

القای ایمنی فعال به کمک واکسیناسیون ژنتیکی

ملیحه نادری^۱، نغمه قلی‌پور^۲، سکینه مشجور^{۳*}

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم ایران

۲- دانشجوی دکتری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۳- موسسه آموزش عالی غیردولتی-غیرانتفاعی سنا ساری، ساری، ایران

۴- دکتری زیست شناسی دریا، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان، ایران

sakynemashjoor@gmail.com

چکیده

واکسیناسیون دی.ان.ا. یا ایمنی‌زایی ژنتیکی، فناوری جدیدی است که می‌تواند منجر به کاهش بیماری‌های عفونی و نرخ مرگ و میر شود. این رویکرد با تحریک سیستم ایمنی، منجر به محافظت در برابر بسیاری از بیماری‌های عفونی، بدخیمی‌ها و اختلالات خودایمنی در مدل‌های حیوانی شده و به صورت وسیعی به منظور توسعه واکسن‌های ایمن، جدید و کارآمد در انسان‌ها و حیوانات مورد مطالعه قرار گرفته است. در این روش دی.ان.ا. پلاسمیدی رمزکننده پروتئین‌های خارجی می‌تواند به عنوان ایمونوژن محسوب شده و به تنهایی یا همراه با ادجوانت‌های مختلف به صورت عضلانی تزریق شود و بر پایه یافته‌های آزمایشگاهی اخیر، القاگر پاسخ‌های آنتی‌بادی، لنفوسیت‌های T کمکی و لنفوسیت T با عملکرد سمیت سلولی در حیوانات اهلی باشد. در روش‌های ایمن‌سازی غیرفعال، هدف تنها حفاظت گذرا و تسکین شرایط موجود است، حال آن‌که در ایمنی‌زایی فعال حصول یک ایمنی پایدار و بلند مدت، مقصود نهایی است و واکسن‌های دی.ان.ا. یکی از گزینه‌های جدید مهندسی ژنتیک در حوزه ایمن‌زایی است. هدف از مقاله حاضر، معرفی واکسن‌های دی.ان.ا. و پاسخ‌های ایمنی القایی آن‌ها به منظور حصول یک حفاظت پایدار و رشد و توسعه بیشتر این فناوری در سطوح تحقیقات ملی است.

کلمات کلیدی: واکسیناسیون دی.ان.ا.، ایمنی، ژنتیک، آنتی‌بادی.

مقدمه

یا کشته شده در حذف بسیاری از عفونت‌های میکروبی
اثبات شده است، اما الزامات ایمنی و عوامل بیماری‌زای
متعدد، بهره‌گیری از روش‌های نوین واکسیناسیون را

ایمنی‌زایی ژنتیکی فناوری جدیدی برای واکسیناسیون
است. اگرچه تاثیر واکسن‌های سنتی زنده ضعیف شده

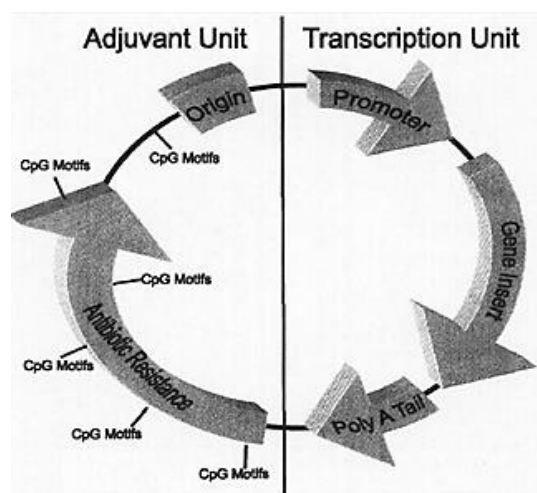
ضروری ساخته است. علی‌رغم این‌که پاسخ ایمنی همورال به وسیله برخی از واکسن‌های معمولی القا می‌شود، اما این واکسن‌ها قابلیت پیشگیری از بسیاری از عوامل مانند ویروس هرپس سیمپلکس، مالاریا و HIV را نداشته و به احتمال زیاد پاسخ اصلی برای از بین بردن آن‌ها صرفاً القاء ایمنی سلولی است (۱۰). مطالعات نخست نشان داد که تلقیح پلاسמיד دی.ان.ا به عضلات موش می‌تواند منجر به بیان قابل توجهی از پروتئین‌های رمزکننده پلاسמיד شود (۶۶). همزمان با این کشف، آنتی‌ژن‌های متعدد رمز شده توسط پلاسמידها، به منظور القای تولید آنتی‌بادی (۵۹،۹) و نیز لنفوسیت‌های T با عملکرد سمیت سلولی معرفی شدند (۶۲) که این امر منجر به اثبات موفقیت‌آمیز واکسیناسیون دی.ان.ا و ژن درمانی شد (۱۹). واکسن‌های دی.ان.ا با انواع خوراکی و تزریقی، نشان دهنده‌ی یک رویکرد جدید محافظت و ایمن‌سازی سریع در برابر انواع بیماری‌های عفونی مقاوم به درمان‌های آنتی‌بیوتیکی سنتی، با چشم‌انداز ارتقا ایمنی انسان و حیوان، کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و کاهش گسترش عوامل بیماری‌زا است (۲،۳۶). امروزه از این دسته از واکسن‌ها به منظور پیشگیری از عفونت‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی (۴۳)، درمان سرطان، بیماری‌های خودایمنی و آلرژی استفاده می‌شود (۳۶،۴۳). زیرا دی.ان.ا واکسن‌ها روش موثری برای القای ایمنی اختصاصی آنتی‌ژن بوده (۴۵) و می‌توانند سطوح مناسبی از بیان آنتی‌ژنی را در سلول ایجاد کنند (۲۳،۲۴). نظر به تولید آسان، کم‌هزینه، پایدار، ایمن (۲۳،۲۴) و مقاوم به حرارت آن‌ها (۲)، این دسته از واکسن‌ها را می‌توان در مقیاس زیاد تولید و به راحتی ذخیره نمود (۴۳). به‌علاوه، این پلاسמידها نسبتاً

بی‌خطر بوده و قادرند بارها بدون عوارض جانبی در بدن وارد شده و با بیان طولانی مدت دی.ان.ا در سلول، حافظت ایمونولوژیک سلول را امکان پذیر سازند (۸).

ساخت دی.ان.ا واکسن‌ها

دی.ان.ا واکسن‌ها شامل ژن‌های خارجی کلون شده در پلاسמיד باکتریایی هستند. این پلاسמיד با استفاده از فناوری‌های مهندسی ژنتیک در سلول‌های یوکاریوتی بیان می‌شوند (۲۴). پلاسמיד باکتریایی دارای یک مبدا برای تکثیر و همانندسازی پلاسמיד در میزبان انتخابی (سلول‌های پستانداران)، آغازگر قوی ویروسی همانند سیتومگالوویروس (CMV) و یا SV40، ژن مورد نظر (ژن رمزکننده‌ی پروتئین ایمنی پاتوژن)، توالی ختم/رونویسی/ پلی‌آدنیلایسون (۲،۱۴) و ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی (این ژن فرآیند انتخاب پلاسמיד در طول کشت باکتریایی را امکان‌پذیر می‌سازد) است (شکل ۱). ژن مقاومت به آمپی‌سیلین از جمله موارد متداول در مطالعات بر روی موش است که نتایج آن قابل تعمیم به انسان نیز می‌باشد. هرچند کانامایسین نیز در اغلب مطالعات کاربرد داشته (۲۴) و جزء دیگر مارکرهای انتخابی است که به منظور انتخاب آسان ارگانیزم ترانسفرم شده حامل پلاسמיד استفاده می‌شود (۲،۱۴). توالی‌های ژن موردنظر (برای مثال ژن‌های آنتی‌ژنتیک یا ادجوانت‌های ایمنی) که به صورت مصنوعی و یا توسط فناوری PCR تکثیر و خالص‌سازی شده و به کمک آنزیم به منطقه‌ی کلونینگ در پلاسמיד وارد شده‌اند، با استفاده از روش‌های تزریقی به صورت مستقیم با تزریق عضلانی زیرجلدی و یا داخل پوستی و بصورت دی.ان.ا برهنه به میزبان وارد می‌شوند. به دنبال این ورود واکسن، پاسخ‌های ایمنی در بدن میزبان شروع می‌شود (۲،۴۳).

"نادری و همکاران، القای ایمنی فعال به کمک واکسیناسیون ژنتیکی"



شکل ۱- نمایی از ناقل پلاسمیدی به عنوان دی.ان.ا. واکسن. این ناقل شامل ناحیه رونویسی‌شونده است که مشتمل بر آغازگر ویروسی، ناحیه ورودی آنتی‌ژن و توالی رونویسی/ پایانی است. دیگر بخش‌های ضروری آن عبارتست از: ناحیه همانندسازی باکتری و ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی که به باکتری اجازه رشد و انتخاب شدگی می‌دهد. بسیاری از خصوصیات این وکتورها می‌تواند متاثر از موتیف‌های CPG در ساختار پلاسمید باشد (۲۴).

پاسخ‌های ایمنی القایی دی.ان.ا. واکسن‌ها

سیستم دفاعی پستانداران و ماهی‌ها شامل لوکوسیت‌ها و مشتقات آن‌هاست که اغلب در اندام‌های لنفوئیدی مانند تیموس، طحال و کلیه بوده و چند بافت دیگر (همانند کبد، پوست، روده و آبشش) که مشتمل بر سلول‌های دفاعی و پروتئین‌هاست. سیستم ایمنی شامل هر دو مکانیسم دفاع اکتسابی و ذاتی است که عوامل بیماری‌زا را به شیوه‌ای مشخص حذف می‌کند. چند دقیقه پس از ورود آلودگی، سیستم دفاع ذاتی فعال می‌شود. در حالی‌که دو تا سه هفته زمان لازم است تا مکانیسم دفاع اکتسابی فعال شود و عوامل بیماری‌زا را از بین ببرد (۲). دی.ان.ا. باکتری‌ها، بی‌مهرگان و برخی از ویروس‌ها، نسبت به مهره‌داران ساختار متفاوتی داشته و دارای دی‌نوکلئوتیدهای CPG فراوانی است (۵) و گزارش‌ها نشانگر این است که Toll- (TLR9) like receptor 9 قادر است این موتیف‌ها را تشخیص دهد (۲۶). TLR9 متصل به دی.ان.ا. منجر به فعال‌سازی

درون سلولی و تولید سایتوکاین از نوع اینترفرون می‌شود که همین امر تا حدودی در تقویت مبارزه با عفونت‌های ویروسی نقش دارد. وجود این موتیف‌ها در این دسته از واکسن‌ها تا حدودی در از بین بردن این دسته از آلودگی‌ها موثر بوده و به نوعی ایجادکننده‌ی پاسخ‌های ایمنی ذاتی است (۳۸). واکسیناسیون دی.ان.ا. پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولار از نوع Th و CTL را به منظور محافظت بر علیه عوامل بیماری‌زای انگلی، باکتریایی و ویروسی القا می‌کند (۴۰، ۵۷). این نوع از واکسیناسیون در برابر ویروس‌هایی نظیر آنفلوانزا (۵۲، ۶۲)، هاری (۶۷)، هرپس سیمپلکس ویروس (۴۲)، پاپیلوما (۱۳) و فلاوی ویروس (۴۸) محافظت ایجاد کرده و موثر می‌باشد، اما بر علیه سل (۲۷، ۶۰)، لیشمانیوز (۶۸) و مالاریا تاثیر ندارد (۱۶، ۵۵). نتیجه پاسخ‌های ایمنی بستگی به عامل عفونی، سلول فعال شده میزبان و نهایت سایتوکاین ایجاد شده توسط لوکوسیت‌ها دارد. در کل ایمنی همورال به عفونت

ناشی از عوامل بیماری‌زای خارج سلولی، مانند باکتری‌ها واکنش نشان می‌دهد، در حالی‌که فعال‌سازی سلولی ممکن است منجر به حذف عوامل بیماری‌زای درون سلولی مانند آنزیم‌ها، آکسی‌رادیکال‌ها و مواد

حل‌کننده‌ی غشا نیز شود (۲). در جدول ۱ القای پاسخ‌های ایمنی و انواع روش‌های واکسیناسیون نشان داده شده است.

جدول ۱- مقایسه روش‌های واکسیناسیون (۲۴)

پاسخ ایمنی	دی.ان.ا. واکسن	زنده ضعیف شده	کشته شده / واکسن زیرواحدی
همورال	+++	+++	+++
سلولار	CD4 ⁺	Th ₁ -/+	Th ₁ -/+
	CD8 ⁺	+++	-
سلول عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن	MHC کلاس I و II	MHC کلاس I و II	MHC کلاس II
سلول خاطره همورال	+++	+++	+++
سلولار	++	+++	-/+
تولید	++++	+	++
هزینه	+++	+	+
نگهداری و انتقال	+++	+	+++
ایمنی	+++	++	++++

دنبال دارد (۷، ۵۷). این دسته از تکنیک‌ها به‌خصوص زمانی که با یکدیگر ترکیب می‌شوند، منجر به تقویت سطح پاسخ‌های ایمنی در جوندگان و مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی می‌شوند (۴۳). با این حال، نقص عمده‌ی این واکسن‌های ایمنی، زمانی است که به صورت درون عضلانی تجویز و تلقیح می‌شوند. چرا که برای ایجاد پاسخ ایمنی قوی در انسان حداقل ۵-۱۰ میلی‌گرم دی.ان.ا. لازم است (۱۲). همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده، با استفاده از مکانیسم‌های سلولی میزبان، پلاسمید به هسته سلول‌های انتقالی (مانند میوسیت‌ها یا کراتینوسیت‌ها) و یا سلول‌های ارائه‌کننده‌ی آنتی‌ژن APCs وارد می‌شود. سپس ژن‌های رمزگذاری شده در پلاسمید رونویسی شده، به صورت پروتئین درآمده و به پپتیدهای رشته‌ای تبدیل می‌شوند. MHC به مجموعه‌ای از پروتئین‌ها گفته می‌شود که آنتی‌ژن

پس از تزریق پلاسمید دی.ان.ا. به صورت داخل وریدی، دی.ان.ا. به سرعت تخریب می‌شود و محصولات ناشی از این تخریب به عنوان ماده غذایی استفاده شده و یا در ادرار دفع می‌شوند (۲۵). این نوع از واکسن‌ها به سادگی تولید می‌شوند و قادر به القای پاسخ‌های ایمنی قوی همورال و سلولار هستند که این امر آن‌ها را به عنوان واکسن‌های موثر و کارآمد معرفی کرده است (۲۲). با استفاده از چندین تکنیک می‌توان کارایی این دسته از واکسن‌ها را افزایش و توسعه داد که شامل تکنیک‌های بهینه‌سازی ژن (Gene optimization)، طراحی ساختار RNA و استفاده از ادجوانت‌های ایمنی می‌باشند. برای مثال استفاده از روش اختصاصی بهینه‌سازی ژن منجر به افزایش تولید پروتئین در هر سلول می‌شود و این امر افزایش پاسخ‌های سلول T (۴۹، ۶۹) و القای آنتی‌بادی را به

"نادری و همکاران، القای ایمنی فعال به کمک واکسیناسیون ژنتیکی"

میکروب‌های درون سلولی را به سلول‌های T عرضه می‌کنند. آنتی‌ژن‌های میزبانی سنتز شده می‌توانند هر دو مولکول‌های MHC کلاس یک و دو را در زمان تزریق واکسن به میزبان تحریک و فعال کنند. APCs نقش تعیین‌کننده‌ای در القای ایمنی واکسن‌های دی.ان.ا. توسط قرارگیری پپتیدهای داخلی بر روی مولکول MHC کلاس یک ایفا می‌کند. این مولکول‌ها همراه با آنتی‌ژن به غدد لنفاوی مهاجرت می‌کنند. جایی که مجموعه‌ی MHC-پپتیدهای آنتی‌ژنی، طی پروسه‌ی سیگنالینگ مولکول‌های سلول‌های T را تحریک و فعال می‌کند. این برهمکنش‌ها سیگنال‌های ثانویه‌ای را برای شروع پاسخ‌های ایمنی و فعالسازی و گسترش سلول‌های T و یا فعال کردن ایمنی همورال به صورت آبشاری به دنبال دارد (۴۳).

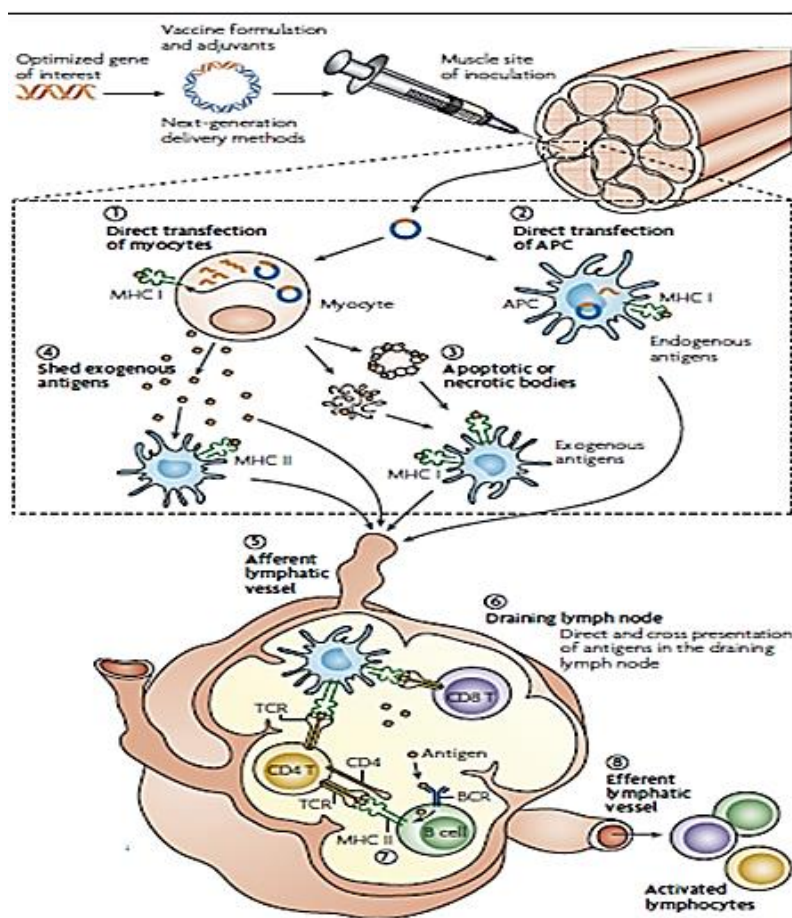
ایمنی همورال

امروزه پلاسمیدهای دی.ان.ا. ابزار مفیدی در ایجاد پاسخ‌های ایمنی همورال بر علیه پروتئین‌های خارجی متعدد در آزمایشگاه و مدل‌های حیوانی محسوب می‌شوند (۵۹). پس از واکسیناسیون، سلول‌های میزبان می‌توانند آنتی‌ژن‌هایی را تولید کنند که توسط APCs اندوسیتوز می‌شوند. در ادامه این پپتیدهای آنتی‌ژن‌های اندوسیتوز شده بر روی مولکول‌های MHC II حاضر خواهند شد، تا آنتی‌بادی‌ها توسط پلاسماسل‌ها تولید شوند. در حقیقت دی.ان.ا. واکسن‌ها یک روش مفید برای تولید آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن‌های رمز شده هستند (۶۳). زیرا دی.ان.ا. واکسن مرکب از چندین آنتی‌ژن مختلف از یک پاتوژن القاکننده‌ی پاسخ‌های ایمنی وسیع بوده، که نتیجه آن ایجاد ایمنی همورال علیه عواملی چون ویروس‌ها با تنوع آنتی‌ژنی گسترده است (۱۱). ورود این پلاسمید به سطوح مخاطی از طریق

محصور کردن آن در میکروسفرها (microspheres)، یا از طریق کاربری مستقیم با ادجوانت‌های مخاطی یا لیپیدهای کاتیونی در موش منجر به ترشح پاسخ ایمنی شده است (۱۴). واکسیناسیون دی.ان.ا. منجر به بیان آنتی‌ژن توسط سلول‌های میزبانی می‌شود که این امر در مقایسه با دیگر واکسن‌ها بسیار موثرتر است. بنابراین این نوع از ایمونیزاسیون یک روش مفید به منظور ایجاد پاسخ‌های ایمنی همورال در حیوانات در برابر پروتئین‌های ویروسی، باکتریایی، انگلی و توموری است. تحقیقات نشان داده است که توانایی این دسته از واکسن‌ها در تولید ایمنی همورال و به منظور تولید پروتئین‌های بالغ می‌تواند بیشتر از پروتئین‌های غشایی یا محلول نیز باشد (۱۴). پاسخ آنتی‌بادی القا شده توسط واکسن‌های دی.ان.ا. ممکن است توسط برخی از متغیرها نظیر نوع آنتی‌ژن رمزگذاری شده، محل بیان آنتی‌ژن، تعداد و دوز واکسن، محل و نحوه ارائه آنتی‌ژن تحت تاثیر قرار گیرد. بنابراین این دسته از پاسخ‌ها پس از تزریق دی.ان.ا.، در مقایسه با تزریق پروتئین‌های نوترکیب بسیار طولانی‌تر بوده و دوام القای بیان بیشتر بوده است. آزمایش‌ها نشان داده است که پاسخ‌های آنتی‌بادی بر علیه پروتئین پوششی ویروس هپاتیت B توانسته تا بیشتر از ۷۴ هفته نیز بدون افزایش پایدار بماند. درحالی‌که پاسخ دفاعی بر علیه هم‌گلوتینین ویروس آنفلوانزا تنها پس از القا با تفنگ ژنی صورت گرفته است. زیرا در این روش سلول‌های ترشح‌کننده به منظور تولید طولانی‌مدت آنتی‌بادی قادرند به مغز استخوان و طحال مهاجرت کرده و پس از یکسال هنوز ترجمه شوند (۳۱). در جدول ۲ خلاصه‌ای از مقایسه القای پاسخ‌های آنتی‌بادی توسط عفونت‌های طبیعی ویروسی، ایمنی‌زایی با پروتئین‌های نوترکیب و دی.ان.ا.

دی.ان.ا کمتر از واکسیناسیون با پروتئین‌های نو ترکیب است. هر چند این دسته از آنتی‌بادی‌ها گرایش بیشتری به اپی‌توپ‌های طبیعی دارند. به عبارت دیگر، ایمنی زایی دی.ان.ا. توانسته پاسخ‌های کیفی‌تری را القا کند (۴۱).

ارائه شده است. پاسخ‌های ایمنی القا شده توسط دی.ان.ا در مقایسه با دو مورد دیگر خیلی کمتر افزایش پیدا می‌کند. این پاسخ آهسته احتمالاً مرتبط با سطوح پایین آنتی‌ژن بیان شده در طول چند هفته است که در مراحل اولیه و ثانویه رخ می‌دهد. علاوه بر این، تیتراژ آنتی‌بادی اختصاصی القا شده توسط واکسیناسیون



شکل ۲- این تصویر شماتیک توالی ژن انتخابی را نشان می‌دهد که در ناحیه مورد نظر در ساختار پلاسمید انتقال دهنده وارد شده و سپس این کلون با استفاده از فناوری‌های ورود به پوست تزریق شده است. در سلول این پلاسمید با بهره‌گیری از مکانیسم‌های سلولی میزبان، به هسته میوسیت‌ها (۱) و یا APCs (۲) وارد می‌شود و به دنبال ورود، رونویسی از ژن صورت گرفته و تولید پروتئین در سیتوپلاسم سلول انجام می‌پذیرد. این پروتئین‌ها به عنوان آنتی‌ژن‌ها، فاکتوری برای تحریک پاسخ‌های ایمنی میزبان محسوب می‌شوند (۳). پس از ترشح آنتی‌ژن‌های پروتئینی، این پپتیدها بر روی مولکول‌های MHC II قرار گرفته (۴)، کمپلکس آنتی‌ژن- MHC را تشکیل داده و این کمپلکس به غدد لنفاوی مهاجرت می‌کند (۵)، یعنی جایی که این مجموعه به سلول‌های T طبیعی از طریق T cell receptor TCR عرضه می‌شوند و آغاز پاسخ‌های سلولی را به همراه دارند (۶). در پاسخ به کمپلکس پپتید- MHC و آغاز سیگنال‌های ثانویه پاسخ ایمنی، سلول‌های CD4 فعال شده و ترشح سایتوکاین صورت می‌گیرد (۷). بنابراین پس از فعال‌سازی ایمنی سلولی، مسیر ایمنی همورال و تولید آنتی‌بادی نیز فعال می‌شود (۸). از این رو به دنبال یک واکسیناسیون دی.ان.ا دفاع قدرتمندی بر علیه عوامل بیماری‌زای عفونی ایجاد می‌شود (۴۳).

"نادری و همکاران، القای ایمنی فعال به کمک واکسیناسیون ژنتیکی"

جدول ۲- مقایسه القای پاسخ‌های آنتی‌بادی توسط عفونت‌های طبیعی و ویروسی، ایمنی‌زایی با پروتئین‌های نو ترکیب و دی.ان.ا (۴۱)

واکسن دی.ان.ا	پروتئین نو ترکیب	عفونت طبیعی
نانوگرم	میکروگرم	(نانوگرم - میکروگرم)
چندین هفته	کمتر از یک هفته	چندین هفته
افزایش آهسته	افزایش سریع	افزایش سریع
تعداد تزریقات به منظور افزایش یک	دو	یک
میزان IgG و مهاجرت ASC به مغز استخوان		

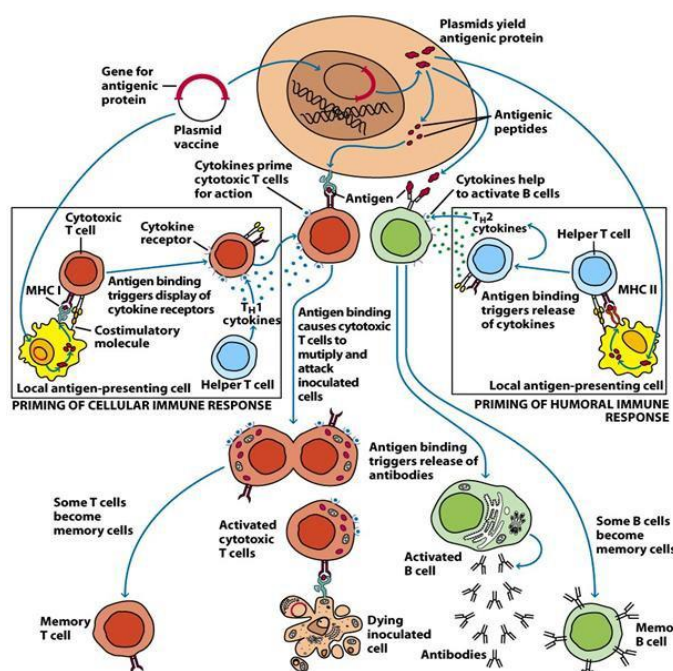
ایمنی سلولی

واکسیناسیون دی.ان.ا روشی برای ایجاد انواع پاسخ‌های ایمنی، پاسخ‌های Th و پاسخ‌های آنتی‌بادی (۶،۳) و پاسخ CTL است که در مسیر MHC کلاس یک و با کمک مولکول‌های محرک ایمنی مانند CRT یا کالورتیکولین که افزایش دهنده‌ی پردازش آنتی‌ژن‌ها است، صورت می‌گیرد (۳۴) و به لحاظ ایجاد پاسخ‌های سلولی حائز اهمیت است (۱۸). این روش ایمنی‌زایی قادر به بالا بردن طیف وسیعی از پاسخ‌های Th از جمله پرولیفراسیون لنفوسیتی و تولید مجموعه‌ی سایتوکاین‌ها است. مزیت عمده‌ی این روش تحریک انواع پاسخ‌های سلول Th₁ و Th₂ است (۱۷). پاسخ‌های این دسته از سلول‌ها بواسطه روش ورود دی.ان.ا و بیان ایمونوژن (۵۰،۱) و نوع سلول عرضه‌کننده آنتی‌ژن تحت تاثیر قرار می‌گیرد (۳۰). عموماً تزریق سوزنی (IM یا ID)، القای پاسخ Th₁ را به دنبال دارد، در حالی‌که تزریق با تفنگ ژنی افزایش دهنده‌ی پاسخ‌های Th₂ است (۱۷،۵۰،۳۰) که این امر مربوط به آنتی‌ژن‌های متصل به غشای داخل سلولی و پلاسما است که برای فعال‌سازی پاسخ‌های Th₂ ضروری است (۵۴). زمانی که دی.ان.ا پلاسمیدی رمز کننده پروتئین‌های آنتی‌ژنی مستقیماً به داخل عضله میزبان تزریق می‌شوند،

سلول‌های عضلانی می‌توانند با ورود دی.ان.ا و بیان آنتی‌ژن هر دو نوع پاسخ ایمنی همورال و سلولی را ارائه دهند (شکل ۳). اما این آنتی‌ژن‌ها نه تنها توسط سلول عضلانی دریافت کننده، بلکه توسط سلول‌های دندریتیک حاضر در محل تزریق نیز بیان می‌شوند. از این رو تصور می‌شود سلول‌های دندریتیک نقش مهمی را در بروز پاسخ‌های ایمنی به واکسن‌های دی.ان.ا بازی می‌کنند. سلول‌های دندریتیک، قادرند اینترلوکین-۱۲ را ترشح کنند که منجر به توسعه و پیشرفت پاسخ‌ها به سمت Th₁ می‌شود و چنانچه اینترلوکین-۴ ترشح کنند، القاء پاسخ Th₂ را در پی دارد (۴). به طور کلی پاسخ‌های این دسته از سلول‌ها در طول زمان پایدار بوده و پس از تزریقات متوالی در حیوانات تغییر نمی‌کند (۱۷،۵۰). بعلاوه عفونت‌های ویروسی و ایمنی‌زایی دی.ان.ا، بیان درون‌سلولی آنتی‌ژن‌ها را القا می‌کند که می‌توانند بر روی مولکول‌های MHC I عرضه شوند (۷۵). به این گونه، لنفوسیت‌های TCD₈⁺/TCR فعال می‌شوند تا سلول آلوده شده را لیز کنند (۱۵). یکی از بزرگترین مزیت‌های واکسن‌های دی.ان.ا این است که آن‌ها قادر به القای لنفوسیت‌های T با عملکرد سمیت سلولی (CTL) هستند، بدون اینکه خطر واکسن‌های زنده را داشته باشند. القای پاسخ‌های

ایمنی سلولی، استفاده از آن‌ها برای مقابله با عفونت‌های ویروسی که از جمله عفونت‌های درون سلولی هستند مانند آنفلوانزا، مالاریا، ایدز، سرطان و هاری مناسب‌تر است (۴۴، ۲۸). از جمله در زمینه‌ی بیماری‌های مختلف ویروسی مانند CMV, HPV, HBV, HCV, HIV, و ویروس هرپس سیمپلکس، لنفومای سلول T، و بیماری‌های باکتریایی مانند توپرکلوزیس و بیماری‌های انگلی مانند، شistosوما، لیشمانیوز نیز می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند و به این ترتیب در زمینه‌ی درمان‌های احتمالی برای بیماری‌های عفونی و سرطان موثرند (۳۴، ۲۸). این دسته از پاسخ‌ها بواسطه تلقیح مولکول‌های محرکی نظیر B7-1 و B7-2 در واکسن‌های دی.ان.ا بر علیه نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا (۲۰، ۲۹) و یا GM-CSF در دی.ان.ا واکسن مالاریا (۲۰، ۲۹) افزایش پیدا می‌کنند (۶۵).

CTL بر علیه اپی‌توپ‌های ایمنی غالب و مغلوب بدن به تقلید از عفونت طبیعی بوده و افزایش پیدا می‌کند، که این شیوه، ابزار مفیدی در ارزیابی آنتی‌ژن و نقش آن‌ها در ایمنی است (۲۰). سلول‌های T سایتوتوکسیک پپتیدهای کوچک ۸-۱۰ اسیدآمینه‌ای متصل به مولکول‌های MHC کلاس یک را شناسایی می‌کنند. این پپتیدها از پروتئین‌های درون سیتوزولی مشتق شده‌اند که تجزیه شده و به سمت مولکول‌های MHC کلاس یک فرستاده می‌شوند. این فرآورده‌ها به صورت مستقیم به Endoplasmic reticulum (ER) اضافه شده تا پاسخ‌های CTL را افزایش دهند (۵۱). هدف قرار دادن این آنتی‌ژن‌ها در تخریب داخل سلولی و ورود به مسیر MHC کلاس یک، می‌تواند با اضافه کردن توالی‌های سیگنالی یوبی‌کوئیتین و یا توالی‌های سیگنالی دیگر به صورت موثر منجر به افزایش پاسخ‌های CTL شود (۶۱). با توجه به توانایی این واکسن‌ها در تحریک



شکل ۳- افزایش تحریک سیستم ایمنی سلولی و همورال با بهره‌گیری از واکسن دی.ان.ا.

"نادری و همکاران، القای ایمنی فعال به کمک واکسیناسیون ژنتیکی"

جنبه‌های ایمنی استفاده از دی.ان.ا. واکسن‌ها

اگرچه واکسن‌های سنتی مبتنی بر تولید آنتی‌بادی بواسطه تلقیح ویروس‌های زنده ضعیف شده، ذرات ویروسی کشته شده یا پروتئین‌های ویروسی نو ترکیب بوده است، در حال حاضر دی.ان.ا. واکسن‌ها می‌توانند عملکرد کیفی بالاتری را با حفظ ویژگی‌های ایمنی ارائه دهند. در این دسته از واکسن‌ها، پلاسمید غیرزنده بوده و تکثیر نمی‌شود در نتیجه خطر کمی برای بازگشت عفونت و فرم‌های بیماری‌زا یا عفونت‌های ثانویه وجود دارد. به علاوه در این واکسن‌ها ژن‌های متعددی از جمله آنتی‌ژن‌های ویروسی یا باکتریایی، پروتئین‌های ایمنی و زیستی وجود دارد (۴۳). در جدول ۳ بسیاری از مزیت‌های این واکسن‌ها خلاصه شده است.

جدول ۳- مزیت‌های دی.ان.ا. واکسن‌ها (۴۳)

خصوصیات	
طراحی	- سنتز با استفاده از روش‌های PCR و فناوری‌های مهندسی ژنتیک صورت می‌گیرد. - بهینه‌سازی پلاسمید از طریق تغییرات ساختار RNA و کدون
زمان تولید	- تولید و فرمولاسیون سریع - تولید به صورت مجدد و در مقیاس زیاد، جداسازی
ایمنی	- عدم تبدیل به فرم‌های زنده و خطرناک، برخلاف واکسن‌های زنده - در مقایسه با واکسن‌های کشته شده فرآورده‌ها و بازده سمی ندارد. - در نمونه‌های آزمایش شده بدون عوارض جانبی بوده و هزاران واکسیناسیون تاکنون صورت گرفته است.
پایداری	- در مقایسه با واکسن‌های معمولی بیشترین پایداری را در مقابل درجه حرارت دارد. - دارای نیمه عمر بالایی است.
شرایط نگهداری	- انتقال و ذخیره‌سازی به راحتی صورت می‌گیرد. - به منظور نگهداری نیازی به زنجیره سرد نیست.
ایمونیزاسیون	- القای پاسخ‌های همورال و سلولی اختصاصی آنتی‌ژن شبیه به آنچه که توسط عوامل ضعیف‌شده صورت می‌گیرد.

خطرات مرتبط با تلقیح پلاسمید دی.ان.ا. در بسیاری از مدل‌های حیوانی بررسی و مطالعه شده است. پیش‌بینی می‌شود که ممکن است این پلاسمید منجر به تومورزایی، ادغام با کروموزوم میزبان (۴۶)، یا القای پاسخ‌های خودایمنی ضد دی.ان.ا. (۳۲، ۱۵) و مقاومت به آنتی‌بیوتیک و پیشرفت بیماری‌های خودایمنی در میزبان شود (۳۵، ۵۶). چنانچه ادغام کروموزوم میزبان با دی.ان.ا. واکسن صورت بگیرد، فراوانی جهش‌های خودبه‌خودی رخ می‌دهد (۳۷). وکتورهای مورد استفاده در این واکسن‌ها یا ادجوانت‌های کاربردی به منظور افزایش ایمنی‌زایی می‌توانند احتمال ادغام و جهش را افزایش دهند. نگرانی دیگر این است که ممکن است این واکسن‌ها از طریق فعال‌سازی انکوژن‌ها یا ژن‌های مهارکننده تومور، منجر به جهش‌زایی درونی شوند. به علاوه پلاسمید دی.ان.ا. واکسن ادغام شده می‌تواند منجر به القای شکست‌ها یا

بازآرایی کروموزومی شود (۴۳). مسئله بعدی در مورد واکسن‌های دی.ان.ا مقاومت آنتی‌بیوتیکی است به خصوص مقاومت به کانامایسین که معمولاً برای درمان عفونت‌های انسانی مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. مجموعه‌ای از این مشکلات در جدول زیر خلاصه و توضیح داده شده است (۴۳، ۲۱، ۳۹).

جدول ۴- مشکلات مرتبط با دی.ان.ا واکسن (۴۳)

مسائل نظری	مشکلات	راه‌حل
ادغام کروموزومی	واکسن دی.ان.ا با دی.ان.ا قرار داده شده در پلاسמיד ادغام می‌شود و این امر منجر به موتاسیون، بی‌ثباتی کروموزومی، فعالسازی و یا غیر فعال شدن ژن‌های سرکویگر تومور می‌شود.	سازمان غذا و دارو در زمینه ادغام کروموزومی در این دسته از واکسن‌ها نیاز به استفاده از روش‌های مورد قبول در حیوانات و نمونه‌های انسانی دارد.
خودایمنی	- توسعه اختلالات خودایمنی بر علیه دی.ان.ا بیمار - توسعه اتوآنتی‌بادی‌ها بر علیه ادجوانت‌های ایمنی	- مطالعات انجام شده در این زمینه هیچ آنتی‌بادی ضد دی.ان.ا را در بیمار تشخیص نمی‌دهد. - بیماران از نظر علائم خودایمنی با استفاده از نشانگرها بررسی و آزمایش می‌شوند.
مقاومت آنتی‌بیوتیکی	- فرآیند تولید شامل انتخاب سلول‌های باکتریایی با استفاده از مقاومت آنتی‌بیوتیکی است که توسط ژن پلاسمیدی القا می‌شود. - خطر مقاومت آنتی‌بیوتیکی به بیماران از طریق دریافت واکسن از طریق انتقال غیرعمدی باکتری‌ها صورت می‌گیرد.	- مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پلاسמיד توسط منشا باکتریایی صورت می‌گیرد. - آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده معمولاً عواملی هستند که به صورت مداوم در درمان عفونت‌های انسانی استفاده نمی‌شوند.
قدرت ایمونیزاسیون پایین	اولین پلاسמידهای دی.ان.ا ایجاد شده سطوح پایینی از پاسخ‌های سلول‌های T و B را به دنبال دارد.	استفاده از فرمولاسیون‌های جدید، ادجوانت‌های ایمنی و سیستم‌های ورودی پاسخ‌های ایمنی را افزایش می‌دهند. روش‌های Prime-boost معمولاً در مطالعات بالینی استفاده می‌شود.

نتایج و بحث

سیستم‌های واکسیناسیون، از جمله واکسن‌های دی.ان.ا، از زمان کشف تا به امروز به انواع مختلفی تقسیم شده‌اند. این واکسن‌ها که جزء واکسن‌های نسل سوم هستند، بعد از واکسن‌های نوترکیب طراحی شدند و برای نخستین بار در سال ۱۹۹۲، در ساختارشان به جای پروتئین ویروسی از ژنوم ویروس استفاده شد (۵۳). در حقیقت این واکسن‌ها که نسل جدیدی محسوب می‌شوند، به عنوان واکسن‌هایی کارآمد و ایمن برای انسان و حیوانات مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و تلاش‌های بسیاری برای افزایش کاربری آن‌ها در حال انجام است. در این واکسن‌ها برای ایمنی‌زایی، ژن‌های خاصی وارد بدن شده و به این ترتیب، ایمنی‌زایی با کمک دی.ان.ا انجام می‌پذیرد. این واکسن‌ها دارای یک آنتی‌ژن یا ایمونوژن هستند که پس از ورود به سلول و ارائه آن به بدن میزبان، مبادرت به تولید پاسخ‌های ایمنی می‌شوند.

"نادری و همکاران، القای ایمنی فعال به کمک واکسیناسیون ژنتیکی"

همورال و سلولی می‌کند (۲۸). از جمله ویروس‌هایی که این واکسن‌ها می‌تواند بر علیه بیماری آن موثر باشد، هپاتیت است که تلاش برای ساخت واکسن بر علیه آن، در حال پیشرفت است (۴۷). در انواع جدیدی از واکسن‌های دی.ان.ا با اتصال توالی نوکلئوتیدی آنتی ژن مورد نظر به توالی دی.ان.ا بیان کننده برخی از پروتئین‌های ساختمانی ویروسی، که قابلیت تشکیل ساختارهای تکراری و ایجاد ذرات شبهه ویروسی (VLP) را دارند، آنتی ژن در داخل سلول به صورت ذره‌ای بیان می‌شود و مزیت این روش که plasmid-VLP نامیده شده است، بهره‌گیری از سهولت ساخت دی.ان.ا پلاسمیدی و ایمنی زائی بیشتر ذرات VLP است. واکسن‌های دی.ان.ا علیرغم توانایی تحریک سلول‌های $CD8^+$ T برخلاف ناقلین ویروسی به دلیل فقدان قابلیت تکثیر و میزان بیان محدود پروتئین موفقیت کمتری را کسب کرده‌اند. از این رو امروزه، استفاده از توالی‌های سازنده VLP به صورت فیوژن با آنتی ژن‌ها و اعمال رژیم‌های مختلف واکسیناسیون توانسته استراتژی‌های با ارزشی در راستای افزایش ایمنی زائی واکسن‌های دی.ان.ا ارائه دهد. مهم‌ترین مسئله در واکسیناسیون دی.ان.ا ایمنی زیستی آن است و یکی از نگرانی‌های اصلی واکسیناسیون ژنتیکی احتمال ادغام آن با ژنوم میزبان است. چنانچه این ادغام صورت بگیرد و یا این که این ژن‌ها در قسمت ژن‌های

میزبانی مانند مقاومت به آنتی‌بیوتیک وارد شوند، بیان ژن میزبانی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. یک راه محدود کردن این خطرات توسعه و استفاده از پلاسمیدها و یا مولکول‌های دی.ان.ا است که فاقد ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک و یا عناصر پروکاریوتی مورد نیاز در تکثیر باکتری‌ها هستند. این دسته از وکتورها در حال حاضر طراحی شده و به منظور کاربرد و آزمایش در چند مدل حیوانی در حال مطالعه و بررسی هستند (۱۹). اما هنوز درک چگونگی فرآیند ادغام ژنومی بسیار جای تحقیق دارد. برای مثال این رویداد ممکن است در حضور توالی اسید نوکلئیکی خاص و یا در غلظتی از پلاسمیدها در یک بافت خاص و یا در نزدیکی ژنوم میزبانی رخ دهد. درک این دسته از رویدادها می‌تواند در توسعه استراتژی‌های مربوط به محدود کردن این وقایع موثر و مفید باشد (۶۴). در هر حال جنبه‌های عملی واکسن‌های دی.ان.ا امیدوار کننده است و در مطالعات آینده واکسن‌های دی.ان.ا مخلوطی از ژن‌های پروتئین‌های آنتی ژنی و ژن‌های سایتوکاین‌ها یا کموکاین‌ها خواهند بود تا موجب جهت‌گیری‌های مناسب‌تر سیستم گردند. واکسن‌های دی.ان.ا امروزه در مرحله آزمایشات بالینی هستند و به احتمال زیاد در سال‌های آتی به منظور ایمن‌سازی انسان نیز به کار گرفته خواهند شد.

References

- 1- **Alarcon JB, Waine GW, McManus DP. 1999.** DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents. *Advances in Parasitology* 42: 343–410.
- 2- **Myhr AI, Dalmo RA. 2007.** DNA vaccines: Mechanisms and aspects of relevance for biosafety. Traavik T, Lim L.C. (eds.), Tapir Academic Publishers.
- 3- **Arichi T, Saito T, Major ME, Belyakov LM, Shirai M, Engelhard VH, Feinstone SM, Berzofsky JA. 2000.** Prophylactic DNA vaccine for hepatitis C virus (HCV) infection: HCV-specific cytotoxic T lymphocyte induction and protection from HCV-recombinant vaccinia infection in an HLA-A2.1 transgenic mouse model. *PNAS*. 97: 297–302.
- 4- **Banchereau J, Steinman RM. 1998.** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392 (6673): 245–252 .
- 5- **Bird AP. 1986.** CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209-213.
- 6- **Chen W. 2008.** Investigation of functionalized carbon nanotubes as a delivery system for enhanced gene expression with implications in developing DNA vaccines for hepatitis C virus. Thesis. The University of Central Florida College of Graduate, USA.
- 7- **Cheung YK, Cheng SC, Sin FW, Xie Y. 2004.** Plasmid encoding papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA constructed with codon optimization improved the immunogenicity against HPV infection. *Vaccine* 23, 629–638.
- 8- **Cornelia Trimble, Cheng-Tao Lin, Chien-Fu Hung, Sara Pai, Jeremy Juang, Liangmei He, Maura Gillison, Drew Pardoll, Lee Wu, T-C Wu. 2003.** Comparison of the CD8+ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe. *Vaccine* 21:4036–4042.
- 9- **Cox GJM, Zamb TJ, Babiuk LA. 1993.** Bovine herpesvirus 1: immune response in mice and cattle injected with plasmid DNA. *Journal of Virology* 67:5664–7.
- 10- **Devon J, Shedlock, David B. 2000.** Weiner DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 68: 793-806.
- 11- **Dijkstra JM, Okamoto H, Ototake M, Nakanishi T. 2001.** Luciferase expression 2 years after DNA injection in glass catfish (*Kryptopterus bicirrhus*), Fish and Shellfish. *Immunology* 11: 199-202.
- 12- **Donnelly J, Berry K, Ulmer JB. 2003.** Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *International Journal for Parasitology* 33:457–467.
- 13- **Donnelly JJ, Martinez D, Jansen KU, Ellis RW, Montgomery DK, Liu MA. 1996.** Protection against papillomavirus with a polynucleotide vaccine. *The Journal of Infectious Diseases* 713:314–320.
- 14- **Donnelly JJ, Ulmer JB. 1999.** DNA vaccines for viral diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 215-222.
- 15- **Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. 1997.** DNA vaccines. *Annual Review of Immunology* 15: 617–648.
- 16- **Doolan DL, Sedegah M, Hedstrom RC, Hobart P, Charoenvit Y, Hoffman SL. 1996.** Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD81 T cell-, interferon gamma-, and nitric oxide-dependent immunity. *Journal of Experimental Medicine* 183:1739–1746.

- 17- Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. 1997. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *The Journal of Immunology* 158 (5): 2278–2284.
- 18- Fioretti D, Iurescia S, Fazio V and Rinaldi M. 2010. DNA Vaccines: Developing New Strategies against Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* .2010: 16.
- 19- Faurez F, Dory D, Moigne VL, Gravier R, Jestin A. 2010. Biosafety of DNA vaccines: new generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine* 28: 3888–3895.
- 20- Fu TM, Friedman A, Ulmer JB, Liu MA, Donnelly JJ. 1997. Protective cellular immunity: cytotoxic T-lymphocyte responses against dominant and recessive epitopes of influenza virus nucleoprotein induced by DNA immunization. *Journal of Virology*. 71 (4): 2715–21.
- 21- Garmory HS, Leckenby MW, Griffin KF, Elvin SJ, Taylor RR, Hartley MG, Hanak JA, Williamson ED, Cranenburgh RM. 2005. Antibiotic-free plasmid stabilization by operator-repressor titration for vaccine delivery by using live *Salmonella enterica*, *Serovar typhimurium*. *Infection and Immunity* 73, 2005–2011.
- 22- Garmory HS, Perkins SD, Phillpotts RJ, Titball RW. 2005. DNA vaccines for biodefence. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57:1343–1361.
- 23- Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 20: 621–667.
- 24- Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Review of Immunology* 18: 927–974.
- 25- Hashida M, Mahoto RI, Kawabata K, Miyao T, Nishikawa M, Takakura Y. 1996. Pharmacokinetics and targeted delivery of proteins and genes. *Journal of Controlled Release* 41: 91–97.
- 26- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740–745.
- 27- Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, Deck RR, DeWitt CM, Orme IM, Baldwin S, D'Souza C, Drowart A, Lozes E, Vandenbussche P, Van Vooren JP, Liu MA, Ulmer JB. 1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature Medicine* 2:893–898.
- 28- Ivory C, Chadee K. 2004. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genetic Vaccines and Therapy*. 2:17.
- 29- Iwasaki A, Stiernholm BJ, Chan AK, Berinstein NL, Barber BH. 1997. Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines. *The Journal of Immunology* 158 (10): 4591–4601.
- 30- Jakob T, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. 1998. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA 1. *Journal of Immunology* 161 (6): 3042–3049.
- 31- Justewicz DM, Webster RG. 1996. Long-term maintenance of B cell immunity to influenza virus hemagglutinin in mice following DNA -based immunization. *Virology* 224 (1): 10–17.
- 32- Katsumi T, Nobuhiko E, Abe A, Hasegawa Y, Ito M, Sato H. 2008. Humoral and cellular immunity to an encoded protein induced by direct DNA injection. *Human Gene Therapy* 5: 1335–1339.
- 33- Kibenge FSB, Kibenge MJT, McKenna PK, Stothard P, Marshall R, Cusack RR, McGeachy S. 2001. Antigenic variation among isolates of infectious salmon anaemia virus correlates with genetic variation of the viral haemagglutinin gene. *Journal of General Virology* 82: 2869–2879.
- 34- Kols A, Sherris J. "HPV Vaccines: Promise and Challenges" PATH, July 2000, available at www.path.org, downloaded March 30, 2004.

- 35- **Kurth R. 1995.** Risk potential of the chromosomal insertion of foreign DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 772: 140–151.
- 36- **Kwang J. 2000.** Fishing for vaccines. *Nature Biotechnology* 18:1145–46.
- 37- **Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG 2nd, Harper LB, Schock HB, Zhang H, Faris JE, Way PA, Beare CM, Bagdon WJ, Nichols WW. 2000.** Plasmid DNA vaccines: assay for integration into host genomic DNA. *Developments in biologicals (Basel)* 104: 33–43.
- 38- **Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, LaPatra SE. 2002.** DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout. *Fish and Shellfish Immunology* 12: 439–453.
- 39- **Mairhofer J, Pfaffenzeller I, Merz D, Grabherr R. 2007.** A novel antibiotic free plasmid selection system: advances in safe and efficient DNA therapy. *Biotechnology Journal* 3: 83–89.
- 40- **Naderi M, Gholipour N, Zolfaghari MR, Moradi Binaba, M, Yegane Moghadam, A, Motalleb. GR. 2014.** Hepatitis C virus and vaccine development. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 3(4): 1-9.
- 41- **Mancini-Bourguine M, Fontaine H, Bréchet C, Pol S, Michel ML. 2006.** Immunogenicity of a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Vaccine* 24(21):4482-9.
- 42- **Manickan E, Rouse RJD, Yu Z, Wire WS, Rouse BT. 1995.** Genetic immunization against herpes simplex virus. *Journal of Immunology* 155:259–265.
- 43- **Kutzler MA, Weiner DB. 2008.** DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics* 9(10):776-88.
- 44- **Moradpour D, Cerny A, Heim MH, Blum HE. 2001.** Hepatitis C: an update. *Swiss Medical Weekly* 131 :291–298.
- 45- **Naderi M, Saeedi A, Moradi A, Kleshadi M, Zolfaghari M. R, Gorji A, Ghaemi A. 2013.** Interleukin-12 as a genetic adjuvant enhances hepatitis C virus NS3 DNA vaccine immunogenicity. *Virologica Sinica*. 28(3):167-73.
- 46- **Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ. 1995.** Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 772, 30–39.
- 47- **Perrine M, Inchauspe GV. Hepatitis C vaccines. 2006.** *Drug discovery today: therapeutic strategies*. 3(2):203-209.
- 48- **Phillpotts RJ, Venugopal K, Brooks T. 1996.** Immunisation with DNA polynucleotides protects mice against lethal challenge with St. Louis encephalitis virus. *Archives of Virology* 141:743–749.
- 49- **Ramakrishna L, Anand KK, Mohankumar KM, Ranga U. 2004.** Codon optimization of the tat antigen of human immunodeficiency virus type 1 generates strong immune responses in mice following genetic immunization. *Journal of Virology* 78: 9174–9189.
- 50- **References S, Boyle C, Morin M, Webster R, Robinson H. 1996.** Role of different lymphoid tissues in the initiation and maintenance of DNA -raised antibody responses to the influenza virus H1 glycoprotein. *Journal of Virology* 70 (12): 9074–8.
- 51- **Restifo NP, Bacík I, Irvine KR, Yewdell JW, McCabe BJ, Anderson RW, Eisenlohr LC, Rosenberg SA, Binnink JR. 1995.** Antigen processing in vivo and the elicitation of primary CTL responses. *Journal of Immunology* 154 (9): 4414-22.
- 52- **Robinson HL, Hunt LA, Webster RG. 1993.** Protection against alethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutininexpressing plasmid DNA. *Vaccine* 11:957–960.

- 53- **Rosenberg SA, Zhai Y, Yang JC. 1998.** Immunization patients with metastatic melanoma using recombinant adenovirus encoding MART-1 or gp 100 melanoma antigens. *Journal of the National Cancer Institut.* 90(24): 1894-1900.
- 54- **Sallberg M, Townsend K, Chen M. 1997.** Others. "Characterization of humoral and CD₄⁺ cellular responses after genetic immunization with retroviral vectors expressing different forms of the hepatitis B virus core and e antigens. *Journal of Virology* 71 (7): 5295-303.
- 55- **Sedegah M, Hedstrom R, Hobart P, Hoffman SL. 1994.** Protection against malaria by immunization with circumsporozoite protein plasmid DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91:9866-9870.
- 56- **Sheets RL, Stein J, Manetz TS, Duffy C, Nason M, Andrews C, Kong WP, Nabel GJ, Gomez PL. 2006.** Biodistribution of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar, without integration, despite differing plasmid backbones or gene inserts. *Toxicological Sciences* 91, 610-619.
- 57- **Smith JM, Amara RR, Campbell D, Xu Y, Patel M, Sharma S, Butera ST, Ellenberger DL, Yi H, Chennareddi L, Herndon JG, Wyatt LS, Montefiori D, Moss B, McClure HM, Robinson HL. 2004.** DNA/MVA vaccine for HIV type 1: effects of codon-optimization and the expression of aggregates or virus-like particles on the immunogenicity of the DNA prime. *AIDS Research and Human Retroviruses* 20: 1335-1347.
- 58- **Andre S, Seed B, Eberle J, Schraut W, Bultmann A, Haas J. 1998.** Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *Journal of Virology.* 72(2): 1497-1503.
- 59- **Tang D, DeVit M, Johnson SA. 1992.** Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152-154.
- 60- **Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. 1996.** Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nature Medicine* 2:888-892.
- 61- **Tobery TW, Siliciano RF. 1997.** Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de Novo CTL responses in vivo after immunization. *Journal of Experimental Medicine* 185 (5): 909-920.
- 62- **Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A. 1993.** Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259:1745-9.
- 63- **Verri T, Ingrosso L, Chiloiro R, Danieli A, Zonno V, Alifano P, Romano N, Scapigliati G, Vilella S, Stornelli C. 2003.** Assessment of DNA vaccine potential for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by intramuscular injection of a reporter gene, *Fish and Shellfish Immunology* 15: 283-295.
- 64- **Wang Z, Troilo PJ, Wang X, Griffiths TG, Pacchione SJ, Barnum AB, Harper LB, Pauley CJ, Niu Z, Denisova L, Follmer TT, Rizzuto G, Ciliberto G, Fattori E, Monica NL, Manam S, Ledwith BJ. 2004.** Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Therapy* 11:711-21.
- 65- **Weiss WR, Ishii KJ, Hedstrom RC, Sedegah M, Ichino M, Barnhart K, Klinman DM, Hoffman SL. 1998.** A plasmid encoding murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases protection conferred by a malaria DNA vaccine 1. *Journal of Immunology* 161 (5): 2325-2332.
- 66- **Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. 1990.** Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247:1465-8.
- 67- **Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner W, Cheng J, Ertl HCJ. 1994.** Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 199: 132-140.

- 68- **Xu D, Liew FY. 1995.** Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology* 84:173–176.
- 69- **Yan J, Yoon H, Kumar S, Ramanathan MP, Corbitt N, Kutzler M, Dai A, Boyer JD, Weiner DB. 2007.** Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Molecular Therapy* 15: 411–421.

Active immune induction by genetic vaccination

Malihe Naderi¹, Naghmeh Gholipour^{2,3}, Sakine Mashjoor^{*1}

1. Department of Microbiology, Qom branch, Islamic Azad University, Qom, Qom, Iran
2. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
3. Sana high education non governmental non prophetic institute, Sari, Iran.
4. Department of Marine Biology, Hormozgan University, Hormozgan, Iran.

sakynemashjoor@gmail.com

Abstract

DNA vaccination, or genetic immunization, is a novel vaccine technology that has great potential for reducing infectious disease and cancer-induced morbidity and mortality worldwide. This method has been used to stimulate protective immunity against many infectious pathogens, malignancies, and autoimmune disorders in animal models and extensively to develop vaccine safe, innovative and efficient in human and animals has been studied. DNA plasmids encoding foreign proteins may be used as immunogens by direct intramuscular injection alone, or with various adjuvants. The antibody, helper T lymphocyte, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses have been induced in a laboratory and domesticated animals by these methods. In the inactive immunization method, the goal is only temporary protection and relief of the condition, but in active immunization, achieving a constant, long-term safety is the final goal. DNA vaccines are one of the novel candidates of genetic engineering in immunization fields. This article is aimed to introduce DNA vaccine and induced an immune response by it to achieve sustainable protection and further development of this technology at national research levels.

Key words: DNA vaccination, Immune, Genetic immunization, Antibody.