. Hayat Khan K. DNA vaccines: Roles against diseases. Germs 2013;3(1):26–35.
17. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: Immunology, application ,and optimization. Annu Rev Immunol 2000;18:927-74.
18. Ghanem A, Healey R, Adly FG. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines :A review. Anal Chim Acta 2013;760:1–15.
19. Bates MK, Zhang G, Sebestyén MG, Neal ZC, Wolff JA, Herweijer H. Genetic immunization for antibody generation in research animals by intravenous delivery of plasmid DNA. BioTechniques 2006;40(2):199-207.
20. Prather KJ, Sagar S, Murphy J, Chartrain M. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: Plasmid design, production, and purification. Enzyme Microb Technol 2003;33(7):865-83.
21. del Solar G, Giraldo R, Ruiz-Echevarría MJ, Espinosa M, Díaz-Orejas R. Replication and control of circular bacterial plasmids. Microbiol Mol Biol Rev 1998;62(2):434-64.

22. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. Microbiol Rev 1988;52(3):375-95.

23. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, FranciaMV, Rocha EPC, Cruz F. Mobility of plasmids. Microbiol Mol Biol Rev 2010;73(3):434-52.

24. Pinto UM, Pappas KM, Winans SC. The ABCs of plasmid replication and segregation. Nat Rev Microbiol 2012;10(11):755-65.

25. Gill DR, Pringle A, Hyde SC. Progress and Prospects :The design and production of plasmid vectors. Gene Ther. 2008;16(2):165-71.

26. Saltzman WM, Shen H, Brandsma JL. Methods in molecular medicine. 2nd ed. New Jersey: Humana Press; 2006.

27. Williams JA. Vector design for improved dna vaccine efficacy, safety and production. Vaccines (Basel) 2013;1(3):225-49.

28. Sorensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N, Wuertz S. Studying plasmid horizontal transfer in situ: A critical review. Nat Rev Microbiol 2005;3(9):700-10.

29. McCluskie MJ, Weeratna RD, Davis HL. The role of CpG in DNA vaccines. Springer Semin Immunopathol 2000;22(1-2):125-32.

30. El-Attar LM, Scott S, Goh S, Good L. A pestivirus DNA vaccine based on a non-antibiotic resistance Escherichia coli essential gene marker. Vaccine 2012;30(9):1702-9.

31. Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: Antigen presentation and the induction of immunity. J Leukoc Biol 2008;68(6):793-806.

32. Saade F, Petrovsky N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. Expert Rev Vaccines 2012;11(2):189-209.

33. Nchinda G, Kuroiwa J, Oks M, Trumpfheller C, Park CG, Huang Y, et al. The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. J Clin Invest 2008;118(4):1427-36.

34. Dupuis M, Denis-Mize K, Woo K, Goldbeck Ch, Selby MJ, Chen M, et al. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. J Immunol 2000;165(5):2850-8.

35. Kumar U, Kumar S, Varghese Sh, Chamoli R, Barthwal P. DNA vaccine: A modern biotechnological approach towards human welfare and clinical trial. Int J Res Biomed Biotech 2013;3(1):17-20.

36. Wang D, Xu J, Feng Y, Liu Y, McHenga SS, Shan F, et al. Liposomal oral DNA vaccine (mycobacterium DNA) elicits immune response. Vaccine 2010;28(18):3134-42.

37. Repique CJ, Li A, Collins FM, Morris SL. DNA immunization ina mouse model of latent tuberculosis: Effect of DNA vaccination on reactivation of disease and on reinfection with a secondary challenge. Infect Immun 2002;70(7):3318-23.

38. Fioretti D, Iurescia S, Fazio VM, Rinaldi M. DNA Vaccines: Developing new strategies against cancer. J Biomed Biotechnol 2010;2010(174378):16.

39. Meshkat Z, Soleimanjahi H, Mahmoudi M, Hassan ZM, Mirshahabi H, Meshkat M, et al. CTL Responses to a DNA Vaccine Encod-ing E7 Gene of Human Papillomavirus Type 16 from an Iranian Isolate. Iran J Immunol 2008;5(2):82-91.

40. Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment. Adv Drug Deliv Rev 2009;61(10):850-62.

41. Huygen K. On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of mycobacterial diseases. Infect Immun 2003;71(4):1613-21.

42. Ingolotti M, Kawalekar O, Shedlock DJ, Muthumani K, Weiner DB. DNA vaccines for targeting bacterial infections. Expert Rev Vaccines 2011;9(7):747-63.

43. Ramshaw IA, Ramsay AJ. The prime-boost strategy: Exciting prospects for improved vaccination. Immunol Today 2000;21(4):163-5.

44. Boyle JS, Silva A, Brady JL, Lew AM. DNA immunization: Induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94(26):14626-31.

45. McShane H, Brookes R, Gilbert SC, Hill AV. Enhanced immunogenicity of CD4+ T-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. Infect Immun 2001;69(2):681-6.

46. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. Expert Rev Vaccines 2012;10(4):499-511.

.

47. Kobiyama K, Jounai N, Aoshi T, Tozuka M, Takeshita F, Coban C, et al. Innate immune signaling by, and genetic adjuvants for DNA vaccination. Vaccines 2013;1(3):278-92.

48. Garmory HS, Brown KA, Titball RW. DNA vaccines: Improving expression of antigens. Genet Vaccines Ther 2003;1(1):2.