متن الکترونیک E-book

کتاب

مقدمه ای بر
واکسن های ژنی

DNA Vaccine
(Genetic Immunization)

تالیف:

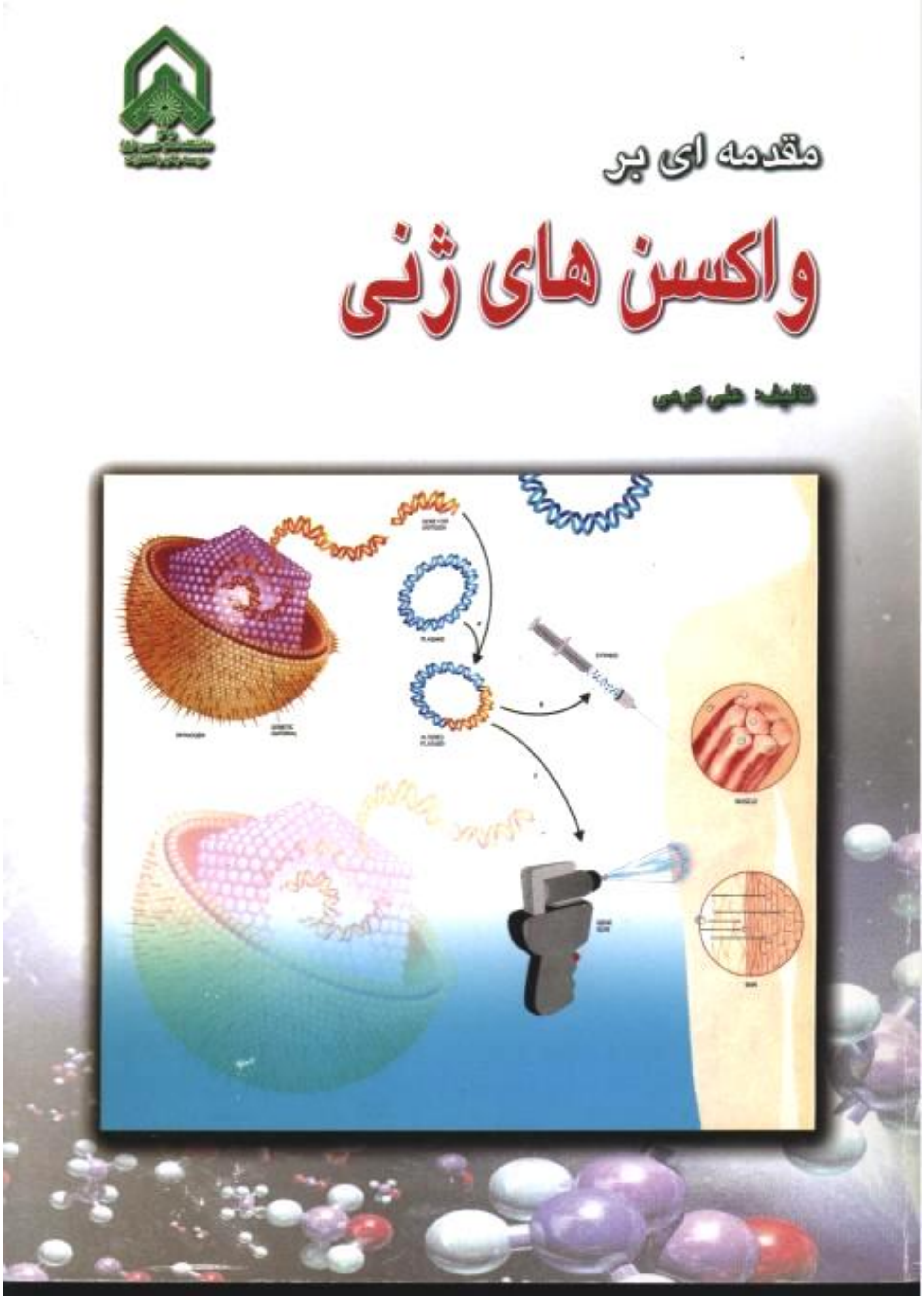
دکتر علی کرمی
دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی
دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)

جهت اطلاعات بیشتر در باره روشها و کاربردهای این فناوری با مولف از طریق
karami@bmsu.Ac.IR تماس حاصل فرمایید

(با توجه به حفظ حقوق مولف و ناشر هر نوع تکثیر و یا انتشار این کتاب بدون کس مجوز از مولف و ناشر غیر قانونی است این نسخه صرفا جهت استفاده محققین و دانشجویان علاقمند به عرصه تحقیقات واکسن های ژنی تقدیم می گردد)

جهت تهیه اصل کتاب با دفتر ناشر تماس حاصل فومایید.

شکل روی جلد کتاب

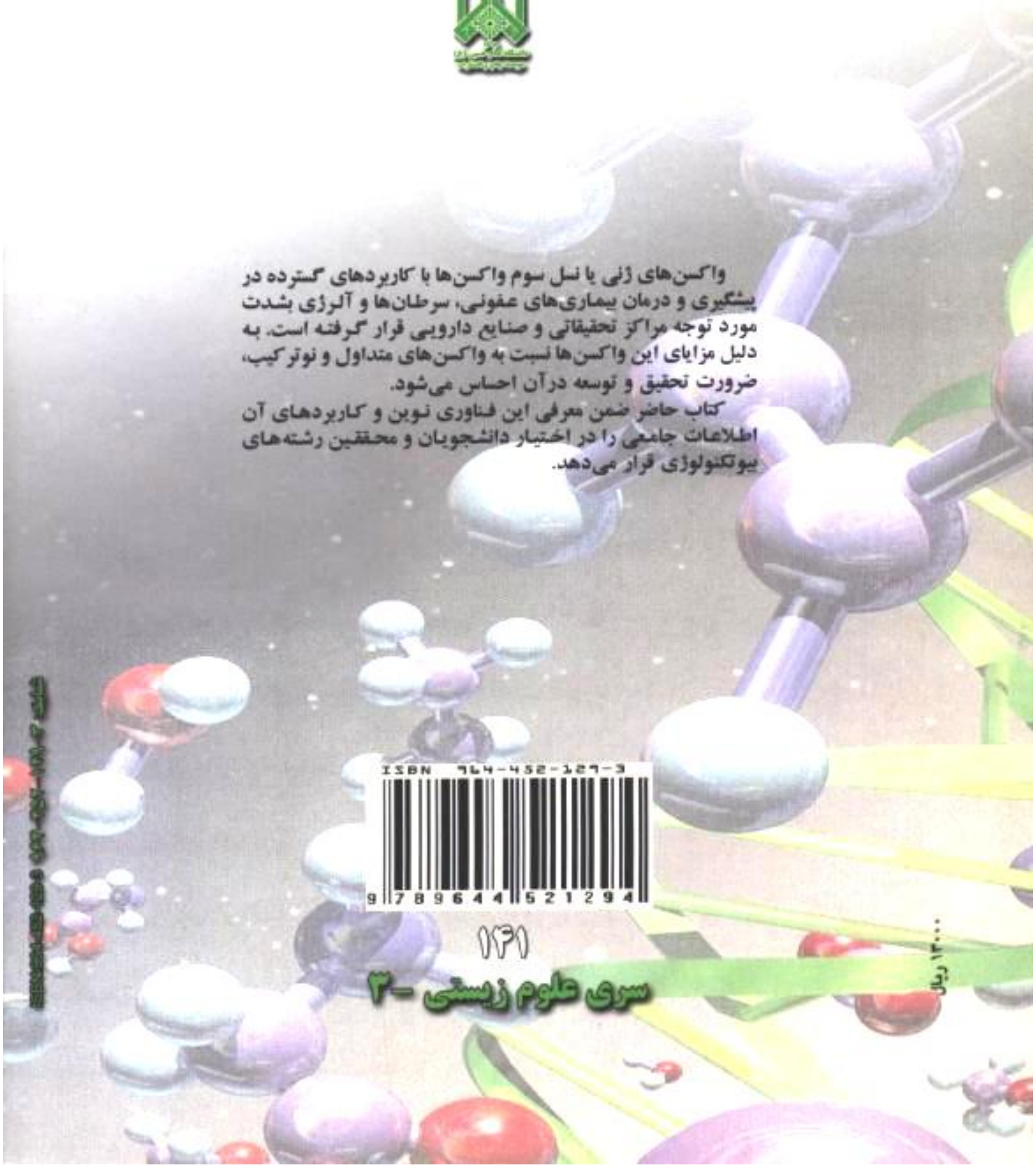


مقدمه ای بر

واکسن های ژنی

تالیف: علی کرمی

شکل پشت جلد کتاب



واکسن‌های ژنی یا نسل سوم واکسن‌ها با کاربردهای گسترده در پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی، سرطان‌ها و آلرژی بشدت مورد توجه مراکز تحقیقاتی و صنایع دارویی قرار گرفته است. به دلیل مزایای این واکسن‌ها نسبت به واکسن‌های متداول و نوترکیب، ضرورت تحقیق و توسعه درآن احساس می‌شود.

کتاب حاضر ضمن معرفی این فناوری نوین و کاربردهای آن اطلاعات جامعی را در اختیار دانشجویان و محققین رشته‌های بیوتکنولوژی قرار می‌دهد.

ISBN 964-452-129-3
9789644521294

۱۴۱

سری علوم زیستی -۳

۱۲۰۰۰ ریال

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه .... سیزده

پیشگفتار .... هفده

فصل ١: تاریخچهٔ واکسنها ١

١-١- تاریخچه ایمن‌سازی (واکسنها) ١

١-٢- انواع واکسنها ٤

١-٢-١- واکسنهای نسل اول ٤

١-٢-١-١- واکسنهای کشته ٤

١-٢-١-٢- واکسن ضعیف شده ٤

١-٢-١-٣- استفاده از محصولات میکروبی مانند نازهر و پلی ساکاریدهای میکروبی ٥

١-٢-٢- واکسنهای نسل دوم (واکسنهای نوترکیب) ٦

١-٢-٢-١- واکسنهای نوترکیب وکتوری ٧

١-٢-٢-٢- واکسنهای آنتی‌ایدیوتیپ ٧

١-٣- روش تهیه واکسنهای نوترکیب ٨

١-٤- مزایای واکسنهای نوترکیب پروتئینی به واکسنهای متداول ٩

١-٥- مشکلات واکسنهای نوترکیب پروتئینی ٩

فصل ۲: واکسنهای ژنی ۱۳
۲-۱- واکسنهای نسل سوم یا واکسنهای ژنی ۱۳
۲-۱-۱- تاریخچه واکسنهای ژنی ۱۴
۲-۱-۲- عوامل اساسی اهمیت واکسنهای ژنی ۱۵
۲-۱-۳- ساختار پلاسمید واکسن ژنی ۱۵
۲-۱-۳-۱- پیش‌برنده (پروموتر) ۱۶
۲-۱-۳-۲- اینترون ۱۶
۲-۱-۳-۳- بخشهای پلی‌آدنیله ۱۷
۲-۱-۳-٤- ژن رمزکننده آنتی‌ژن مورد نظر ۱۷
۲-۱-۳-٥- سایر ساختارها ۱۸
۲-۱-٤- چگونگی عمل واکسنهای ژنی ۲۰
۲-۱-٥- واکسن ژنی هپاتیت B ۲۳
۲-۱-٦- نحوه تولید واکسن ژنی ۲٦
۲-۱-۷- واکسنهای ژنی انسانی در حال بررسی ۲٦
۲-۱-۷-۱- واکسنهای ژنی ضد عوامل عفونی ویروسی ۲٦
۲-۱-۷-۲- واکسنهای ژنی ضد عوامل عفونی باکتریال ۲۸
۲-۱-۷-۳- واکسنهای ژنی ضد عوامل عفونی قارچی ۲۸
۲-۱-۷-٤- واکسنهای ژنی ضد عوامل عفونی انگلی ۲۸
۲-۱-۷-٥- واکسنهای ژنی دامی در حال بررسی ۳۲
۲-۱-۷-٦- واکسنهای ژنی در مراحل آزمایش کلینیکی ۳۳
۲-۱-۸- روشهای مختلف وارد نمودن واکسن ژنی به درون سلول ۳۷
۲-۱-۸-۱- تفنگ ژنی ۳۹
۲-۱-۹- سایر روشهای تجویز واکسن ژنی ٤۱
۲-۱-۱۰- بافت مناسب جهت تلقیح واکسن ژنی ٤۲
۲-۱-۱۱- عوامل افزاینده پاسخ ایمنی در واکسنهای ژنی ٤٦
۲-۱-۱۱-۱- ساختار CpG ٤۷
۲-۱-۱۱-۲- پلاسمیدهای خطی کوچک ٥۲
۲-۱-۱۲- تواناییها و مزایای واکسنهای ژنی ٥۳
۲-۱-۱۳- مدلهای حیوانی واکسنهای ژنی ٥٥

۲-۱-۱٤- دیگر مزایای واکسنهای ژنی ۵۸

فصل ۳: کاربردهای واکسنهای ژنی ٦۱
۳-۱- کاربردهای دیگر واکسنهای ژنی ٦۱
۳-۲- ژن‌درمانی و ایمنی‌درمانی به کمک واکسنهای ژنی ٦۲
۳-۳- واکسنهای ضد سرطان یا ایمنی‌درمانی سرطان ٦٥
۳-٤- ژن‌درمانی آلرژی به روش ایمن‌سازی با واکسن ژنی ٦۷
۳-٤-۱- تولید پادگن توسط ایمن‌سازی ژنی ٦۸

فصل ٤: کنترل کیفی واکسن ۷۱
٤-۱- کنترل کیفی واکسنهای ژنی ۷۱
٤-۲- ملاحظات و محدودیت واکسنهای ژنی ۷۲
٤-۳- امکان الحاق پلاسمید به ژنوم میزبان ۷۳
٤-٤- امکان تولید پادتن علیه پلاسمید واکسن ژنی ۷٥
٤-٥- ایجاد تولرانس ایمنی به پادگن ۷٦
٤-٦- خودایمنی ۷۷

فصل ٥: فناوری واکسنهای ژنی ۷۹
٥-۱- جنبه‌های عملی بررسی ایمنی‌زایی واکسنهای ژنی ۷۹
٥-۱-۱- انتخاب آنتی‌ژن مناسب برای استفاده در واکسن ژنی ۷۹
٥-۱-۲- انتخاب پلاسمید مناسب برای پیوند ژن مورد نظر ۷۹
٥-۱-۳- سلول مناسب برای تولید واکسن ژنی ۸۰
٥-۱-٤- تهیه مقادیر لازم از پلاسمید واکسن ژنی ۸۰
٥-۲- تولید انبوه پلاسمید واکسن ژنی ۸۱
٥-۳- انتخاب حیوان مناسب برای بررسی ایمنی‌زایی واکسن ژنی ۸۳

تها ۸۹
- فهرست واکسنهای سازمان بهداشت جهانی ۸۹
- ثبت اختراعات (Patent) مرتبط با واکسنهای ژنی به ترتیب سال ثبت ۹۰
- ساختمان پلاسمید حاوی ژن لوسیفراز جهت مطالعه القای ژن در واکسنهای ژنی ۹۳
- مشخصات واکسنهای مختلف موجود علیه عوامل عفونی شایع و نظامی ۹٤

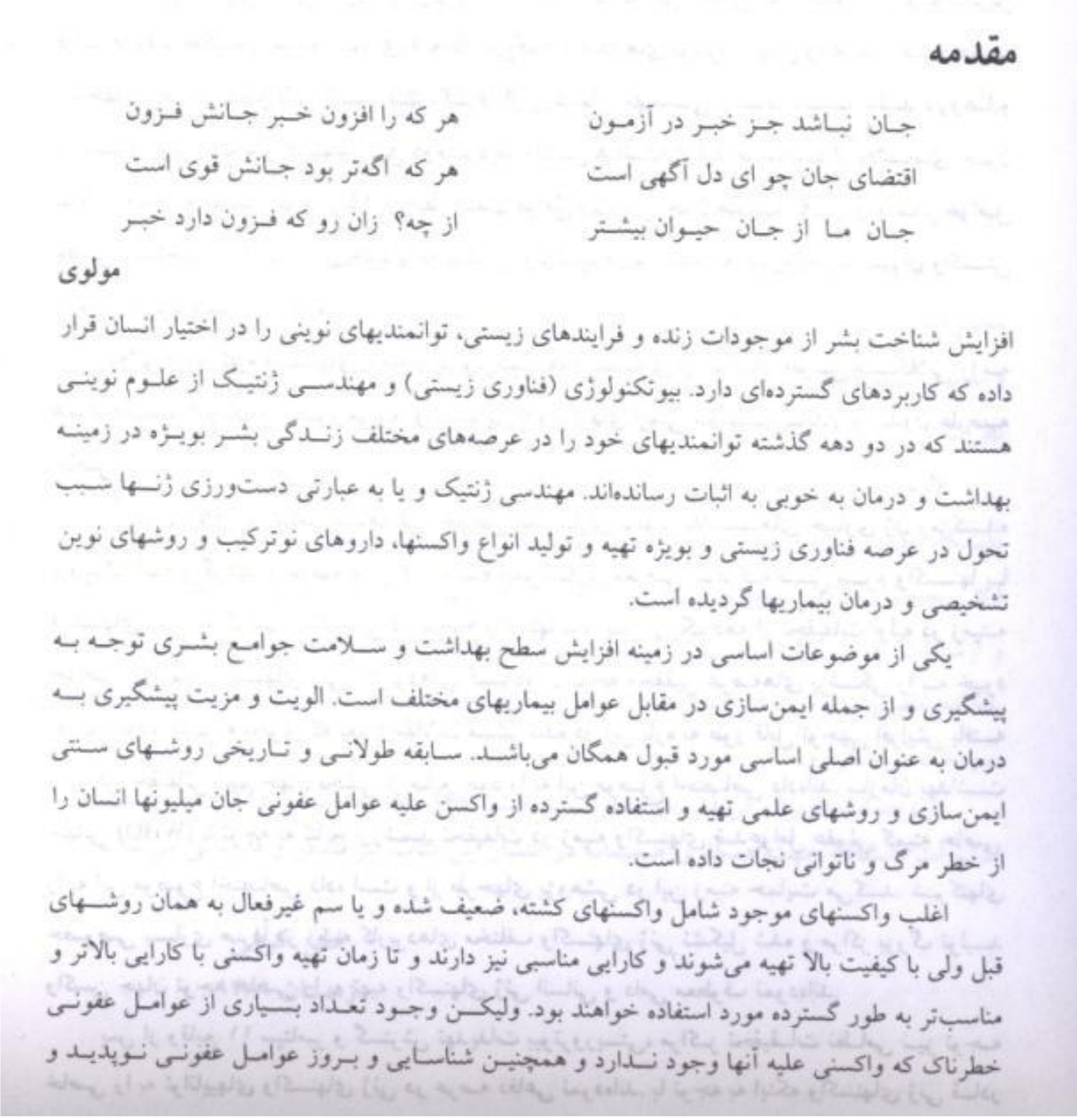
ل

- تاریخچه واکسنهای تهیه شده به روشهای علمی ۳
- واکسنهای جدید و نقش آن در کنترل بیماریهای عفونی ۳
- عوامل عفونی که ضرورت تهیه واکسن علیه آنها وجود دارد..............................٦
- آنتی‌ژنهای بررسی شده برای تهیه نسل دوم واکسنهای ضد لیشمانیا........................۲۹
- نتایج آزمایشهای آنتی‌ژنهای فوق در دو آزمایشگاه ۲۹
ایمنی‌زایی واکسنهای مختلف ژنی بررسی شده در حیوانات ۳۱
واکسنهای ژنی در مراحل آزمایش کلینیکی ۳٦
- میزان ترکیب پلاسمید با لیپوزوم در انواع لیپوزومهای استفاده شده در ۳۸
واکسنهای ژنی
انواع یاورهای مورد استفاده در افزایش ایمنی‌زایی واکسنهای ژنی ٥٦
- مدلهای حیوانی واکسنهای ژنی برای عوامل عفونی ٥۷
- مدلهای حیوانی واکسن ژنی جهت درمان سرطان ٥۸
- مدلهای حیوانی بررسی شده واکسن ژنی در درمان آلرژی ٥۸
- آزمایشهای مورد نیاز برای کنترل کیفی تولید واکسنهای ژنی ۷۲
- روشهای مختلف استخراج پلاسمید و میزان اندوتوکسین و ترانسفکشن آن..............۸٤

شکلها

۱- روش قدیمی تهیه واکسن هپاتیت B موسوم به واکسن پلاسمایی ۸
۲- روش تهیه واکسن نوترکیب هپاتیت B به روش مهندسی ژنتیک ۱۰
۳- ساختار عمومی پلاسمید مورد استفاده در واکسنهای ژنی ۱۹
٤- نمودار روشهای مختلف ارائه پادگن به سیستم ایمنی و روش القاء سیستم..............................۲۱
ایمنی سلولی و خونی توسط واکسنهای ژنی
٥- مراحل مختلف پاسخ ایمنی در نتیجه تجویز داخل عضلانی واکسن ژنی..............................۲۲
٦- ساختمان دستگاه تفنگ ژنی ۳۹
۷- دستگاه بیوجکتور ٤۰
۸- روشهای مختلف تجویز واکسن ژنی..............................٤۱
۹- وسیله‌ای جهت تجویز واکسن از طریق بینی ٤۲
۱۰- وظایف سلولهای دندریتیک..............................٤٤
۱۱- ساختمان یک پلاسمید جدید واکسن ژنی حاوی دو واحد تولید پروتئین پادگن و.....٥۲
واحد القاء سیستم ایمنی
۱۲- وکتور جدید (MIDGE) ٥۳
۱۳- استفاده درمانی DNA ٦۳
۱٤- میزان حضور پلاسمید واکسن ژنی در بافتهای مختلف در مدل حیوانی ۷٤
۱٥- مراحل مختلف تهیه و بررسی واکسن ژنی..............................۸۰
۱٦- مراحل مختلف تخلیص پلاسمید فاقد اندوتوکسین توسط کیت کواژن ۸۳
۱۷- نمودارمراحل مختلف تولیدانبوه‌وکنترل کیفی پلاسمیدواکسن‌ژنی‌به‌روش cGMP ۸٦

واژه‌نامه فارسی ـ انگلیسی ۱۲۷
واژه‌نامه انگلیسی ـ فارسی ۱۳۱
مراجع ۱۳۷



مقدمه

جان نباشد جز خبر در آزمون   هر که را افزون خبر جانش فزون
اقتضای جان چو ای دل آگهی است   هر که آگه‌تر بود جانش قوی است
جان ما از جان حیوان بیشتر   از چه؟ زان رو که فزون دارد خبر

مولوی

افزایش شناخت بشر از موجودات زنده و فرایندهای زیستی، توانمندیهای نوینی را در اختیار انسان قرار داده که کاربردهای گسترده‌ای دارد. بیوتکنولوژی (فناوری زیستی) و مهندسی ژنتیک از علوم نوینی هستند که در دو دهه گذشته توانمندیهای خود را در عرصه‌های مختلف زندگی بشر بویژه در زمینه بهداشت و درمان به خوبی به اثبات رسانده‌اند. مهندسی ژنتیک و یا به عبارتی دست‌ورزی ژنها سبب تحول در عرصه فناوری زیستی و بویژه تهیه و تولید انواع واکسنها، داروهای نوترکیب و روشهای نوین تشخیصی و درمان بیماریها گردیده است.

یکی از موضوعات اساسی در زمینه افزایش سطح بهداشت و سلامت جوامع بشری توجه به پیشگیری و از جمله ایمن‌سازی در مقابل عوامل بیماریهای مختلف است. الویت و مزیت پیشگیری به درمان به عنوان اصلی اساسی مورد قبول همگان می‌باشد. سابقه طولانی و تاریخی روشهای سنتی ایمن‌سازی و روشهای علمی تهیه و استفاده گسترده از واکسن علیه عوامل عفونی جان میلیونها انسان را از خطر مرگ و ناتوانی نجات داده است.

اغلب واکسنهای موجود شامل واکسنهای کشته، ضعیف شده و یا سم غیرفعال به همان روشهای قبل ولی با کیفیت بالا تهیه می‌شوند و کارایی مناسبی نیز دارند و تا زمان تهیه واکسنی با کارایی بالاتر و مناسب‌تر به طور گسترده مورد استفاده خواهند بود. ولیکن وجود تعداد بسیاری از عوامل عفونی خطرناک که واکسنی علیه آنها وجود ندارد و همچنین شناسایی و بروز عوامل عفونی نوپدید و

بازپدیدی که تلاش برای تهیه واکسن به روشهای متداول علیه آنها با موفقیت چندانی توأم نبوده است ضرورت بهره‌گیری از فناوری‌های نوین «مهندسی ژنتیک» میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی ملکولی را مطرح نموده است.

شناسایی و تعیین ردیف ساختار وراثتی عوامل عفونی بخصوص ژنهای دخیل در عفونت، بیماری‌زایی و همچنین عوامل سرطان‌زا، آلرژنها و بخصوص مطالعه فرایندهای ملکولی پاسخ ایمنی و دفاع طبیعی علیه عوامل بیماری‌زا شناخت بهتری از جهان پر اسرار عوامل بیماری‌زا را ایجاد نمود. ورود از عرصه ژنومیک به پروتئومیک و شناسایی فعالیت ژنها سبب گردیده است که دانش زیست‌شناسی ملکولی با بهره‌گیری از توان و اجزا سیستم طبیعی ایمنی که کامل‌ترین و پویاترین فرایندها را در مقابله با عوامل بیماری‌زا به کار می‌گیرد راهکارهای نوینی را پیش روی بشر قرار دهد، پاسخهایی جدید به سؤالاتی کهن. بهره‌گیری از روشهای مهندسی ژنتیک سبب تولید داروها و واکسنهای نوترکیب یا واکسنهای نسل دوم گردید. واکسن هپاتیت که قبلاً با استفاده از پلاسمای خون بیماران مبتلا به هپاتیت تهیه می‌شد و خطر انتقال عوامل ویروسی چون هپاتیت C ، ایدز و سایر عوامل عفونی ناشناخته را داشت جای خود را به واکسن نوترکیب هپاتیت داد که امروزه به عنوان واکسنی مطمئن کاربرد گسترده‌ای دارد.

تلاش برای تهیه واکسنهای متداول یا نوترکیب علیه بسیاری از عوامل عفونی مشکلاتی را به همراه داشته و آنچنان که تصور می‌شد واکسنهایی با ویژگیهای ایمنی مناسب، پایدار و بدون عارضه حاصل نشد.

در سال ۱۹۹۰ بر اساس مشاهداتی، خواص ایمن‌سازی تجویز پلاسمیدهای حاوی ژن رمزکننده پروتئینها آشکار گردید و عرصه‌ای نو در زمینه ایمن‌سازی معرفی شد که نسل سوم واکسنها یا واکسنهای ژنی نام گرفت که انقلابی در عرصه واکسنها بود. پس از یک دهه از تحقیقات اولیه در زمینه خواص ارزشمند واکسنهای ژنی، کاربردهای گسترده آن توجه محققین عرصه‌های پزشکی را به خود جلب نموده است به نحوی که تعداد مقالات منتشر شده در این باره به طور قابل توجهی افزایش یافته و مراکز تحقیقاتی مهم جهان بخشی از منابع خود را به این موضوع اختصاص داده‌اند. سازمان بهداشت جهانی (WHO) با توجه به نتایج ارزشمند تحقیقات در زمینه واکسنهای ضدعوامل عفونی کمیته خاصی را به این موضوع اختصاص داده است و از طرحهای پژوهشی در این زمینه حمایت می‌کنند. شرکتهای خصوصی بسیاری صرفاً در زمینه کاربردهای مختلف واکسنهای ژنی تشکیل شده و مراکز بزرگ تولید واکسن جهان توجه خاصی را به تهیه واکسنهای ژنی انسانی و دامی معطوف نموده‌اند.

پس از وقایع ۱۱ سپتامبر و گسترش تهدیدات بیوتروریستی، مراکز تحقیقات نظامی نیز توجه خاصی را به تواناییهای واکسنهای ژنی در عرصه دفاعی نموده‌اند. با توجه به اینکه واکسنهای ژنی قادر

به تحریک تمام سیستمهای ایمنی سلولار، هومورال و بخصوص مخاطی است (مانند واکسنهای ویروسی ضعیف شده که بهترین واکسنهای موجود می‌باشند) ولیکن عوارض این واکسنها را ندارند، جهت مقابله با تهدیدات عوامل بیولوژیک بیوتروریستی که عمدتاً از طریق تنفسی وارد می‌شوند مورد توجه قرار گرفته است و تحقیقاتی را برای تهیه واکسنهای ژنی ضدعوامل بیوتروریستی انجام داده‌اند. نتایج این تحقیقات نشان داده است که تجویز واکسنهای ژنی به شکل تنفسی و یا خوراکی در مقایسه با واکسنهای متداول و نوترکیب پروتئینی، ایمنی بیشتری را نسبت به عوامل میکروبی یا سمی ایجاد می‌کند.

علاوه بر کاربرد این فناوری در ایمن‌سازی علیه عوامل عفونی، بررسیها کارایی این فناوری را در عرصه‌های دیگر آشکار نموده است که سبب توجه بیشتر به آن شد. مانند کاربردهای درمانی در عرصه‌های بیماریهای عفونی مزمن ویروسی، واکسنهای ضد سرطان، آلرژی، ژن‌درمانی، تولید پادتنهای مونوکلونال، شناسایی پروتئینهای ایمنی‌زا با روش Genetic Library Immunization و انتقال ژن.

خوشبختانه طی چند سال گذشته طرحهای خوبی در داخل کشور در زمینه کسب و راه‌اندازی این فناوری اجرا شده است که نتایج ارزشمندی نیز داشته است.

با توجه به کاربردهای مختلف این فناری و علاقه محققین و دانشجویان ضرورت تهیه مجموعه‌ای حاوی اطلاعات بنیادی در این باره احساس می‌شد که این نوشته گامی است در این مسیر و بدیهی است خالی از کاستی نمی‌باشد. امید است محققین دانشمند و دانشجویان محترم با ارائه نظرات و پیشنهادات خود ما را در رفع این کاستی‌ها و غنی‌تر کردن مطالب یاری نمایند.

لازم است از زحمات عزیزان آقای دکتر محمدباقر اسلامی استاد ارجمند دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، جناب آقای دکتر مهدی اربابی، جناب آقای دکتر آهنگری و جناب آقای دکتر یخچالی محققین محترم مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی برای راهنمایی‌ها و ارشادات خود تشکر و قدردانی نمایم. همچنین از همکاران محترم، سرکار خانم تهمینه لهراسبی، چکامه عظیم‌پور و مریم ابراهیمی که در اجرای طرحهای تحقیقاتی واکسنهای ژنی اینجانب را یاری نموده‌اند سپاسگزارم.

از زحمات عزیزان گرانقدر در معاونت پژوهشی دانشگاه امام حسین(ع) بویژه مؤسسه چاپ و انتشارات دانشگاه جهت همکاری صمیمانه در انتشار این کتاب نیز تشکر و قدردانی می‌نمایم.

علی کرمی

پیشگفتار

واکسنهای متداول که نسل اول نامیده می‌شوند عبارتند از میکروب کشته، ضعیف شده و یا نازهر میکروبی، در حالی که نسل دوم را واکسنهای نوترکیب تشکیل می‌دهند که از طریق مهندسی ژنتیک تهیه می‌شوند. نسل سوم واکسنها یا واکسنهای ژنی که جدیدترین تحول در عرصه طب پیشگیری است عبارتند از تزریق مستقیم پلاسمید حاوی دی. ان. آ (DNA) رمزکننده پروتئین به بدن می‌باشد که آینده امیدبخشی را در عرصه مقابله با بیماریهای عفونی و سرطان و همچنین کاربردهای درمانی گسترده در عرصه ژن‌درمانی ایجاد کرده است. برای تولید واکسن ژنی کافی است پس از تهیه حامل ژنتیکی مخصوص حاوی ژن مورد نظر، آن را به یک سلول میکروبی مانند اشرشیا کولی (E. Coli) منتقل نمود و پلاسمید نوترکیب را به مقادیر لازم در محیط کشت تولید و پس از استخراج و تصفیه به عنوان واکسن استفاده کرد. بنابراین تمام مراحل تولید، استخراج و تصفیه پروتئینها که باعث گرانی واکسنهای نوترکیب می‌شود حذف و در نتیجه هزینه تولید و نگهداری آنها ارزان‌تر می‌شود. از مزایای ویژه‌ای که واکسنهای ژنی را بسیار مورد توجه قرار داده، تحریک سیستم ایمنی سلولی و خونی، امکان غلبه بر عوامل با تنوع پادگنی، ارائه پادگن به شکل طبیعی آن به سیستم ایمنی، فاصله کوتاه مراحل تحقیق تا به‌کارگیری، امکان تهیه واکسنهای چندگانه و بالاخره ارزانی و سهولت تولید این واکسنها را می‌توان نام برد.

واکسنهای ژنی که به مرحله آزمایشهای انسانی رسیده‌اند شامل واکسن ژنی ایدز، هپاتیت B ، مالاریا، آنفلوانزا و واکسن ژنی لمفوم سلولهای T می‌باشند. از عوامل عفونی دیگری که واکسن ژنی برای آنها طراحی و تحقیق شده است؛ هپاتیت C ، G و E ، هاری، ویروس پاپیلوما، ویروس هرپس، روتاویروسها، سل، جذام، تیفوئید، بورلیا بورگدورفری (عامل بیماری لایم)، شیستوزوما ژاپونیکوم، لیشمانیا، پلاسمودیوم یولی، مایکوپلاسما و بسیاری از عوامل عفونی دامی را می‌توان نام برد.

علاوه بر کارایی این روش در تهیه واکسن، علیه بیماریهای عفونی انسانی ـ دامی، تحقیقات بسیاری در مورد امکان استفاده از آن برای پیشگیری و درمان سرطان، درمان آلرژی، بیماریهای خود ایمنی، ژن‌درمانی و تولید سایر مواد اساسی سیستم ایمنی مانند پادتن‌های تک‌دودمانی (مونوکلونال)، فاکتورهای رشد، داروهایی که ژنهای آنها شناسایی شده‌اند و همچنین شناسایی سریع ژنهای ایمنی‌زا انجام گرفته و نتایج ارزشمندی نیز کسب گردیده است.

پس از گذشت نزدیک به یک قرن از روشهای علمی مبارزه با بیماریهای عفونی و وجود انواع واکسنها و دهها آنتی‌بیوتیک مختلف، هنوز بیماریهای عفونی بزرگ‌ترین عامل مرگ و میر و ناتوانی بشر مخصوصاً در کشورهای فقیر و در حال توسعه می‌باشد و این در حالی است که جهان با هجوم عوامل عفونی نوظهور (Emerging Infectious Agent) و بیماریهای عفونی بازظهور (Remerging Infectious Disease) مواجه است.

مشکلات جدیدی که در عرصه مبارزه با بیماریهای عفونی مطرح است عبارتند از:

۱- شناسایی و کشف عوامل عفونی خطرناک جدید. از سال ۱۹۷۳ تاکنون بیش از ۲۹ عامل عفونی جدید و ۲۰ بیماری عفونی بازظهور وجود داشته است، مانند ویروسهای ایدز، ابولا، عامل بیماری لایم، اشرشیا کولی، (E. Coli 0157:H7) ، کامپیلو باکتر (Campylobacter) و هلیوباکتر پایلوری، بابزیوزیس (Babesiosis) ، لامبنا ویروس، استرپتوکوک گروه A گوشتخوار، هانتا ویروسها، ماربورگ ویروس، پریون عامل بیماری دیوانگی گاوها (BSE) ، جونین ویروس (Junin) ، هرپس هومینیس تایپ ۸ ، پاپیلوما ویروسهای مختلف (Papilloma Viruses) ، ویروسهای هپاتیت مختلف C, D, E, F, G ، ویروس بورنا (Borna Viruse) انواع ویروسهای جدید آنفلوانزا، ارلیکیوزیس (Ehrlichiosis) کریپتوسپوریدیوزیس (Cryptosporidiosis) .

۲- مقاومت روزافزون میکروبها و انگلها به آنتی‌بیوتیکها و درمانهای متداول مانند باکتری سل و پنوموکوک مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیکها، انتروکوک مقاوم به ونکومایسین.

۳- تغییرات زیست محیطی در نتیجه دخالتهای مخربانه انسان صنعتی، تخریب لایه اوزون و افزایش اشعه ماوراءبنفش، آلودگیهای آب و خاک و هوا به ترکیبات سمی و نقش آن در بروز تغییرات ژنتیکی در میکروارگانیسمها و تبعات آن و همچنین نقش این آلودگیها در تضعیف سیستم ایمنی (بررسی‌های علمی مشخص نموده است که افزایش آلودگیهای زیست محیطی و ورود مواد شیمیایی مضر از طرق مختلف به بدن سبب کاهش توان سیستم ایمنی در مقابله با عوامل عفونی می‌گردد)، افزایش واکنشهای حساسیت‌زا و آلرژی در انسانها که می‌تواند زمینه‌ساز حساسیت بیشتر انسان در ابتلا به عوامل عفونی باشد.

٤- شناخت نقش عوامل عفونی در سرطانها و یا بیماریهای بدخیم دیگر.

۵- استفاده از عوامل عفونی در عملیات تروریستی موسوم به بیوتروریسم.

مجموعه این عوامل نیاز به توجه جدی به بیماریهای عفونی و روشهای جدید مبارزه و کنترل آنها را مطرح ساخته است.

ارزان‌ترین درمان، پیشگیری است. در مبارزه با بیماریهای عفونی واکسنهای متداول کارایی مناسب و ارزشمند خود را نشان داده‌اند. ریشه‌کنی آبله، کاهش عظیم میزان مرگ و میر و ناتوانی نوزادان با واکسیناسیون علیه بیماریهای کشنده و ناتوان‌کننده‌ای مانند فلج اطفال، سرخک، سرخجه، دیفتری و هپاتیت ارزش و اهمیت واکسنها را نشان داده است. علاوه بر آن تحولات عظیم علمی امکان پیشگیری بیماریهایی چون سرطان، آلرژی و بیماریهای خودایمنی توسط واکسنها را مطرح نموده است. کاهش چشمگیر سرطان سلولهای کبدی پس از ایمن‌سازی گسترده علیه هپاتیت B در برخی کشورها شاهدی بر این مدعاست. این تحولات سبب توجه جدی به ایمن‌سازی شده به طوری که سرمایه‌گذاری در عرصه تحقیقات واکسنهای نوین به شدت گسترش یافته و صنایع واکسن‌سازی سالانه معادل ۳ میلیارد دلار فروش دارند.

با نگاهی به تاریخچه واکسنها مشاهده می‌شود که روند تهیه واکسنهای جدید علیه عوامل عفونی سیر نزولی داشته و ده‌ها سال است که واکسن جدیدی به این مجموعه اضافه نشده و این نشان‌دهنده محدودیت توسعه واکسنهای متداول است که به این روشها نمی‌توان علیه بسیاری از عوامل عفونی و مخصوصاً عوامل عفونی نوظهور واکسن تهیه کرد. شاهد این ادعا آن است که پس از سالها تحقیق و صرف هزینه‌های کلان هنوز واکسنی علیه عواملی مانند ایدز، مالاریا، هپاتیت C و سایر میکروبهای عفونی تهیه نشده است. همچنین نیاز به واکسنهایی با کیفیت بهتر، عوارض کمتر و ارزان‌تر به شدت محسوس است. در واقع عصر مبارزه با بیماریهای عفونی فرا رسیده است. روشهای جدیدی برای غلبه بر گسترش بیماریهای عفونی که واکسن ندارد مورد نیاز است. یکی از این روشهای ارزشمند که طی سالهای اخیر مورد بررسی و تحقیق بوده بررسی کارایی واکسنهای ژنی (DNA Vaccines) است که به انقلاب سوم واکسنها موسوم شده است.

فصل اول

تاریخچه ایمن سازی (واکسنها)

دکتر علی کرمی

بررسی منابع معتبر نشان می دهد که پزشکان اسلامی با بیماریهای عفونی آشنایی داشته و به روشهایی جهت پیشگیری از ابتلای به آنها اشاره نموده اند . **ابوبکر محمدبن زکریای رازی** طبیب بزرگ ایرانی متولد سال ۲۴۰ ه . ق . در باره سرخک و ابله کتابی بنام الجدری و الحصبه را نوشته و برای اولین بار در تاریخ پزشکی جهان در زمینه بیماریهای عفونی نظریه ارائه نموده است . **ابوعلی سینا** دانشمند بزرگ ایرانی متولد ۳۷۳ ه. ق نیز در کتاب قانون به بیماریهای عفونی پرداخته و روشهای مختلف ابتلا به این بیماریها را شرح می دهد و بدقت در باره ابتلا به عفونتهای دستگاه گوارش از طریق آب توضیح داده و حتی به وجود عواملی عفونی در محیط وآب اشاره می کند . **سیداسماعیل جرجانی** متولد ۴۳۴ ه. ق نویسنده کتاب ارزشمند ذخیره خوارزمشاهی در ده جلد که دائره المعارف طبی است بیماریهایی مختلفی از جمله سل ، جذام ، آبله ، هاری ، وبا ، برص را عفونی شناخته و انتقال آنه ا از آب و هوا و غیره را امکان پذیر میداند . **ابن رشد اندلسی** متوفی سال ۵۹۵ ه. ق بخوبی به ایمن بودن دائمی فردی که از آبله جان سالم بدر برده اشاره نموده است . **ابن خطیب اندلسی** متوفی ۷۷۶ ه. ق در دوره همه گیری جهانی طاعون رساله طاعون خود را نوشت و به واگیر بودن و روش انتقال آن اشاره کرد. **بهاء الدین نوربخش رازی دیلمی** (متوفی ۹۱۲ ه . ق) برای اولین بار سیاه سرفه را بخوبی تشریح کرد و سه همه گیری آن را در هرات و ری بتفصیل ذکر نموده است . **حکیم عماد الدین محمود بن مسعود کاشانی** در سال ۹۷۷ رساله ای در مورد سیفلیس بنام آتشک نوشت و روش انتقال آن را بطریق جنسی یاد آور شد . **ابوریحان بیرونی** در کتاب صیدنه به ایجاد ایمنی در مقابل عوامل خارجی در بدن اشاره کرده و حتی به نوعی ایمنی درمانی در باره بیماری هاری سخن گفته است .

ایمن سازی بر علیه آبله از قرنها پیش در ایران شایع بوده است . نگارنده شخصا در گرد اوری و بررسی سوابق ایمن سازی سنتی در ایران شواهدی را بنقل از بزرگان و اهالی مطلع روستاهای منطقه ماه نشان زنجان مبنی بر ایمن سازی بر علیه ابله ثبت نموده است . در این روش از مایع تاولهای گاو مبتلا به آبله استفاده می شد و با ایجاد خراش د ر پوست ، مایع را بروی آن قرار می دادند که به آن مایه کوبی گفته می شد. بر اساس این موارد در خانواده های که اقدام به این روش می نمودند ابله مشاهده نمی شد . گزارشاتی ازایمن سازی بر علیه آبله توسط چینی ها نیز چندین قرن پیش از روش مایه کوبی وجود دارد . بسیار پس از آن یعنی در سال ۱۷۹۷ ادوارد جنر متوجه شد کارگرانی که وظیفه شیردوشی را داشتند در نتیجه تماس با گاوهای مبتلا به ابله نسبت به این بیماری مقاوم هستند و به ابله مبتلا نمی شوند . بدین طریق او توانست با تلقیح آبله گاوی به انسان واکسیناسیون یا مایه کوبی (vaccus = cow) Vaccination همان روشی که

قرنها پیش در ایران و چین شایع بود را طی مقاله ای بعنوان روش علمی پیشگیری از ابله منتشر سازد .

دکتر میمندی نژاد در صفحه ۵ کتاب سیاه زخم خود که به سال ۱۳۳۹ توسط انتشارات دانشگاه تهران منتشر شد، روش سنتی ایمن سازی بر علیه سیاه زخم را در روستاهای ایران شرح می دهد . وی در سال ۱۳۱۹ در مناطق جنوب کشور شاهد ایمن سازی دامها بر علیه سیاه زخم بروش سنتی توسط چوپانی بوده است که با خیس نمودن ریسمانی از موی بز در له شده جگر و طحال گوسفندی که در نتیجه ابتلا به بیماری تلف شده و خشک کردن آ ن در آفتاب توسط جوالدوزی این نخ را از قاعده گوش گوسفندان عبور می دادند که در حقیقت روشی جهت تلقیح واکسن به دامها می باشد . بررسی وی نشان می دهد که این روش قرنها قبل از آنکه واکسن سیاه زخم توسط پاستور در سال ۱۸۸۱ ساخته شود در این منطقه جهت پیشگیری از مبتلا شدن دامها به سیاه زخم انجام می شده است .

واکسیناسیون سنتی در ایران بر علیه بیماری پلوررو پنومونی واگیردار دامی نیز توسط عشایر سیر جان قرنهاست که انجام می گیرد و دامداران با استفاده از ریه گوسفند تلف شده از بیماری مایعی تهیه می کنند و سایر دامها را با تلقیح این مایع (واکسن) بروش ایجاد زخم (برش قسمتی از پوست و قرار دادن مایع در زیر آن و بستن پوست) بر علیه بیماری ایمن می سازند .

بنابر این تاریخچه ایمن سازی و واکسیناسیون بر علیه بیماریهای عفونی قدمتی بسیار دارد و دانشمندان اسلامی و ایرانی نقش بسیاری در این زمینه داشته اند. ولیکن کشف علمی میکروبها بعنوان منشاء بیماریهای عفونی سبب گردید تا روشهای علمی تهیه واکسنهای مختلف فراهم گردد.

تاریخچه واکسنهای تهیه شده بروشهای علمی :

۱۷۹۸آبله
۱۸۸۵ هاری
۱۸۹۷ طاعون
۱۹۲۳ دیفتری
۱۹۲۶ سیاه سرفه
۱۹۲۷ سل - کزاز
۱۹۳۵ تب زرد
۱۹۵۵ فلج اطفال تزریقی
۱۹۶۲ فلج اطفال خوراکی (سابین)
۱۹۶۴ سرخجه
۱۹۶۷ اوریون
۱۹۷۰ روبلا
۱۹۸۱ هپاتیت B

واکسنهای جدید و نقش ان در کنترل بیماریهای عفونی

نوع واکسن	میزان مرگ و میر جهانی در سال
هپاتیت B	۱۱۵۶۰۰۰ نفر
روتاویروس	۸۷۰۰۰۰
هموفیلوس انفلوانزا تیپ B	۷۰۰۰۰۰
واکسن غیر سلولی سیاه سرفه	۳۵۵۰۰۰
واکسن کونژوگه پنوموکوک	۱۲۰۰۰۰۰

انواع واکسنها :

بطور کلی از زمان ابداع اولین واکسنها تاکنون آنها را میتوان به انواع زیر تقسیم بندی کرد:

۱- **واکسنهای نسل اول** که عبارتند از:

- **واکسنهای کشته** که عبارت از میکرب کشته است که بروشهای مختلفی مانند حرارت یا با استفاده از مواد شیمیایی میکرب زنده را کشته و بعنوان واکسن از آن استفاده می شود. از این نوع واکسنها می توان به واکسن فلج اطفال تزریقی، هاری ، انسفالیت ژاپنی نوعB ، هپاتیت A و انسفالیت کنه ای اشاره کرد .

- **واکسن ضعیف شده** که عبارت از استفاده از انواع ضعیف شده و یا غیر بیماریزای میکروب عامل بیماری است . جهت تهیه میکروب ضعیف شده که قادر به ایجاد بیماری نباشد یا بیماری بسیار خفیفی را ایجاد نماید از روشهای مختلفی استفاده می شود مانند کشت مکرر میکروب حاد جهت حذف حدت (ویرولانس) یا قدرت بیماریزایی آن ، استفاده از مواد شیمیایی جهش زا و یا تابش اشعه های جهش زا جهت یافتن انواع غیر بیماریزا و استفاده از روشهای مهندسی ژنتیک جهت تغییر ژنتیکی و تبدیل انواع بیماریزا به غیر بیماریزا یا ضعیف شده . این نوع واکسنها بدلیل زنده بودن میکروب و ایجاد تقلیدی از بیماری واقعی و گاه ایجاد بیماری بسیار خفیف سبب تحریک قوی سیستم ایمنی شده و در نتیجه ایمنی حاصله بسیار مناسب است و بعنوان بهترین واکسنهایی که قادر به تحریک هردو سیستم ایمنی سلولی و خونی هستند شناخته می شوند. از این واکسنها می توان به انواع واکسنهای فلج اطفال خوراکی (سابین) ، سرخجه ، اوریون ، سرخک ، آبله مرغان ، سل ، وبا ، حصبه ، تب زرد اشاره کرد.
  با تمام مزایای واکسنهای ضعیف شده مشکلاتی را نیز دارند:
  این واکسنها بدلیل زنده بودن میکروب خطراتی را بخصوص در کودکان و افرادی که دارای ضعف سیستم ایمنی هستند ، افرادی که در حال شیمی درمانی سرطان می باشند و مبتلایان به ایدز و سالمندان دارد ومی تواند سبب بروز عفونتهای خطرناک شوند. این افراد حتی می توانند بیماری را از افراد سالمی که این نوع واکسنها را بتازگی زده اند دریافت نمایند .
  پاسخ به این سئوال که ایا این میکروبهای ضعیف شده که قدرت بیماریزایی و حدت خود را از دست داده اند هرگز بیماریزا نخواهند شد مشکل است و احتمال بازگشت قدرت بیماریزایی و حدت میکروب وجود دارد.

۲- استفاده از محصولات میکروبی مانند نازهر (Toxoid) و پلی ساکاریدهای میکروبی:

در این روش بجای استفاده از پیکره میکروب (زنده یا کشته) از زهرابه های میکروبی که سبب بروز علایم بیماری

است استفاده می شود. با کشت میکروب و استخراج سم یا سموم میکروب، بروش های شیمیایی سمیت آنها ازبین می رود و در واقع ضمن حفظ خاصیت ایمنی زایی سمیت آنها حذف شده و بعنوان واکسن استفاده میشود مانند واکسن کزاز ، سیاه سرفه ، دیفتری ، بوتولینوم ، پنوموکوک ، مننگوکوک ، هموفیلوس انفلوانزا و واکسن غیر سلولی سیاه سرفه.

نوع دیگری از واکسن که جهت پیشگیری از ابتلا به سالک یا لیشمانیوز در مناطق باز بدن مانند صورت استفاده می شد ، تلقیح عامل عفونی در مناطق پوشیده مانند زیر بغل جهت بروز زخم و تحریک سیستم ایمنی فرد بود . این نوع ایمن سازی یا لیشمانیزاسیون ، در بین نیروهای نظامی شایع بود و امروزه با تهیه واکسنهای جدید ضد سالک دیگر صورت نمی گیرد زیرا در برخی افرادی که دارای ضف سیستم ایمنی هستند زخم ایجاد شده می تواند سالها باقی مانده و عوارض بسیاری ایجاد نماید.

اغلب واکسنهای فعلی از انواع فوق الذکر هستند. با توجه به دوران طولانی استفاده از واکسنهای نسل اول با اینکه منافع بسیاری را در پیشگیری از بیماریهای عفونی داشته و در کنترل انها نقش مهمی را ایفا نموده است ولیکن مشکلاتی را نیز دارند.

درتهیه اغلب واکسنهای نسل اول، از تمام پیکره میکروب کشته یا ضعیف شده استفاده میشود وسیستم ایمنی برعلیه تمام پادگنهای پیکره میکروب واکنش نشان میدهد که این خود سبب پیچیدگی واکنشهای ایمنی شده و احتمال بروز واکنشهای مضر را افزایش میدهد . علاوه بر این برای تولید واکسنهای ویروسی، نیاز به کشت و تولید انبوه ویروسها در سلولهای مختلف حیوانی وانسانی است که احتمال آلودگی کشتهای سلولی به ویروسهای دیگر و در نهایت آلوده شدن واکسن تولیدی و همچنین سرطانی شدن سلولهایی که بدفعات مکرر کشت میشوند مطرح است (تاریخچه پیشرفت و توسعه استفاده از انواع مختلف رده های سلولی مشکلاتی داشته است که بکرات سبب جایگزینی سلولهای جدیدتر بجای سلولهای قبلی شده است). از نظر ایمنی زایی، واکسنهای ویروسی زنده (ضعیف شده) قادر به تحریک هردو سیستم ایمنی سلولی و خونی (تولید پادتن بر علیه پادگن) هستند و علت آن اینست که ویروس ضعیف شده قادر به ایجاد عفونت خفیفی است که سیستم ایمنی را بطور فعال تحریک میسازد . اما استفاده از واکسن های میکروبی ضعیف شده بخصوص واکسن ویروسی زنده در کودکانی که سیستم ایمنی ضعیفی دارند میتواند مشکلاتی را ایجاد کند . در ضمن بدلیل زنده بودن ویروس امکان دوباره فعال شدن میکروب ضعیف شده به میکروب عفونی وجود دارد و این خطر بسیار بزرگی است.

بااینکه واکسنهای میکروبی کشته، خطر ایجاد عفونت را ندارد ولیکن قادر به القاء پاسخ ایمنی مرتبط با سیستم سازگاری نسجی کلاس یک (MHC I : Majour Histocompatibility Complex I که سبب القاء ایمنی سلولی است نمیباشند بهمین دلیل واکسنهای کشته مصرف بسیار کمی دارند و اغلب واکسنهای کنونی از دسته واکسنهای زنده ضعیف شده می باشند.

جدول ۱ : عوامل عفونی که ضرورت تهیه واکسن بر علیه آنها وجود دارد:

Chlamydia sp.
Coccidioides immitis
Cryptococcus neoformans
Cytomegalo virus
Dengue virus
Entamoeba histolytica
Enterotoxigenic Deficiency virus HIV-1
Epstein-Barr virus (EBV)
Group A streptococcus
Haemophilis influenzae nontypable

Hepatitis C virus (HCV)
Hepatitis D virus
Hepatitis E virus
Herpes simples virus types 1
Histoplasma capsulatum
Human Immune Deficiency virus HIV-1
Human Immune Deficiency virus HIV-2
Human papillomavirus
Legionella pneumophila
Leishmania sp.
Moraxella catarrhalis
Mycoplasma pneumoniae
Neisseria gonorrheae
Parainfluenza virus
Plasmodium spp.
Pseudomonas aeruginosa
Pseudomona cepacia
Respiratory syncytial virus
Rickettsia rickettsii
Rotavirus
Schistomosoma mansoni
Shigella (all species)
Toxoplasma gondii

واکسنهای نسل دوم (واکسنهای نوترکیب):

یکی از مهمترین دستاوردهای زیست شناسی ملکولی و مهندسی ژنتیک کاربVد ان در عرصع واکسنهای نوین می باشد. واکسنهای نوترکیبی که بروشهای مهندسی ژنتیک تهیه می شوند دو نوع هستند . در نوع اول که جهت تهیه واکسن زنده ضعیف شده(live recomibinant vaccine) بکار می رود برای غیر حاد کردن یک عامل عفونی با حذف یا ایجاد جهش دربخشی از یک یا چند ژن مسئول بیماری زایی یا حدت (ویرولانس) میکروب، بروشهای مهندسی ژنتیک اصلاح می نمایند. روش دیگر اینست که یک یا چند ژن رمز کننده پروتئینهای ایمنی زا از مخزن ژنی میکروب بیماریزا را جدا کرده و به یک ویروس یا باکتری بی خطر یا ضعیف شده دیگری پیوند می زنند . این نوع واکسن نوترکیب زنده مزایای بسیاری نسبت به واکسنهای ضعیف شده متداول دارند زیرا فقط پروتئینهای خاصی از میکروب بیماریزا را تولید می کنند و امکان بازگشت قدرت بیماریزایی یا وحشی شدن میکروب وجود ندارد . البته هیچ واکسن انسانی بدین روش تا کنون تهیه نشده است و اغلب این واکسنها در مراحل تحقیق و آزمایشات تکمیلی می باشند ولیکن واکسنهای متعدد دامی از این روش تهیه شده و استفاده دارد.

نوع دیگر واکسنهای نسل دوم، واکسنهای تک واحدی Subunit vaccine یا واکسنهای نوترکیب پروتئینی هستند که بروشهای مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی تهیه می ش وند. در این روش ژن رمز کننده پروتئین ایمنی زای میکروب وحشی به یک پلاسمید پیوند خورده و سپس به یک سلول مناسب منتقل می شود . با القاء ژن، پروتئین مورد نظر تولید می گردد که پس از استخراج و خالص سازی ، پروتئین نوترکیب بشکل واکسن مصرف می شود واکسن هپاتیت B و واکسن نوترکیب لایم بدین شکل تهیه شده است .

واکسنهای نوترکیب وکتوری : Recombinant Vector Vaccines

در این روش از میکروبهای ضعیف شده بعنوان حامل ژنهای رمز کننده پروتئینهای ایمنی زا استفاده می شود . ازاین

میکروبها می توان ویروس واکسینیا vaccinia virus، ویروس ضعیف شده فلج اطفال ، آدنو ویروس ، انواع ضعیف شده سالمونلا ، شیگلا ، BCG و لیستریا را نام برد که قادر به تقسیم و رشد در درون میزبان و تولید پادگن مورد نظر هستند . استفاده از وکتور های میکروبی جهت انتقال واکسنهای ژنی و ایجاد ایمنی مخاطی نیز مطالعه شده است . در این روش می توان واکسن ژنی را بداخل باکتری که قادر به رشد در دیواره مخاطی دستگاه گوارش است انتقال داد . این واکسن بشکل خوراکی قابل مصرف است . یکی از مشکلات اساسی این واکسنها در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی است و می تواند در این افراد سبب بیماری شود .

واکسنهای آنتی ایدیوتیپAnti-Idiotype Vaccines

آنتی بادی ضد آنتی ایدیوتایپی anti-idiotype تصویری از آنتی ژن است بنابر این استفاده از آن می تواند سبب پاسخ ایمنی بر علیه آنتی ژن گردد . مزیت این واکسنها در مقابله با میکروبهای بسیار خطرناکی است که استفاده مستقیم از آنتی ژنهای آنها می تواند خطرساز باشد بنابر این از نوع استفاده می شود .

علاوه بر واکسنهای فوق با کشفیات جدید عرصه ایمنی شناسی ملکولی روشهای جدیدتری در طراحی واکسنهایی با کارایی بیشتر، ارزانتر، با سهولت تولید و عوارض کمتر را ممکن ساخته است، از آن جمله میتوان به **واکسنهای پپتیدی** اشاره کرد که با استفاده از گیرنده های سلولهای لنفوسیت T ویا پادگنهای سازگاری نسجی (MHC) همراه با پادگنهای حفاظت دهنده میکروبهای عفونی در تهیه واکسنهای نوترکیب صورت می گیرد در این روش با استفاده از بخش کوچکی از پروتئین اینترلوکین بتا (IL-1 beta) شامل رشته ای از ۹ اسید امینه VQGEESNDK بعنوان یاور ایمنی بسیار قوی را القاء میکند.

روش تهیه واکسنهای نوترکیب :

همچنان که ذکر شد واکسنهای نوترکیب با الحاق ژن رمز کننده پروتئین ایمنی زای میکروب عامل بیماری به یک حامل ژنتیکی موسوم به پلاسمید (Plasmid) و سپس انتقال پلاسمید نوترکیب به یک باکتری، مخمر و یا سلول مناسب حیوانی ویا گیاهی آماده میگردند . برای تولید انبوه واکسن نوترکیب ، سلول حاوی پلاسمید نوترکیب در مخزنهای بزرگ (فرمانتور) حاوی محیط مخصوص کشت میشود . دراین مرحله ژن مربوط به پادگن ایمنی زا در داخل سلول باکتری، مخمر ویا سلول بروشهای شیمیایی یا فیزیکی القا ء شده و پروتئین مربوطه به مقادیر انبوه تولید میشود که با جمع آوری سلولها، پروتئین نوترکیب از بین سلولها یا محیط کشت، استخراج و تصفیه میگردد تا پس از طی مراحلی بعنوان واکسن نوترکیب مورداستفاده قرار گیرد.

بطور خلاصه تولید پروتئینهای نوترکیب در سه مرحله زیر صورت می گیرد:

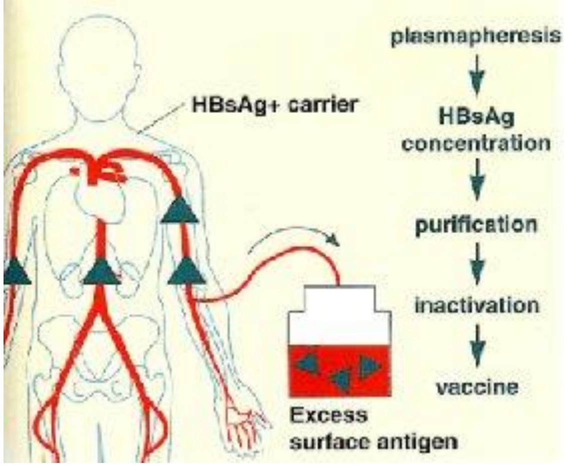
۱- فرایندهای بالا دستی (Upstream processing) که از شناسایی و آماده نمودن ژن تا تهیه حامل القا ء کننده ژن را شامل می شود (شناسایی پادگن حفاظت دهنده).

۱ - مرحله تخمیر یا تولید انبوه پروتئین نوترکیب در فرمانتور Fermentaion processing

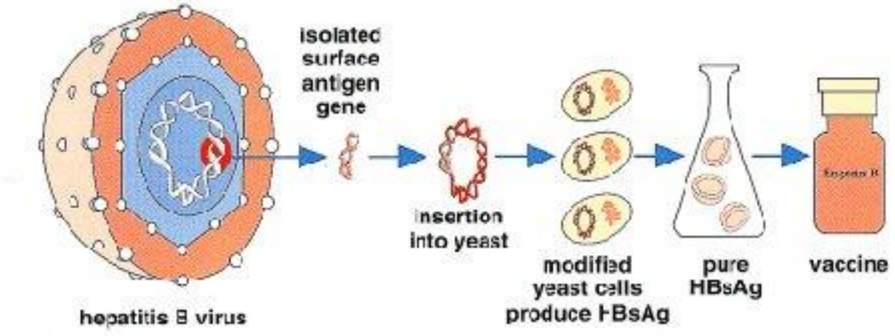
۳ -مراحل پایین دستی (down stream processing) که از جمع آوری محیط کشت و جداکردن سلولهای تولید کننده پروتئین نوترکیب تا استخراج ، تصفیه و خالص سازی و تغلیظ پروتئین تشکیل یافته است و پر هزینه ترین بخش در فرایندهای بیوتکنولوژی است. یکی از مزایای عمده واکسنهای ژنی حذف بسیاری از مراحل پایین دستی است.

یکی از واکسنهای متداول این نسل، واکسن نوترکیب هپاتیت B (پروتئین نوترکیب و خالص موسوم به پادگن سطحی ویروس هپاتیت B) میباشد که در سطح جهانی کاربرد عمومی دارد . قبل از اینکه واکسن هپاتیت B بشکل نوترکیب

تهیه گردد این پروتئین از خون بیماران مبتلا به هپاتیت استخراج می شد که بدلیل خطر آلودگی به عوامل عفونی ویروسی دیگر از این روش استفاده نمی شود .


plasmapheresis
HBsAg concentration
purification
inactivation
vaccine
HBsAg+ carrier
Excess surface antigen

شکل : روش قدیمی تهیه واکسن هپاتیت B موسوم به واکسن پلاسمایی که با استخراج انتی ژن از پلاسمای خون بیماران مبتلا به هپاتیت مزمن صورت می گرفت که بدلیل احتمال انتقال ویروسهای مختلف منسوخ گردیده است.


isolated surface antigen gene
insertion into yeast
modified yeast cells produce HBsAg
pure HBsAg
vaccine
hepatitis B virus

Preparation of a genetically-engineered vaccine

شکل : روش تهیه واکسن نوترکیب هپاتیت B بروش مهندسی ژنتیک

مزایای واکسنهای نوترکیب پروتئینی به واکسنهای متداول:

واکسنهای نوترکیب نسبت به واکسنهای نسل اول از مزایای بسیاری برخوردارند ومهمترین مزیت آنها استفاده از یک پادگن ایمنی زا در تهیه واکسن بجای استفاده از کل پیکره میکروب است . واکسنهای نوترکیب بدلیل اینکه از یک پروتئین ایمنی زای میکروب در تهیه آن استفاد ه می شود فاقد مشکلات واکسنهای کشته و ضعیف شده است . پروتئین نوترکیب استخراج شده فاقد آلودگی ویروسها و عوامل ناشناخته ایست که در هنگام تهیه واکسنهای ویروسی زنده در

کشتهای سلولی انسانی و حیوانی می تواند وجود داشته باشد در عین حال تحریک غیر ضروری سیستم ایمنی توسط سایر پروتئینهای پیکره میکروبی صورت نمی گیرد و در نتیجه این واکسنها بسیار بی خطر و ایمن هستند.

مشکلات واکسنهای نوترکیب پروتئینی :

باتمام مزایایی که واکسنهای نوترکیب دارند ولیکن پیچیدگی مراحل تولید، جداسازی وتصفیه آنها که نیاز به دانش فنی و ابزار و مواد اختصاصی دارد سبب میشود که هزینه های تولید واکسن افزایش یافته و در نتیجه قیمت واکسنهای نوترکیب گران باشد. در عین حال بدلیل پروتئینی بودن محصول نهایی، شرایط نگهداری و نقل انتقال و حفظ واکسن نیازمند شرایط مناسب (زنجیره سرد) است که سبب افزایش هزینه نهایی واکسن میگردد . علاوه بر آن واکسنهای نوترکیب پروتئینی یا گلایکو پروتئینی بدلیل اینکه از خارج وارد بدن می شوند مانند پادگنهای خارجی exogenous antigens و واکسنهای کشته تنها سیستم ایمنی خونی (تولید انتی بادی) را فعال می کند و قادر به تحریک سیستم ایمنی سلولی نیست که از نواقص این نوع واکسنها در مبارزه با عفونتهایی می باشد که ایمنی سلولی در آنها ضروری است.

یکی از مشکلات دیگر واکسنهای نوترکیب تولید شده در میکروبها نداشتن ساختار طبیعی پادگنهای گلیکوپروتئینی بدلیل عدم انجام کامل عمل گلایکوزیلیشن Glycosilation است و مشخص شده که واکنش ایمنی در بسیاری از عوامل عفونی بر علیه بخش قندی ملکول است و هرگونه اشکال در فرایند شکل پذیری ساختمان فضایی طبیعی پروتئین (folding) در مراحل نهایی استخراج و تخلیص میتواند سبب شود که پادتنهای تولیدی بر علیه آن در بدن کاملا همانند پادتن تولیدی علیه پروتئین طبیعی نبوده و قادر به پیوند با پادگن عامل عفونی نباشد و یا بطور ناقص اتصال یابد، در نتیجه میزان ایمنی زایی و حفاظت واکسن نوترکیب و در نتیجه کارایی آن کاهش می یابد.

بررسی ایمنی زایی واکسن نوترکیب پروتئینی هپاتیت B در انسان نشان داده است که عدم پاسخ مناسب در بین جمعیت سالم در برخی افراد وجود دارد و تقریبا ۲۵٪ افرادی که واکنش ایمنی ضعیفی دارند دارای ژنوتیپ HLA-B8,SC01,DR3 می باشند در عین حال بی پاسخی به واکسن نوترکیب در بین بیماران کلیوی و هموفیلی نیز شایع است .

این مسئله می تواند خطراتی را برای بهداشت کارانی که با بیماران در بخشهای خون و دیالیز و همچنین بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی ارتباط دارند ایجاد نماید . در عین حال ایمن سازی با این واکسن در بیمارانی که به نوع مزمن هپاتیت B مبتلا هستند بی نتیجه است . این مشکل در واکسنهای ژنی وجود ندارد زیرا پادگن در داخل سلولهای بدن تولید شده و تمام مراحل طبیعی پردازش پادگن و الحاق شاخه های قندی به آن انجام گرفته بنابراین پروتئبن نهایی دارای ساختار کاملا طبیعی است . بدلیل همین مشکلات است که پس از سالها از ابداع روشهای تولید واکسنهای نوترکیب بر علیه بیماریهای عفونی تنها دو واکسن نوترکیب یکی بر علیه ویروس هپاتیت B و دیگری واکسن نوترکیب ضد بیماری لایم کارایی مناسبی را نشاد داده و موفق به اخذ مجوز شده اند و غیر از آنهاهیچ واکسن نوترکیب دیگری به فهرست واکسنهای ضد بیماریهای عفونی اضافه نگردیده است . علاوه بر آن بدلیل هزینه های بسیار سنگین تولید، استخراج این واکسنها که سبب گرانی واکسن می شود بنظر نمی رسد که واکسنهای نوترکیب بتواند جایگزین مناسبی برای واکسنهای متداول کنونی و یا جدید باشد . تنها راه حل دستیابی بروشی است که مراحل پر هزینه تولید و خالص سازی پروتئین نوترکیب را حذف نماید تا علاوه بر سهولت تولید واکسنی ارزان بدست آید.

اینک با پیشرفت دانش مهندسی ژنتیک میتوان مراحل تولید، جداسازی و تصفیه پروتئین نوترکیب ، که بخش اساسی هزینه های تولید واکسنهای نوترکیب را تشکیل میدهد حذف نمود، و بجای استفاده از میکروبها و سلولهای خارج از بدن،

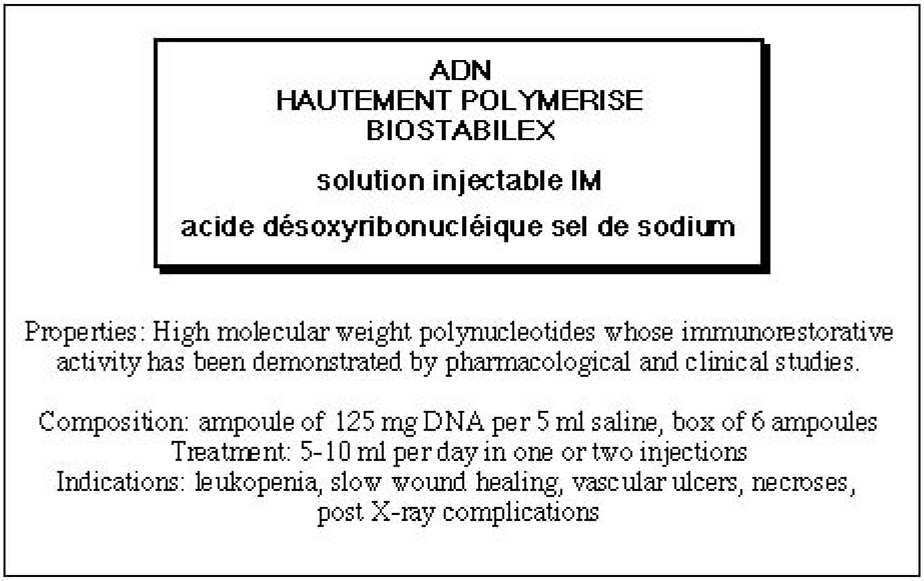
با تزریق مستقیم پلاسمید واجد ژن مورد نظر و بهره گیری از توان بافتهای بدن انسان ، حیوانات (بعنوان منبع تولید پروتئین در داخل موجود زنده) واکسنی جدید که به واکسنهای نسل سوم مشهور هستند تهیه کرد.

واکسنهای نسل سوم یا واکسنهای ژنی :

واکسنهای نسل سوم عبارت از تزریق مستقیم پلاسمید (DNA) خاصی است که قدرت القا ء ژن مورد نظر در داخل سلولهای بدن را دارند. بنابر این اساس کار واکسنهای ژنی بر فرایند طبیعی عمل ترجمه ژنها به پروتئین در سلولهای بدن انسان و تمام موجودات زنده است و پروتئین نوترکی‌بی که برای تحریک سیستم ایمنی لازم است بجای آنکه در خارج از بدن تولید و به بدن تزریق شود، در داخل بدن تولید و مستقیما در اختیار سیستم طبیعی قرار گیرد (۱۳۱).
نامهای مختلفی مانند دی .ان.ا واکسن DNA Vaccine ، آر.ان.ا واکسن RNA Vaccine ، واکسنهای ژنی Gene Vaccine، واکسنهای پلاسمیدی ، دی .ان.ا خالص Naked DNA ، واکسنهای پلی نوکلئوتیدی polynucleotide vaccine و واکسنهای ژنتیکی Genetic Vaccin برای واکسنهای نسل سوم ذکر شده است ولی کمیته تخصصی واکسنهای سازمان جهانی بهداشت نام واکسنهای اسید هسته ای NAV) Nucleic Acid Vaccines) را که هردو گروه واکسنهای DNA , RNA را شامل می شود برای آن برگزیده است . بیشترین واکسنهای تحقیق شده در این زمینه با استفاده از DNA بوده است و بهمین دلیل DNA Vaccine کاربرد بیشتری دارد .

تاریخچه واکسنهای ژنی :

تاریخچه تحولاتی که منجربه کشف واکسنهای نسل سوم گردید عمری نسبتا کوتاه دارد و بر پایه کشفیات علم ژنتیک ملکولی، ایمنی شناسی ملکولی ، بیوشیمی و میکروب شناسی استوار گردیده است .
در سال ۱۹۶۲ اتاناسیو با تزریق DNA خالص ویروس Polyoma به روش تحت جلدی به حیوان آزمایشگاهی ، مشخص کرد ژنها در داخل بدن حیوان القاء شده و سیستم ایمنی پادتن های ضد پیکره ویروس را تولید می کنند . این تجربه نشان داد که DNA خالص در بدن میتواند ترجمه شده و پروتئین های مربوطه را تولید کند.
در دهه ۱۹۷۰ میلادی پس از اولین کشفیات مهندسی ژنتیک و امکان بکارگیری روشهای ملکولی جهت ژن درمانی محققین مشاهده کردند که پروتئین حاصل از ژن انتقال یافته بدرون سلولها بدلایل نامعلومی بتدریج حذف می گردد . مطالعات بعدی نشان داد که واکنش ایمنی علیه این پروتئینها عامل اصلی این پدیده است . عده ای از محققینی تلاش کردند تا از این واکنش نا خواسته سیستم ایمنی استفاده های مناسبی در زمینه درمان و یا پیشگیری ابداع کنند اما اینکه واکنش ایمنی علیه محصول پروتئینی ژنهای تزریقی به بدن بتواند سبب حفاظت بدن در برابر عوامل عفونی باشد تردید وجود داشت.
در سال ۱۹۸۲ Darai و Schaller با تزریق ژنوم ویروس هپاتیت B به شامپانزه ابتلا حیوانات به هپاتیت را مشاهده نمود که نشاندهنده القاء ژنها در داخل سلول و تشکیل ویروس کامل می باشد.
در سال ۱۹۸۴ Dubensky و همکارانش به بررسی انتقال ژنوم ویروس پلیوما polyoma و همچنین پلاسمید حاوی ژنهای این ویروس به سلولهای کبد و طحال موش نوزاد و بالغ پرداختند . آنان با تزریق مستقیم DNA خالص و یا همراه با آنزیمهای هیالورونیداز و کولاژناز به بررسی فعالیت ژنهای این ویروس پرداختند.



ADN
HAUTEMENT POLYMERISE
BIOSTABILEX

solution injectable IM

acide désoxyribonucléique sel de sodium

Properties: High molecular weight polynucleotides whose immunorestorative activity has been demonstrated by pharmacological and clinical studies.

Composition: ampoule of 125 mg DNA per 5 ml saline, box of 6 ampoules
Treatment: 5-10 ml per day in one or two injections
Indications: leukopenia, slow wound healing, vascular ulcers, necroses, post X-ray complications

شکل : استفاده درمانی از محلول DNA

در سال ۱۹۹۰ فلگنر و همکارانش با تزریق پلاسمید به داخل بافت عضله بدون استفاده از هی چگونه سلول میزبان (ژن خالص یا (Naked DNA) نشان دادند که پلاسمید میتواند بداخل سلول ماهیچه وارد و ترجمه شود . در همین سال وولف و همکارانش مشاهده نمودند که تزریق داخل عضلانی پلاسمید خالص حاوی ژن رمز کننده بتاگالاکتوزیداز سبب القا ژن و تولید انزیم فعال می گردد. بدنبال آن جانسون و همکارانش با استفاده از نوعی وسیله انتقال ذرات طلای پوشیده شده با DNA به سلولهای بافتی (تفنگ ژنی) توانستد حیوانات را با DNA ایمن سازند.

در سال ۱۹۹۱ با استفاده از تفنگ ژنی ، DNAرمز کننده ژن هورمون رشد انسانی را به موش تزریق کردند که سبب تولید پادتن کافی ضد ان گردید .

در پی این تحقیقات گروه دیگری به سرپرستی اولمر در مرکز تحقیقات واکسنهای شرکت مرک توانستند با استفاده از واکسن ژنی حاوی ژن رمز کننده پروتئین سطحی ویروس آنفلوانزای A ، ایجاد ایمنی سلولی و همورال بر علیه ویروس را نمایش دهند. یافته ارزشمند دیگر این تحقیق، مشاهده ایمنی متقاطع بر علیه سویه ای غیر از سویه ایست که واکسن بر علیه آن تهیه شده بود که با توجه به تنوع پادگنی در ویروس آنفلوانزا، این یافته بسیار با ارزش می باشد (زیرا تنوع و تغییر پادگنی در ویروس آنفلوانزا امکان تهیه وا کسنی که بتواند برعلیه سویه های مختلف ایمنی ایجاد نماید را مشکل ساخته است).

مجموعه دستاوردهای حاصل از این نوع تحقیقات نشان داد که واکسن ژنی می تواند سبب تحریک مناسب سیستم ایمنی شود بنابر این ایده واکسنهای نسل سوم بتدریج گسترش یافت و اهمیت پیدا کرد.

عوامل اساسی اهمیت واکسنهای ژنی :

دو کشف اساسی در بررسی واکسنهای ژنی به عنوان انقلابی در عرصه ساخت واکسنها مطرح شده و بهمین دلیل بشدت مورد توجه مراکز تحقیقاتی و صنایع واکسن سازی قرار گرفته است:

۱- ایمنی زا بودن و حفاظت در مقابل عفونت
۲- القاء هردو سیستم ایمنی خونی و سلولی .

ساختار پلاسمید واکسن ژنی :

منشاء پلاسمیدهایی که در واکسنهای ژنی کاربرد دارند اغلب از پلاسمیدهای جداشده از E. Coli است که قادر به القاء ژن در سلولهای یوکاریوتی هستند و واجد تمام ساختار های مورد نیاز ترجمه درون سلولی می باشند که بطور کلی آنها را به دو گروه می توان تقسیم نمود :

الف - مجموعه ترجمه که وظیفه ترجمه ژن مربوطه را بعهده دارد و شامل منطقه پیشبرنده و بهینه سازی ، ردیف ژن رمز کننده پروتئین مورد نظر و سیگنال مورد نیاز جهت پلی ادنیله کردن واحد ترجمه شده می باشد .

ب - بخشهای پروکاریوتی شامل : منطقه تقسیم پلاسمید مانند منشا ء شروع تقسیم ، جایگاه کلونینگ واجد ردیفهای برش آنزیم های محدود کننده مختلف و مارکر مانند مقاومت آنتی بیوتیکی و ردیفهای ساختمانی از پلاسمید اولیه . این پلاسمیدها واجد ردیفهای تحریک کننده سیستم ایمنی جهت افزایش کارایی واکسن ژنی نیز هستند .

۱- پیش برنده (پروموتر)

پیش برنده های بسیاری از ویروسهای مختلف مانند اپشتاین بار EBV، روزسارکوما ویروس RSV، ویروس لوسمی موشی murine leukemia virus (SL3-3) ، سایتو مگال ویروس CMV ، Simian Virus 40 (SV40) و همچنین پیش برنده ویروس تومور ی موش mouse mammary tumor virus (MMTV) در ساختمان پلاسمید واکسن ژنی استفاده می شود .علاوه بر پیش برنده های ویروسی، پیش برنده ژنهای انسانی مانند میوزین ، هموگلوبین، کراتین سلولهای عضلانی، و متالوتیونین جهت افزایش میزان القا ء ژن در درون سلولها مطالعه شده است . پس از بررسیهای بسیار در مورد کارایی این پیش برنده ها مشخص شده است که پیش برنده CMV بهترین القاء را در رده های سلولی و بافتهای مختلف دارد ودر حال حاضر در تحقیقات واکسنهای ژنی و ازمایشات بروی انسان نیز از ان استفاده میشود. البته گزارشاتی در زمینه برتری پیش برنده ژن پادگن سازگار نسجی گاوی نسبت به پیش برنده CMV وجود دارد درحالیکه بیشترین تحقیقات نشاندهنده مزایای پیش برنده CMV می باشد و اغلب پلاسمیدهای تجاری و صنعتی که در امر تحقیقات و آزمایشات کلینیکی واکسنهای ژنی استفاده می شوند واجد این پیش برنده است .

در بررسی پیش برنده های غیر ویروسی مانند پروموتر ژن دسمین انسان desmin ، بتا اکتین ، کراتینین سلولهای عضلانی ، و زنجیره سنگین میوزین عضله در ساختمان واکسن ژنی هپاتیت B هیچگونه افزایشی در پاسخ ایمنی در مقایسه با پیش برنده های ویروسی حتی با تجویز مقدار بسیا ر اندک ۱۰ میکرو گرم واکسن ژنی دیده نمی شود و تجویز واکسن ژنی حاوی پیش برنده انسانی یا پیش برنده ویروس سایتو مگال سبب القاء پاسخ ایمنی مناسب سلولی و خونی می گردد .

امکان استفاده از پیش برنده های القا ء شونده توسط مواد شیمیایی وجود دارد مانند پروموترهای ژن وابسته به تتراسیکلین tetracycline dependent transcriptions که در حضور این انتی بیوتیک فعال یا غیر فعال می شود که این امر بستگی به جهت و جایگاه ردیف هدایت کننده اپراتور ژن تتراسیکلین tetracycline-operator (tetO) control sequence دارد . از این نوع پیش برنده های قابل کنترل می توان جهت پیشگیری از بروز احتمالی القاء بیش از حد پروتئیین مورد نظر و بروز تولرانس استفاده نمود

۲- اینترون

ردیفهای رمز کننده ژنهای سلولهای عالی اگزون نامیده می شوند ولیکن اینترونها ردیفهای غیر رمز کننده هستند که در بین اگزونها قرار دارند و مشخص شده است که حضور آنها در القا ء مناسب ژن درواکسن ژنی نقش مفیدی ایفا می کند . اغلب پلاسمیدهای طراحی شده برای واکسنهای ژنی حاوی بخشهایی از اینترون A ویروس سایتومگال است و مقایسه پلاسمیدهای حاوی اینترون در بالادست ژن مورد نظر و بدون آن نقش افزاینده القاء این ردیفها را مشخص نموده است

poly-adenylation - ۳

این ردیف ژنی سبب افزایش میزان ، پایداری RNA پیک و تر جمه آن می شود . در پلاسمیدهای واکسن ژنی این ردیفها از ژنهای مختلفی استفاده می شود . بررسی انواع پلی A از منشاء های مختلف مشخص نموده است که اولا حضوراین ردیف جهت القاء مناسب ژن ضروری است و ثانیا استفاده از بخش پلی A ژن رمز کننده هورمون رشد گاوی (bGH)در مقایسه با ردیفهای ویروس SV40 و کلاژن انسانی تا سه برابر بیشتر سبب القا ء ژن مورد نظر می شود که در نتیجه افزایش میزانRNA پیام رسان به مقدار ۳ برابر بوده است .

با توجه به شناسایی ارزش پلی A هورمون رشد گاوی ، در اغلب پلاسمیدهای واکسنهای ژنی از این ردیف استفاده می شود بعنوان مثال پلاسمیدهای pcDNA3 و VR1012 واجد این ردیف از ژن هورمون رشد گاوی است در حالیکه در پلاسمید pcDNAI و nkCMVintBL از ردیف پلی ادنیله ویروس SV40 استفاده می شود .این ردیف در پلاسمیدها پس از جایگاه کلونینگ قرار می گیرد بنحوی که پس از کلون کردن ژن ، در پشت سر ژن واقع شده وسبب افزایش پایداری و ترجمه RNA آن می شود.

۴- ژن رمز کننده آنتی ژن مورد نظر

انتخاب انتی ژن مناسب جهت القاء مناسب واکنش ایمنی و ایجاد حفاظت قوی و پایدار از اهمیت بسزایی برخوردار است . در مورد آنتی ژنهای شناخته شده ای مانند پادگن سطحی هپاتیت B ، پروتئین داخلی هپاتیت C ، نوکلئو پروتئین ویروس انفلوانزا که واکنش ایمنی مناسبی را نشان داده اند تحقیقات بسیار و ارزشمندی ص ورت گرفته و واکسنهای مفیدی نیز تهیه شده است . در مورد سایر واکسنهای موجود مانند واکسن سل که از میکروب زنده استفاده می شود تحقیقات جهت شناسایی پادگن مناسب ادامه دارد .

ردیف رمز کننده آنتی ژنی باید واجد رمز آغازگر ATG بوده بنحوی که سبب ایجاد زنجیره صحیح اسید های امینه پروتئین مورد نظر شود . در عین حال حضور ردیفهای موسوم به کوزاک نیز که در حوالی آغاز mRNAژنهای پستانداران شناسایی شده است (GCCGCCA/GCCAUGG) در افزایش پایداری و القا ء ژن مفید است و بهتر است در طراحی پلاسمید واکسن ژنی مد نظر باشد .

بهتر است انتی ژ نی انتخاب شود که بیشترین اشتراک پادگنی در بین سویه های مختلف را داشته و دارای حداقل تنوع پادگنی Antigenic Variation باشد .

استفاده از بخشی از ردیف اسیدهای امینه یک انتی ژن که دارای اپی توپهای اصلی جهت تحریک ایمنی است جهت طراحی واکسنهای ژنی اپی توپی یا مینی ژن minigene نیز می تواند سبب اختصاصی شدن واکنش ایمنی گردد . استفاده از سایر ژنهای افزاینده ویا محرک سیستم ایمنی بعنوان همراه در کنار ژن رمز کننده آنتی ژن مورد نظر می تواند سبب افزایش پاسخ ایمنی شود که در بخش عوامل افزاینده بدان خواهیم پرداخت .

استفاده از واکسن مینی ژن حاوی اپی توپهای خاصی از ویروس هرپس در موش آزمایشگاهی سبب واکنش ایمنی سلولی مشابه الوده شدن با ویروس فعال شده ولیکن مقدار تولید انتی بادی قابل ملاحظه نیست اما ایمنی ایجاد شده بر علیه ویروس بسیار قابل توجه است اگرچه باندازه ویروس زنده نیست . واکسنهای ژنی روش بسیار مناسبی جهت شناسایی سریع آنتی ژنهای کشف نشده و بررسی ایمنی زایی آنهاست بدون آنکه نیاز به شناختن ردیف ژن و یا استخراج پروتئین نوترکیب آن باشد .

۵- سایر ساختارها:

جایگاههای چندگانه کلونینگ، که سبب سهولت پیوند نمودن ژنهای مورد نظر در محل مشخص است علاوه بر آن این

جایگاهها بنحوی طراحی شده اند که مانع تشکیل شکل موسوم به سنجاق سر hairpin structures در انتهای ۵ ' RNA می شود که در ترجمه مشکلاتی را ایجاد می کند .

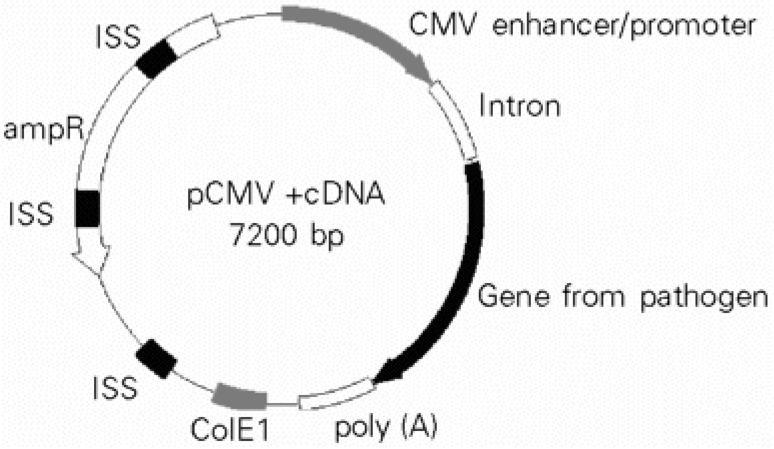
منشاء همانند سازی (origin of replication) که نقش مهمی در تعداد تکثیر پلا سمید در داخل باکتری دارد و منشاء ان از (ColE1) متعلق به باکتری E. coli استفاده می شود که قادر است بیش از ۲۰ رونوشت از پلاسمید را در هر باکتری E. Coli تولید کند که سبب افزایش میزان پلاسمید نهایی در هنگام تولید واکسن ژنی می شود .

البته می توان از منشا ء تقسیم ویروسهایی مانند SV40 نیز استفاده نمود که در وکتور nkCMVintBL از این نوع استفاده شده است . با توجه به اینکه در کاربرد کلینیکی واکسنهای ژنی نیازی به تکثیر پلاسمید در داخل سلولهای بدن وجود ندارد این ردیفها قبل از کاربرد از پلاسمید حذف می شود تا اولا ازتولید بیش از نیازانتی ژن جلوگیری شود ودر ضمن ازنظر ایمنی هر گونه احتمال الحاق به ژنوم میزبان پیشگیری شود .

نشانگرها یا مارکر، از بخشهای مهم یک پلاسمید واکسن ژنی است زیرا بکمک آن میتوان اقدام به جدا سازی و شناسایی باکتریهای واجد پلاسمید مورد نظر از بین س ایر پلاسمیدها نمود . این مارکرها کلا دو نوع هستند مقاومت دارویی یا اگزوتروف . auxotrophic

نشانگرهای مقاومت دارویی مانند ژن رمز کننده مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین یا نئومایسین می باشد . البته در آزمایشات کلینیکی نمی توان از مارکر امپی سیلین استفاده نمود.

مارکر های اگزو تروف سبب می شود که سلول واجد این پلاسمید بتواند ماده ای را تولید کند (معمولا اسید امینه خاص) که در محیط کشت وجود ندارد و بدون آن سلول قابل رشد نیست . بنابر این فقط سلولهایی در این محیط کشت خاص رشد خواهند کرد که پلاسمید فوق را داشته باشند .



شکل : ساختار عمومی پلاسمید مورد استفاده در واکسنهای ژنی . واحد ترجمه پلاسمید ژنی حاوی پیش برنده (پروموتر) ، اینترون ، ژن رمز کننده پروتئین مربوطه و سکانس پلی آدنیله مربوط به آن poly-adenylation (A) ، و سکانسهای ساختمانی پلاسمید مانند منشاء تقسیم پرکاریوتی و مارکر آنتی بیوتیکی میباشد .

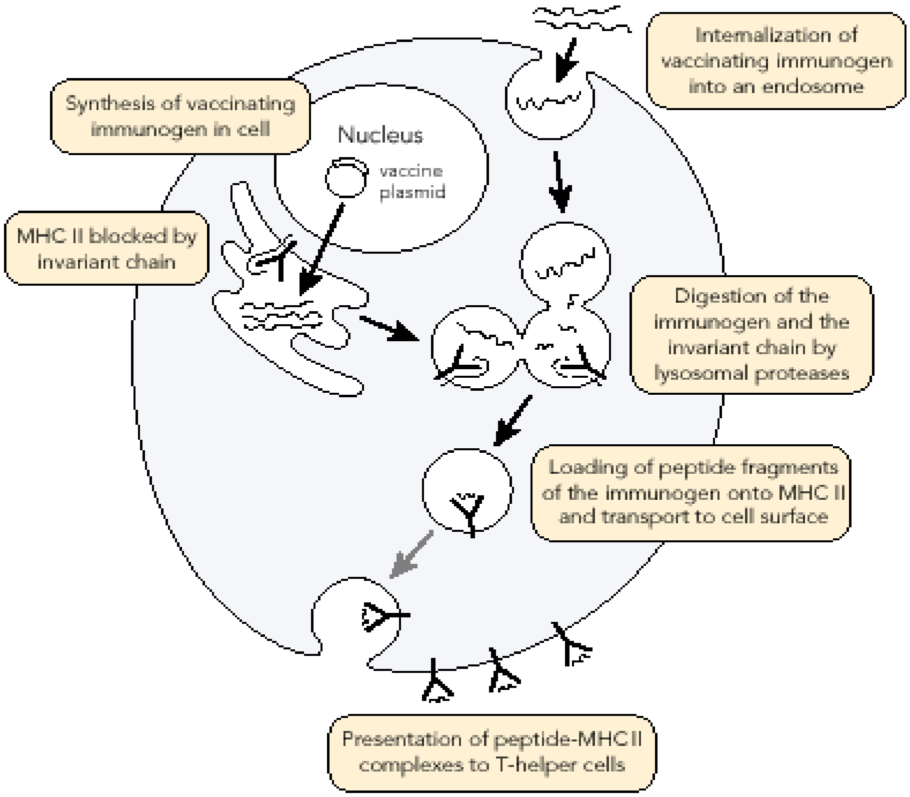
با توجه باینکه حضور ژنهای میکروبی مانند ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی در پلاسمیدهای واکسن ژنی می تواند سبب کاهش القا ژن مورد نظر وتولید پروتئین های غیر ضروری و در نتیجه عوارض جانبی شود . از سوی دیگر وجود ردیفهای DNA ساختمانی در ساختار پلاسمید واکسن ژنی سبب گردید که Darquet و همکارانش پلاسمید بسیار کوچکی را با حذف این ردیفها تهیه نمایند . این پلاسمید که صرفا واجد بخشهای ض روری جهت القا ژن مورد نظر است

Minicircle نام دارد . این پلاسمید های کوچک با استفاده از نوترکیبی ایتگراز فاژ لامبدا در باکتری E. Coli تهیه شده که واجد پروموتر سلولی مناسب متصل به ژنهای attP و attB پیوند شده به پلاسمید است . بررسی این پلاسمیدها در رده های مختلف سلولی فعالیت القاء لوسیفراز معادل ۲ تا ۱۰ برابر پلاسمیدهای عادی واکسن ژنی را نشان داده است که می تواند در نتیجه حذف ردیفهای غیر ضروری یا افزایش ورود پلاسمید به سلولها بدلیل کوچکی آن باشد.

چگونگی عمل واکسنهای ژنی :

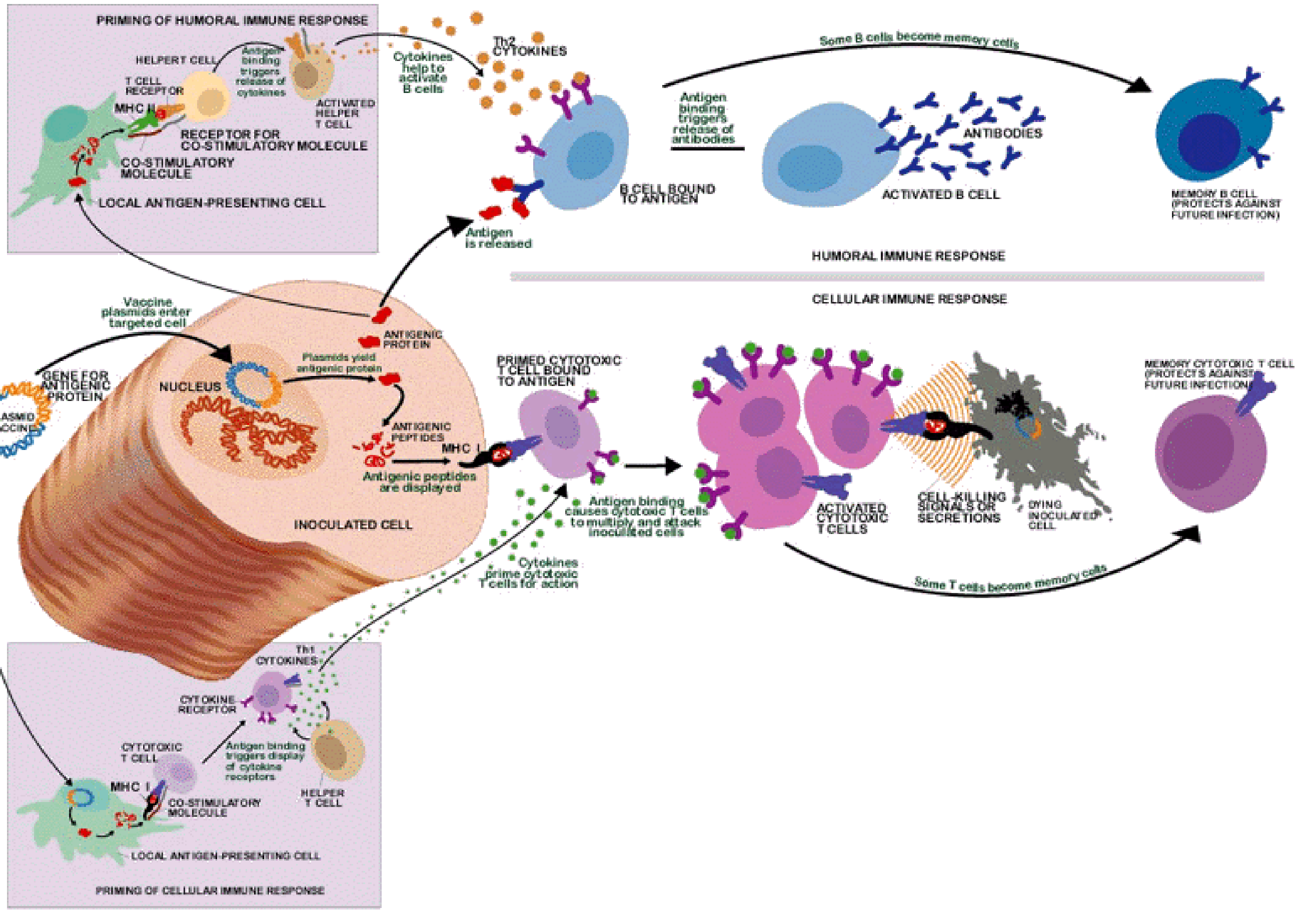
بطور کلی پادگنها بر اساس نحوه ارائه به سیستم ایمنی دو مسیر را طی می کنند:

۱ - **پادگنهای خارج سلولی** : (میکروبهای خارج سلولی و پادگنهای ترشحی آنها در فضای خارج سلول، تزریق پادگن به عنوان واکسن کشته یا پروتئینهای نوترکیب) توسط سلولهای خاص ارائه دهنده سیستم ایمنی (APC) Antigen Presenting Cells جمع آوری شده و در داخل سلول توسط آنزیم های پروتئازی به پپتیدهای کوچک شکسته و پس از اتصال با کلاس ۲ پادگنهای سازگاری نسجی (MHC II) به سطح سلولهای APC عرضه می شود. این مجموعه توسط سلولهای لنفوسیت (CD4+) T-helper شناسایی می شوند که با ترشح انواع سایتوکاین ها در نهایت سبب تحریک سایر سلولهای سیستم ایمنی مانند لنفوسیتهای B ، تحریک سیستم ایمنی خونی و تولید انتی بادی می شود . بهمین دلیل واکسنهای کشته و یا واکسنهای نوترکیب قادر به تحریک مناسب سیستم ایمنی سلولی نمی باشند .



Internalization of vaccinating immunogen into an endosome
Synthesis of vaccinating immunogen in cell
Nucleus
vaccine plasmid
MHC II blocked by invariant chain
Digestion of the immunogen and the invariant chain by lysosomal proteases
Loading of peptide fragments of the immunogen onto MHC II and transport to cell surface
Presentation of peptide-MHC II complexes to T-helper cells

پادگنهای داخل سلولی : (میکروب های داخل سلولی و یا تولید پادگنها در داخل سلول مانند واکسن ژنی) پروتئین در داخل سلول توسط سیستم پروتئازوم Proteasome بهقطعات کوچک شکسته می شوند و پس از انتقال به شبکه رتیکلوم اندو پلاسمیک توسط انتقال دهنده (TAP transporter) TAP این پپتیدهای کوچک همراه با کلاس یک پادگنهای سازگاری نسجی (MHC) و یک پروتئین دیگر به نام بتا-۲- میکروگلوبولین به سطح سلول عرضه می شوند و مجموعه پپتید و MHC I قادر هستند که سلولهای لنفوسیت T کشنده (Cytotoxic T cell) رده CD8 + را فعال کنند که در نهایت سبب تحریک سیستم ایمنی سلولی و مرگ سلول حاوی میکروب پا پادگن می شود .


PRIMING OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE
HELPERT CELL
T CELL RECEPTOR
MHC II
Antigen binding triggers release of cytokines
ACTIVATED HELPER T CELL
RECEPTOR FOR CO-STIMULATORY MOLECULE
CO-STIMULATORY MOLECULE
LOCAL ANTIGEN-PRESENTING CELL
Cytokines help to activate B cells
Th2 CYTOKINES
B CELL BOUND TO ANTIGEN
Antigen is released
Some B cells become memory cells
Antigen binding triggers release of antibodies
ANTIBODIES
ACTIVATED B CELL
MEMORY B CELL (PROTECTS AGAINST FUTURE INFECTION)
HUMORAL IMMUNE RESPONSE
CELLULAR IMMUNE RESPONSE
Vaccine plasmids enter targeted cell
GENE FOR ANTIGENIC PROTEIN
PLASMID VACCINE
NUCLEUS
Plasmids yield antigenic protein
ANTIGENIC PROTEIN
ANTIGENIC PEPTIDES
MHC I
Antigenic peptides are displayed
INOCULATED CELL
PRIMED CYTOTOXIC T CELL BOUND TO ANTIGEN
Antigen binding causes cytotoxic T cells to multiply and attack inoculated cells
Cytokines prime cytotoxic T cells for action
ACTIVATED CYTOTOXIC T CELLS
CELL-KILLING SIGNALS OR SECRETIONS
DYING INOCULATED CELL
MEMORY CYTOTOXIC T CELL (PROTECTS AGAINST FUTURE INFECTION)
Some T cells become memory cells
Th1 CYTOKINES
CYTOKINE RECEPTOR
CYTOTOXIC T CELL
Antigen binding triggers display of cytokine receptors
MHC I
CO-STIMULATORY MOLECULE
HELPER T CELL
LOCAL ANTIGEN-PRESENTING CELL
PRIMING OF CELLULAR IMMUNE RESPONSE

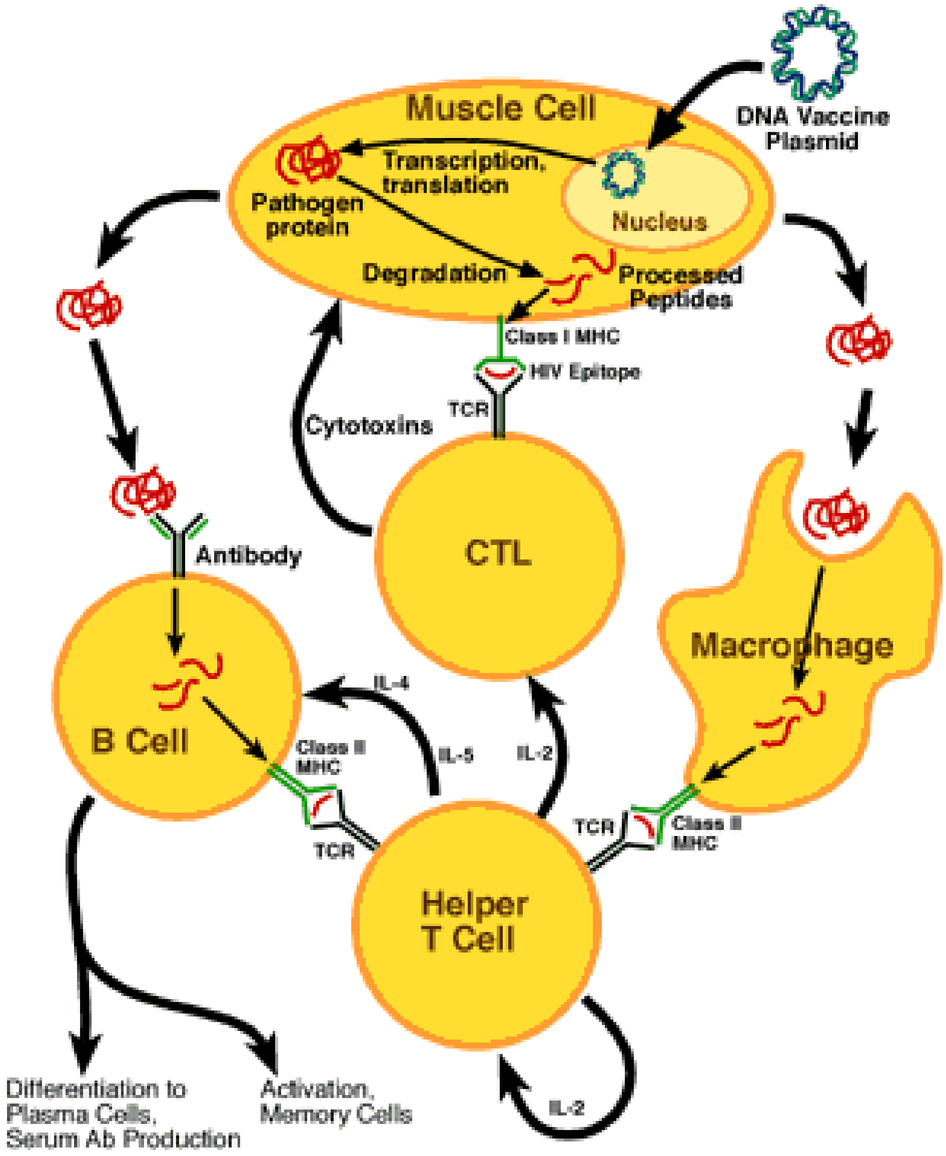
شکل -۱ نمودار روشهای مختلف ارائه پادگن به سیستم ایمنی و روش القاء سیستم ایمنی سلولی و خونی توسط واکسنهای ژنی

با تزریق داخل عظلانی واکسن ژنی ورودپلاسمید حاوی ژن رمز کننده بداخل سلولهای عضلانی وارد می گردد با القائ ژن و تولید انتی ژن این سلولها بعنوان محل تجمع انتی ژن تولید شده و ازاد سازی ان جهت قرار گرفتن در اختیار سلولهای ابراز کننده دهنده پادگن (antigen-presenting cells) که از سلولهای اساسی ساختمان ایمنی هستند عمل می کند . در عین حال پلاسمیدها می توانند مستقیما وارد تعدادی از سلولهای دندرتیک یا کراتینوسایتها (در صورت تجویز داخل جلدی) شوند. با ارائه پادگن در دو مسیر مختلف سیستمهای ایمنی سلولی هومورال و سلولی شامل

تولید سلولهای اختصاصی CD8+ ایمنی سلولی و همچنین سلولهای CD4+ می باشد.
بنابر این بدلیل تولید درون سلولی پروتئین و ارائه ان به شکل طبیعی به سیستم ایمنی واکسنهای ژنی قادر به تحریک هر دو سیستم ایمنی خونی و سلولی هستند . اهمیت این یافته که واکسن ژنی شبیه واکسنهای ویروسی ضعیف شده که بهترین نوع واکسنها هستند عمل می کند در این است که یکبار تزریق واکسن ژنی می تواند ایمنی پایداری ایجاد نماید، در ضمن القاء حافظه ایمنی سلولی در سلولهای T کشنده سبب می شود که سلولهای آلوده به عامل عفونی نیز نابود شوند در حالیکه تحریک خونی به تنهایی قادر به این عمل نیست.

کشف این فرایند در واکسنهای ژنی کاربردهای گسترده ای علاوه بر ایمن سازی بر علیه عوامل عفونی، امکان درمان بیماریهای خود ایمنی، درمان آلرژی ، سرطان و ژن درمانی را بطور جدی مطرح ساخته است .

اشاره گردید که واکسنهای ویروسی ضعیف شده بهترین مشابه واکسنهای ژنی هستند که با ورود به داخل سلول به تولید پروتئینهای خود می پردازند و بهمین دلیل واکسنهای ژنی یکی از بهترین نوع واکسنها بر علیه عفونتهای ویروسی خواهند بود. با توجه به تفاوت فرایندهای ساخت پروتئین در باکتریها وانگلها که اقدام به ساخت پروتئین در درون پیکره خود می نمایند، بنظر می رسید که واکسنهای ژنی قادر به ایجاد ایمنی مناسب بر علیه آنان نباشند ولیکن بررسی واکسنهای ژنی ضد عوامل باکتریال و انگلی بطور حیرت انگیزی پاسخهای بسیار مناسب را در تحریک ایمنی و حفاظت در مقابل عفونت ایجاد نموده است . در مورد عوامل انگلی که دارای چرخه هایی در طی تکامل خود در بدن هستند و بافتهای مختلفی مانند خون و کبد را مورد تهاجم قرار می دهند و در هر مرحله پادگنهای مختلفی ترشح می شود نیز میتوان از ترکیبی از واکسنهای ژنی واجد ژنهای مراحل مختلف تکاملی انگل استفاده کرد.


DNA Vaccine
Plasmid
Muscle Cell
Transcription,
translation
Pathogen
protein
Nucleus
Degradation
Processed
Peptides
Class I MHC
HIV Epitope
TCR
Cytotoxins
CTL
Antibody
B Cell
Macrophage
IL-4
IL-5
IL-2
Class II
MHC
TCR
TCR
Class II
MHC
Helper
T Cell
IL-2
Differentiation to
Plasma Cells,
Serum Ab Production
Activation,
Memory Cells

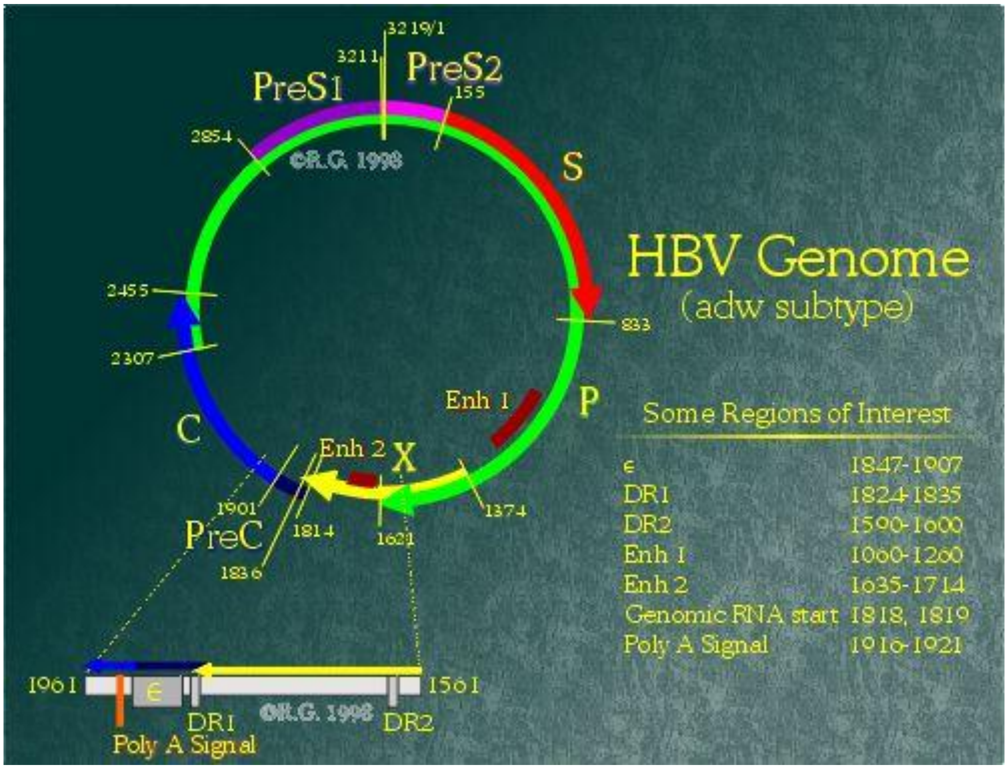
شکل مراحل مختلف پاسخ ایمنی در نتیجه تجویز داخل عضلانی واکسن ژنی .
با ورود پلاسمید به داخل سلول و طی مراحل ترجمه پروتئین پادگن مورد نظر تولید و وارد مرحله القا ایمنی می شود.

واکسن ژنی ه پاتیت B

واکسن نوترکیب هپاتیتB اولین واکسن تهیه شده بروش مهندسی ژنتیک است که به تایید مراکز معتبر جهانی رسیده و از سال ۱۹۸۱ کاربرد گسترده ای در جهان داشته به نحوی که بطور موفقیت امیزی در کنترل این بیماری ویروسی ایفا نموده است ، این واکسن با کلون نمودن ژن رمز کننده پادگن سطحی ویروس هپاتیت یا Ag−HBs در وکتور القا کننده و وارد نمودن ان به مخمر تولید انبوه گردیده و پس از مراحل استخراج و بهینه سازی مورد استفاده قرار می گیرد.

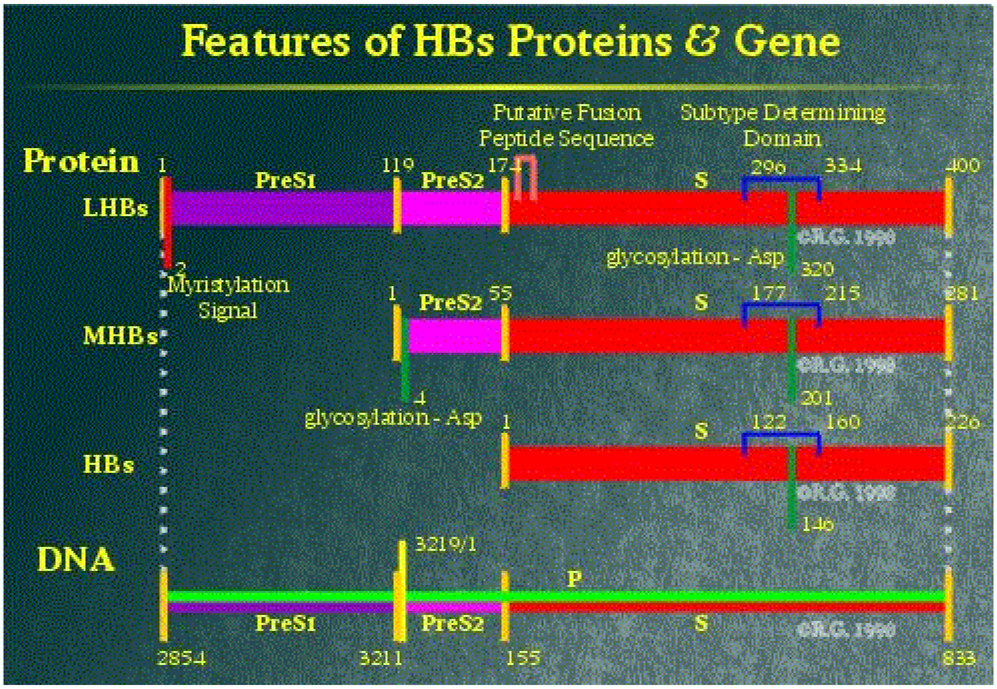
با توجه به موفقیت این واکسن یکی از بهترین مدلهایی که در زمینه واکسنهای ژنی بطور گشترده ای مورد تحقیق قرار گرفت مدل واکسن ژنی هپاتیت Bبوده است که بدلیل ورود این واکسن به مراحل کلینیکی و نتایج موفقیت امیز ان در

انسان اهمیت و ارزش واکسنهای ژنی را مشخص نموده است . پلاسمید مورد استفاده دراین مطالعات بسیار شبیه حامل ژنتیکی است که برای تولید واکسن نوترکیب بکارمیرود با این تفاوت که این حامل قادر است مستقیما در سلولهای عضلانی (محل تزریق واکسن) وارد شده و بترجمه ژن در داخل بدن پادگن سطحی هپاتیت B را تولید نماید همچنان که اشاره شد .از خصوصیات این حامل ژنتیکی اینست که دارای پیش برنده قوی ویروس سایتومگال است که امکان القائ ژن در درون سلولهای انسانی و جانورای را فراهم می سازد.


HBV Genome
(adw subtype)
PreS1
PreS2
S
P
X
C
PreC
Enh 1
Enh 2
3219/1
3211
155
2854
833
2455
2307
1374
1901
1814
1621
1836
©R.G. 1998
Some Regions of Interest
ϵ 1847-1907
DR1 1824-1835
DR2 1590-1600
Enh 1 1060-1260
Enh 2 1635-1714
Genomic RNA start 1818, 1819
Poly A Signal 1916-1921
1961
1561
ϵ
DR1
DR2
Poly A Signal

وجود این پیشبرنده در ساختمان حامل ژنتیکی واکسن ژنی سبب می شود که ژن رمز کننده HBs-Ag در داخل سلولهای محل تزریق ترجمه شود و حاصل این عمل تولید مقادیر کافی پادگن میباشد. بررسی این واکسن در حیوانات بزرگتر مانند خوک و میمون نیز نشان داده است که توان ایمن سازی کامل بر علیه عفونت را دارد . میزان ایمنی ایجاد شده از طریق واکسنهای ژنی در مقایسه با واکسن پروتئینی نوترکیب بسیار قوی است وسبب ایمنی پایداری میگردد.

علاوه بر پیش برنده که نقش مهمی در ساختمان این وکتورها دارد از عوامل دیگری جهت افزایش کارایی واکسن استفاده می شود که از جمله آنها SV40 polyadenylation signal است.


Features of HBs Proteins & Gene
Putative Fusion Peptide Sequence
Subtype Determining Domain
Protein
LHBs
1
PreS1
119
PreS2
174
S
296
334
400
glycosylation - Asp
320
2
Myristylation Signal
MHBs
1
PreS2
55
S
177
215
281
201
4
glycosylation - Asp
HBs
1
S
122
160
226
146
DNA
3219/1
P
PreS1
PreS2
S
2854
3211
155
833
©R.G. 1990

در یک تجربه مشخص شده است که فقط با یک بار تزریق ۱۰۰ میکروگرم از این واکسن ژنی به موش نوزاد، بدون تزریق یاد آورهای بعدی ، سطح ایمنی تا ۷۴ هفته پایدار میماند .اولین واکنش ایمنی و حضور پادتن ۱۴ روز پس از تجویز واکسن ژنی مشاهده میشو د . با تجویز یاداور های دوم و سوم بفواصل مناسب میتوان میزان ایمنی را بین ۱۰ تا ۲۰۰ برابر افزایش داد و زمان پایداری ایمنی را نیز طولانی تر نمود. این بررسی نشان میدهد که یک بار تجویز واکسن ژنی ضد هیاتیت ب واکنش ایمنی قوی تر و پایدارتری در مقایسه با واکسن پر وتئینی نوترکیب هپاتیت B ایجاد میکند.. مقایسه ایمنی زایی این واکسن در شامپانزه با سایر واکسنهای موجود نشان داده که تزریق عضلانی ۲ میلی گرم از ان سبب تولید بیش از (۱۰۰ mIU/ml) پادتن در میلی لیتر شده و پس از ۴ بار تزریق این میزان به ۱۴۰۰۰ واحد رسیده است . پادتن ابتدایی از نوع IgM و سپس IgG و غالبا IGg1 میباشد که نشاندهنده فعال شدن لنفوسیتهای کمکی T است. مقایسه این نتایج با ازمایش این واکسن بروی ۲۳ شامپانزه که با انواع مختلف پادگنهای هپاتیت B ایمن شده بودند نشان داده که واکسن ژنی ضد هپاتیت میتواند روشی منا سب برای پیشگیری از این بیماری باشد . بالاترین میزان پادتنهای IgG 4 تا ۸ هفته پس از یک تجویز واکسن بوده و تا ۶ ماه بدون هیچ یاد اوری در این حد باقی میماند . و بدیهی است تجویز یاداورهای یعدی سبب افزایش پاسخ ایمنی و طول زمان ابقای ایمنی می شود .

در تحقیق د یگری جهت مقایسه ایمنی سلولی و هومورال واکسن ژنی و واکسن نوترکیب ، روشهای مختلف تجویز واکسن بررسی گردیده است. مقدار ۱۰ یا ۱۰۰ میکروگرم واکسن ژنی و یا واکسن نوترکیب لیپوپروتئینی HBsAg به عضله سالم و یا آماده شده با محرکهای مختلف ، زیر جلدی، داخل صفاقی و د اخل وریدی تجویز و در زمانهای مختلف پاسخ ایمنی اندازه گیری گردیده است . نتایج مشخص می سازد که تجویز عضلانی و زیر جلدی واکسن ژنی بهترین پاسخ ایمنی سلولی و خونی را ایجاد می نماید در حالیکه واکسن نوترکیب در تمام روشهای تزریقی سبب ایمنی می گردد .

میزان القاء ژن هپاتیت B پس از تزریق عضلانی واکسن ژنی به میزان ورود پلاسمید به سلولهای عضلانی بستگی دارد . با توجه به تقسیم کند سلولهای عضلانی در سلولهای طبیعی میزان ورود پلاسمید کم است و در صورتی که با ایجاد التهاب و یا تزریق موادی که سبب افزایش تقسیم سلولی و یا افزایش انتقال DNA به سلولها می شوند میزان القا ء

افزایش می یابد . بررسی بافتهای عضلانی محل تزریق واکسن ژنی با انتی بادی اختصاصی ضد HBsAg حضور آنتی ژن، و فعالیت ماکروفاژها ، و لنفوسیتهای CD8 , +CD4+ را ۵ روز پس از تزریق نشان می دهد که نشانه فعالیت لنفوسیتهای سایتوتوکسیک بر علیه سلولهای عضلانی است که آنتی ژن HBsAg را تولید می کنند (این بررسی در موش C57BL/6 انجام شده که فاقد فعالیت CTL response است) . یک ماه پس از تزریق واکسن ژنی هیچگونه عارضه پاتولوژیک در بافت ماهیچه ای مورد تزریق وجود ندارد.

استفاده از یاور مناسب می تواند سبب افزایش پاسخ ایمنی و بخصوص تولید پادتنهای بیشتر شود . مشخص شده است که استفاده از کلسیم یا فسفات الومینیوم در واکسن ژنی هپاتیت B می تواند سبب افزایش ۱۰ تا ۱۰۰ برابر در تیتر پادتن می شود. علاوه بر آن افزایش در پادتن اختصاصی IgG2a نشاندهنده ه دایت پاسخ ایمنی بطرف Th1 است.

علت افزایش پادتن با استفاده از یاور فسفات الومینیوم بدلیل افزایش تولید پادگن HBsAg در داخل سلولها نیست بلکه بنظر می رسد که از طریق افزایش تعداد و قدرت اتصال پپتیدهای آنتی ژن به سلولهای خاص تولید کننده انتر فرون گاما و اینترلوکین ۲ صورت می گیرد .

بررسی همین واکسن بروی نوزاد شامپانزه تازه متولد شده و تجویز یادآور در ۶ و ۲۴ هفتگی سبب تولید پادتن کافی بر علیه پادگن سطحی هپاتیت B شده و در ۳۳ هفتگی تزریق ویروس عفونی هپاتیت B هیچگونه عفونتی را در آنان ایجاد نکرده است و بررسی حضور پادگن سطحی که نشانگر عفونت است نیز منفی بوده در حالی که در حیوانات شاهد پادگن وجود داشته است و در ضمن پادتن ضد پروتئین پوششی ویروس نیز در حیوانات شاهد وجود داشته در حالی که در حیوانات ایمن شده با واکسن ژنی مشاهده نشده است واین نشان دهنده ایمنی زایی مناسب و حفاظت دهنده این واکسن است.

نحوه تولید واکسن ژنی:

برای تولید واکسن ژنی کافیست حامل ژنتیکی حاوی ژن مورد نظر را به یک سلول میکروبی مانند E.coli منتقل و باکتری را به مقادیر لازم در محیط کشت تولید نمود، با رشد و تقسیم میکروبها حامل ژنتیکی (پلاسمید نوترکیب) نیز تولید میگردد. پس از تولید کافی، حامل ژنتیکی از سلولها استخراج شده و تصفیه میگردد که با حذف مواد غیر ضروری و ازمایشات کنترل کیفی در همین مرحله واکسن ژنی آماده استفاده است و نیازی به مراحل دیگر نیست.

واکسنهای ژنی انسانی در حال بررسی:

عرصه واکسنهای ژنی در چند سال گذشته چنان مورد توجه مراکز تحقیقاتی و صنایع واکسن سازی قرار گرفته است که تعداد طرحهای تحقیقاتی و مقالات منتشره در این زمینه مرتبا در حال افزایش می باشد و با توجه به خصوصیات و مزایای بسیار واکسنهای ژنی تحقیقات گسترده ای جهت تهیه واکسن ژنی بر علیه عوامل مختلف عفونی شامل باکتریها ، ویروسها و انگلها در حال انجام است که برخی در مراحل اولیه و تعدادی نیز به مراحل آزمایشات کلینیکی رسیده است که عبارتند از :

واکسنهای ژنی ضد عوامل عفونی ویروسی :

واکسن ژنی آنفلوانزای انسانی بر اساس نوکلئوپروتئین ویروس ، واکسن ژنی ضد ویروس پاپیلوما که با چند نوع سرطان بخصوص سرطان رحم ارتباط دارد ، واکسن ژنی ضد ویروس هرپس (واکسن حاوی ژنهای gB, gC, gD گلو) ایجاد ایمنی کامل می نماید همچنین ژن کوچک (Minigene) رمز کننده ۵۱ اسید امینه شامل ۳ اپی توپ ویروس هرپس و گلیکوپروتئین D سبب ایمنی بر علیه هرپس دستگاه تناسلی می شود .

تحقیقات بسیار گسترده ای جهت تهیه واکسن ژنی برای ویروس هپاتیت C (HCV) باستفاده از پادگنهای مختلف این ویروس انجام می گیرد . پروتئینهای(E2, E1 ، Cor و پروتئینهای غیر ساختمانی NS3, NS4 NS5 و

واکسنه‌ای دوگانه حاوی ژنهای ویروس هپاتیت B و C (HBV-HCV chimeras) مطالعه شده است .بررسی این واکسنها در مدلهای مختلف آزمایشگاهی سبب القاء پاسخهای ایمنی قوی خونی و سلولی گردیده است . استفاده از یاورهای ملکولی مانند GMCSF سبب افزایش القاء سیستم ایمنی می گردد . بررسی ایمنی زایی واکسن ژنی حاوی ژن رمز کننده پروتئین پوششی (Nucleocapsid, Core) این ویروس نشان داده است که تزریق داخل عضلانی این واکسن به موشهای آزمایشگاهی سبب واکنش قوی خونی و سلولی بر علیه ویروس گردیده است در حالی که تزریق پروتئین پوششی به تنهایی قادر به ت حریک سیستم ایمنی نبوده است . همچنین فعالیت اختصاصی سلولهای T سایتوتوکسیک بر علیه پپتیدهای پروتئین پوششی در موشهای ایمن شده با این واکسن تا ۱۴ ماه ادامه داشته و قادر بوده است بطور اختصاصی سلولهای هدف را از بین ببرد . ایمنی زایی این واکسن در میمون سبز افریقایی و شامپانزه نیز نشان داده است که پروتئین پوششی و بخشی از پروتئین E2 قدرت ایمنی زایی بسیار مناسبی دارد . با توجه باینکه نقش پیش برنده ها در میزان القای پروتئین و در نهایت پاسخ ایمنی اهمیت بسیاری دارد مشخص شده است که استفاده از پیش برنده Elongation factor 1 پاسخ سلولی بسیار قوی را حتی پس از یکبار تزریق بر علیه ویروس ایجاد می کند که می تواند سبب تهیه واکسن ژنی مناسب بر علیه هپاتیت C گردد . در این تحقیق با توجه به اینکه بیش از ۲۶ ژنوتیپ مختلف ویروس هپاتیت C شناسایی شده است تنوع پادگنی مانع اصلی در تهیه واکسن موتر بر علیه این ویروس گردیده است خوشبختانه پروتئین پوششی این ویروس درای ردیف ژنی مشابه در اغلب زیرگونه های این ویروس است بنابر این بهترین پروتئین جهت تهیه واکسن بر علیه این بیماری می باشد . ویروس هپاتیت Cیک ویروس داخل سلولی است که سیستم تکثیر سلولی را د ر اختیار گرفته و آنرا به کارخانه تولید ویروس تبدیل می سازد . سلولهای کبدی هدف تهاجم این ویروس هستند و تداوم این عفونت سبب بروز سیروز کبدی و در نهایت سرطان کبدی می شود که تنها راه درمان آن پیوند کبد می باشد. این ویروس از طریق انتقال خون و مواد تزریقی آلوده منتقل می شود.

واکسن ژنی ضد ویروس هپاتیت E حاوی ژن ساختمانی ایمنی بسیار قوی در حیوانات ازمایشگاهی ایجاد می نماید ، واکسن ژنی سرخجه با استفاده ازهماگلوتینین و نوکلئو پروتئین و پروتئینهای C, E2 and E1 و واکسنی شامل دو گلایکو پروتئینهای پوششی توانسته است وا کنش ایمنی مناسبی را ایجاد نماید . بررسی واکسن ژنی ضد ویروس هاری حاوی ژنG گلایکو پروتئین سطحی، بروی ۸ شامپانزه سبب ایمنی کامل هر ۸ حیوان بر علیه تزریق ویروس حاد هاری گردیده که نشان دهنده کارایی واکسن ژنی در مقایسه با واکسن موجود که ویروس ضعیف شده هاری اس ت می باشد. از نتایج ارزشمند دیگر این واکسن همانند سایر واکسنهای ژنی ویروسی ایجاد حفاظت بر علیه سویه های مختلف این ویروس در جهان است که امکان استفاده از این واکسن در سراسر جهان را فراهم می سازد . بررسی واکسن ژنی حاوی گلیکو پروتئین E2 ویروس varicella zoster سبب القاء ایمنی سلولی و خونی بر علیه ویروس گردیده است ، واکسن ژنی ضد سایتومگال ویروس با استفاده از گلایکو پروتئین . glycoprotein B (60) ویروس دنگو تایپ ۱ ، پوکس ویروسها ، روتا ویروس ، ، واکسن ژنی E2ویروس انسفالیت اسبی ونروئلا (VEE) حاوی ژن گلایکوپروتئین ، واکسن ژنی حاوی ژن رمز کننده کپسید ویروس کوکساکی Coxsackie virus سبب ۷۵٪ حفاظت بر علیه ویروس عفونی شده است ، واکسن ژنی ضد ویروس اوریون Mumps باستفاده از ژن رمز کننده پروتئین هماگلوتینین نورامینیداز .

واکسنهای ژنی ضد عوامل باکتریال:

واکسن ژنی ضد بیماری عفونی لایم بر اساس پادگن سطحی OspA . بررسی این واکسن در مقایسه با واکسن نوترکیب انسانی لایم که به تایید نیز رسیده است ایمنی قاطع بر علیه عفونت با عامل حاد را به اثبات رسانده است ، واکسن ژنی ضد سل با استفاده از انتی ژن ۸۵ کیلو دالتون ،Hsp65 و آنتی ژن phosphate transport receptors که موجب پاسخ سلولی و خونی شده است و همچنین آنتی ژن ۲۲ کیلودالتون ، واکسن ژنی ضد عامل تیفوئید یا حصبه (با

استفاده از ژن رمز کننده پروتئین غشاء خارجی (ompC) نشان داده است که واکنش مناسب ایمنی ایجاد میکند) وبا، کزاز(با استفاده از ژن رمز کننده بخش غیر سمی قطعه C توکسین باکتری عامل کزاز یا کلستریدیوم تتانی tetC) (که تجویز آن در موش سبب ایمنی بر علیه دوز کشنده سم گردیده است ، تجویز عضلانی واکسن ژنی لیستریا Listeria monocytogenes که یک باکتری داخل سلولی است با استفاده از بلدگنهای همولایزین و لیستریولایزین listeriolysin O سبب ایمنی سلولی مناسب حفاظت حیوانات در مقابل عفونت با باکتری بیماریزا می شود ، کلامیدیا پنومونیا و واکسن ژنی ضد عامل طاعون حاوی ژن رمز کننده پروتئینی V

واکسنهای ژنی ضد عوامل قارچی :

واکسن ژنی ضد قارچ کوکسیدیو ایدو مایکوزیس Coccidioides immitis

واکسنهای ژنی ضد عوامل انگلی :

دوبیماریهای انگلی مالاریا و لیشمانیا در صدر بیماریهای عفونی شایع در کشورهای فقیر می باشند که تا کنون واکسن مناسبی بر علیه انان تهیه نگردیده است . انواع واکسنهای نسل اول مانند واکسن کشته، انگل زنده و همچنین نسل دوم شامل واکسنهای نوترکیب تهیه شده از یک انتی ژن و یا ترکیب انتی ژنهای مختلف و همچنین نسل سوم یا واکسنهای ژنی مورد بررسی بوده است .با توجه به مزایای واکسنهای ژنی، در چند سال گذشته تحقیقات گسترده ای در زمینه تهیه واکسن ژنی بر علیه این دو بیماری انگلی صورت گرفته است.

واکسن ژنی ضد انگل سالک ، مشخص شده است که تجویز داخل جلدی واکسن واجد قطعه کوتاهی از DNA حاوی سکانس CpG همراه با واکسن کشته لیشمانیا (تهیه شده بروش انجماد و ذوب کردن سبب ایمنی ۴۰٪ حیوانات مورد آزمایش بر علیه تزریق ا نگل عفونی می شود در حالیکه تجویز واکسن کشته تنها، بهیچوجه قادر به حفاظت نیست . ایمنی قاطع تر (۹۵-۶۵ ٪) با تزریق انگل لیشمانیا و سپس تجویز واکسن ژنی در محل تجویز قبلی و یا در محلی دورتر مشاهده گردیده است که می تواند ارزش بسیاری در تهیه واکسن مناسب ضد لیشمانیا داشته باشد .واکسن ژنی تریپانوزوم کروزی Trypanosoma cruzi با استفاده از پادگن TS واکسن ژنی توکسوپلاسما گوندی Toxoplasma gondii براساس ژن رمز کننده پروتئین SAG1 سبب حفاظت موش بر علیه تزریق نوع بیماریزای انگل می شود . در دو جدول .... و .... انواع انتی ژنهای بررسی شده جهت واکسنهای نسل دوم و سوم ضد لیشمانیا که در دو ازمایشگاه مختلف مرجع و نتایج ایمنی زایی انها درج گردیده است.

جدول . انتی ژنهای بررسی شده جهت تهیه نسل دوم واکسنهای ضد لیشمانیا

Antigen	**Description**
MIX	Containing LACK, Hsp80, TSA, GP63, FPA
TSAL.	*major* thio specific oxidant (S. Reed)
GP63	*L. major* leishmanolysin (F. Mahboudi/R. McMaster)
Hsp80	Heat shock protein 83 *L. braziliensis* (S. Reed)
SLA	*L. major* soluble antigen (promastigote cell extract)
LACK	*L. major* (N. Glaichenaus)
FPA	Flagellar pocket antigen *Trypanosoma brucei rhodesiense*
1G6	*L. major* (S. Reed)
4H6	*L. major* (S. Reed)
GBP	*L. major* gene B protein (D. Smith)
CP	*L. mexicana* cysteine proteinase (J. Mottram)

جدول نتایج ازمایشات انتی ژنهای فوق در دو ازمایشگاه

Antigen	**Theander's Lab***		**Barral-Netto's Lab****	
	With rIL-12	**With MPL**	**With rIL-12**	**With MPL**
MIX (LACK, Hsp80, TSA, GP63, FPA)	++	++	-	ND
TS A	-	ND	-	ND
GP63	-	-	-	-
Hsp80	-	-	-	ND
SLA (non-recombinant)	-	ND	-	ND
LACK	+	++	+++	+/-
FPA	-	ND	+++	ND
1G6	ND	-	ND	-
4H6	ND	++	ND	-
GBP	ND	-	ND	-
CP	ND	-	ND	+/-

***site of injection of *L. major*: base of tail, BALB/C mice, challenge performed 20 days after last immunization.**
**** site of injection of *L. amazonensis*: foot, C57BL/6 and BALB/C mice, challenge performed 15 days after last immunization**
ND: not done.
(T. Theander Lab ,University of Copenhagen, Denmark) and (M. Barral-Netto Lab, FIOCRUZ, Salvador, Brazil).

بررسی انتی ژنهای مختلف جهت تهیه واکسن ژنی لیشمانیا نشان می دهد که تزریق عظلانی ۱۰ میکروگرم واکسن ژنی حاوی ژنهای رمز کننده این انتی ژنها به موشهای ازمایشگاهی و مقابله آنها با ۲ میلیون انگل زنده به کف پای حیوانات ایمنی نسبی را ایجاد نموده است وتحقیق جهت بهینه سازی این واکسنها ادامه دارد . در عین حال بررسی پادگن Cysteine proteinases بروش واکسن نوترکیب و ژنی ایمنی نسبی را بر علیه لیشمانیا نشان داده است.

واکسن ژنی مالاریا واجد پروتئین اسپروزوئیتی Circumsprozoit protein (CSP) براساس PySSp2 از انگل پلاسمودیوم یولی Plasmodium Yoeli که نشان داده است این واکسن ایمنی قاطع تری در مقایسه با استفاده از انگل زنده ، وا کسن پروتئینی نوترکیب ، واکسن نوترکیب با حامل ویروسی داشته و پاسخ کامل $CD8^+$ و حفاظت CTL در مقابل تجویز انگل زنده عفونی را نشان داده است . واکسن نوع انسانی توسط مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی ارتش امریکا تهیه و برروی ۲۰ نفر داوطلب آزمایش شده اســت. در این بررسی تجویز سه دوز واکسن شامل میزانهای مختلف ۲۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰۰ میکروگرم از آنتی ژن CSP (circumsporozoite protein) انتی ژن اصلی سطح پلاسمیودیوم فالسیفاروم به روش عضلانی مشخص نموده که واکسن ژنی فاقد عوارض جانبی جدی بوده و هیچگونه آنتی بادی ضد DNA نیز ایجاد نشده است . در بررسی جدیدی با تجویز سه دوز واکسن ژنی ترکیبی شامل ژن CSP کلون شده در کنار انتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HbsAg) ,همراه با یاور در کشور گامبیا که بروی تعدادی از بالغین انجام و بمدت ۱۵ هفته پیگیری گردید مشخص شد که در ۹ هفته اول ایمنی تا ۷۱٪ بوده ولی در ادامه بررسی کاهش یافته است . با تجویز نوبت چهارم واکسن یکسال پس از اخرین تجویز میزان ایمنی تا ۴۷٪ مشاهده شد . این بررسی مشخص نمود واکسن ژنی فوق ایمنی زا ، سالم و بدون عوارض جانبی است .

این اولین واکسنی است که توانسته است بر علیه فاز قبل از ورود انگل فالسیفاروم به گلبولهای قرمز pre-erythrocytic stages) ایمنی ایجاد نماید . قبلا مشخص شده بود که پادگن سطحی ویروس هپاتیت می تواند بعنوان پروتئین یاور و افزاینده تاثیر پادگنهای ضعیف (از نظر تحریک سیستم ایمنی) عمل نماید در عین حال با توجه به موفقیت واکسن ضد هپاتیت B می تواند بعنوان واکسن دوگانه ضد مالاریا و هپاتیت همزمان مورد استفاده قرار گیرد . البته ضرورت افزایش میزان ایمنی زایی و همچنین زمان بقای ایمنی در این تحقیقات که در حال ادامه است مورد توجه می باشد.

شکل : ایمنی زایی واکسنهای مختلف ژنی بررسی شده در حیوانات

واکسنهای ژنی دامی در حال بررسی :

باتوجه به کارایی و سهولت تهیه واکسنهای ژنی ، و ارزانی آن ازمایش واکسنهای ژنی ضد بیماریهای عفونی شایع دامهای مختلف بررسی شده و در مواردی مزیت واکسنهای ژنی به واکسنهای متداول به اتبات رسیده است که واکسنهای ژنی زیر از ان جمله است :

واکسن ژنی ضد انگل دامی Theileria annulata عامل بیماری تایلریوز با استفاده از وکتور حاوی دو ژن Tams1-1 , Tams1-2، تزریق داخل عضلانی این واکسن به سه رأس گوساله ایمنی کامل ۲ راس از سه راس حیوان را پس از تزریق انگل عفونی نشان داده است در حالیکه هیچ پادتن قابل اندازه گیری در خون حیوانات یافت نشده ، واکسن ژنی ضد ویروس تب برفکی FMD (foot-and-mouth disease که یکی از بیماریهای خطرناک دامی است . بررسی واکسنهای ژنی حاوی ژن رمز کننده کپسید ویروس (P1) ، ژن پروتئیناز (۳C) و ژنوم کامل ویروس که با ایجاد جهش قادر به ایجاد عفونت نیست نشان داده است که واکسن ژنی حاوی ژنوم ویروس قادر به ایجاد ایمنی مناسب می باشد .

واکسن ژنی ضد آنفلوانزای طیور (HA-DNA influenza virus vaccine) بااستفده از ژن رمز کننده هماگلوتینین تلقیح شده بروش تفنگ ژنی نشان داده است که ژن هماگلوتینین سویه H5N2 قادر است ۹۵٪ واکنش متقاطع ایمنی بر علیه سایر ویروسهایی که از نظر ردیف اسیدهای امینه بین ۱۱ تا ۱۳ ٪ با سویه واکسن تفاوت داشته اند ایجاد نماید این واکسن در موش نیز ایمنی زا بوده است . این ویروس که در حال شیوع جهانی است قادر انتقال به انسان نیز می باشد . نکته دیگری که در این بررسی مکانیسم حفاظتی واکسنهای ژنی را بیشتر مشخص می سازد این است که مقدار پادتن ضد HA پس از تزریق اول بسیار کم بوده ولیکن با تزریق ویروس بیماریزا بمقادیر زیادی پادتن تولید می شود که نشان دهنده تحریک قوی لنفوستهای B توسط واکسن ژنی است . بنابر این این واکسن نسبت به واکسنهای موجود برتری دارد . علاوه بر این واکسن ژنی دیگری بر علیه سویه H5N1 بااستفاده از همین پادگن تهیه و اخیرا مورد بررسی قرار گرفته است این واکسن قادر است موشها را برعلیه ویروس کشنده حفاظت دهد . در سال ۱۹۹۷ سویه بسیار کشنده H5N1 در هنک کنگ بین طیور شیوع یافت و سپس بطور مستقیم از طیور به انسانها منتقل شد که سبب۱۶ مورد آنفلوانزا با ۶ مورد مرگ گردید

واکسن ضد بیماری نیوکاسل طیور با استفاده از پلاسمید خطی (linear plasmid) حاوی ژن F ویروس نیوکاسل در کنار پیش برنده CMV و پیش برنده ژن بتا اکتین chicken beta-actin gene promoter واکسن ضد انسفالو میلیت موشی Theiler's murine encephalomyelitis virus ، واکسن ژنی ضد اسهال ویروسی

گاوی که بروی دامها نیز آزمایش شده و در حال توسعه جهت کاربرد گسترده می باشد، واکسن ژنی ضد سیاه زخم با استفاده از پادگن حفاظت دهنده protective antigen (PA) ، واکسن ضد حاوی ژن G ویروس هاری که ایمنی کامل بر علیه انواع محتلف ویروس ایجاد می کند . با توجه به نتایج ارزشمند ایمنی زایی این واکسنها در مقابله با بیماریهای شایع عفونی در طیور بررسی جهت کاربردهای گسترده واقتصادی اکسنهای ژنی در صنایع مرغداری و طیور، با مطاله انواع یاورها و پیش برنده های مختلف در بهینه سازی تزریق بروش عضلانی انجام گرفته است . در این بررسی جوجه های یک روزه با واکسن ژنی حاوی ژن هماگلوتینین سویه H5 ویروس انفلوانزای طیور با استفاده از پیش برنده های مختاف اکتین CMV) ,RSV, SV40 , و یاورهای مختلف مانند فسفات کلسیم ، سورکروز ۵۰ ٪ ، دکستران، DEAE , dextran, polybrene . , بروش عضلانی ایمن گردیدند نیمی از جوجه ها در هفته سوم نیز تزریق دوم را دریافت کردند و سپس در هفته ششم با سویه بسیار بیماریزای ویروس مواجه شدند . بررسی ایمنی زایی با اندازه گیری پادتنهای تولیدی و همچنین محافظت در مقابله با ویروس نشان داده است که پیش برنده CMV بهترین پاسخ ایمنی را داشته است .

کلوایی واکسنهای ژنی جهت مبارزه با بیماریهای عفونی در صنعت شیلات نیز بررسی شده است . بعنوان نمونه ایمنی زایی واکسن ژنی ضد ویروس hematopoietic necrosis virus (IHNV) که سبب بیماری در ماهی سفید و قزل آلا شده و سالانه میلیونها ماهی را از بین می برد تحققیق شده است . مقایسه ایمنی زایی این واکسن ژنی که حاوی ژن رمز کننده گلایکو پرو تئین ویروس است با واکسن نوترکیبی که قبلا تهیه شده نشان دهنده قدرت و ارزش بالای ایمنی زایی واکسن ژنی است بنحوی که در ماهیهای ایمن شده با واکسن نوترکیب تا ۲۰٪ مرگ و میر پس از آلوده شدن با ویروس حاد دیده می شود در حالیکه این میزان در ماهیهای ایمن شده با واکسن ژنی فقط ۱ تا ۲ ٪ است . البته با توجه باینکه این ویروس نوزاد ماهیها را در زمانی که ۱ تا ۱۰ گرم وزن دارند مبتلا می سازد روش تزریقی نمی تواند کاربرد گسترده ای داشته باشد بنابر این محققین در حال بررسی تهیه واکسنی ژنی که بتواند از طریق ابشسها جذب شود و یا بطور خوراکی مصرف شود می باشند.

واکسنهای ژنی در مراحل آزمایش کلینیکی :

باتوجه به پیشرفتها و نتایج ارزشمند حاصل از تحقیقات آزمایشگاهی واکسنهای ژنی ، شرایط لازم جهت طی مراحل مختلف بررسی واکسنها و کسب مجوز آزمایش بروی انسان در حال گسترش است . اولین آزمایش کلینیکی واکسن ژنی در سال ۱۹۹۵ برای واکسن ژنی ضد HIV صورت گرفت و پس از آن ۴ واکسن ژنی آنفلوانزا ، هرپس ، لنفوم سلولهای T و نوع دیگری از واکسن ژنی ضد ایدز در سال ۱۹۹۶ مورد ازمایش قرار گرفت .

واکسن ژنی ایدز که به مرحله آزمایش انسانی رسیده است واجد دو ژن Gag/Pol ویروس است که با تولید آن در بدن وتحریک سیستم ایمنی به گفته سازندگان آن قادر خواهد بود ایمنی مناسبی بر علیه این ویروس ایجاد نماید.

در این آزمایشات که توسط شرکت آپولون صورت میگیرد و دو سال طول خواهد کشید میزان ایمنی ایجاد شده ، عوارض احتمالی و طول بقای و اکسن در بدن افراد بررسی خواهد شد . این واکسن از طرف موسسه غذا و دارو، موسسه ملی بهداشت و موسسه ملی آلرژی و بیماریهای عفونی امریکا مجوز آزمایشات بروی انسان را دریافت و حمایت مالی شده است . ازمایشات اولیه بروی میمون سبز افریقایی موفقیت چندانی نداشت ولی محققین با آزمایش بروی شامپانزه ها که مانند انسان به ویروس ایدز مبتلا می شوند نشان داده است که این واکسن مانع رشد ویروس ایدز شده و میمون های ایمن شده با واکسن ژنی ایدز به عفونت مقاوم شده اند در حالی که حیوانات شاهد همه الوده به ویروس ایدز گردیده اند . این موفقیت بزرگی در عرصه مقابله با ایدز است زیرا تمام واکسنهای تهیه شده قبلی قادر به ممانعت از رشد ویروس نبوده اند. همبن شرکت قصد استفاده از فن آوری واکسن ژنی برای درمان بیماران مبتلا به ایدز را نیزدارد . واکسنهای ژنی دیگری مانند واکسن ژنی لمفوم سلولهای T (T cell lymphoma) توسط این شرکت وارد مراحل آزمایش

بروی انسان شد ه است . شرکت اپولون Apollon که در سال ۱۹۹۲ فعالیت خود را شروع کرده تحقیقات خود را بروی استفاده از تکنولوژی واکسنهای ژنی برای جنبه های ایمن سازی و ژن درمانی متمرکز کرده است.

در سال ۱۹۹۸ محققین سوئدی واکسن ژنتیکی ضد ایدز جدیدی را که حاوی ژنهای رمز کننده پروتئینهای nef, rev و یا ژنهای تنظیم کننده موسوم به tat بود بروی ۹ فردالوده به ویروس HIV-1 که هنوز علایم بیماری در آنها بروز نکرده بود و فاقد یا واجد مقادیر بسیار اندک پادتنهای ضد این پروتئینها بودند آزمایش کردند. پس از ایمن سازی فعالیت سلولهای لنفوسیت T اختصاصی ضد HIV-1 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که این واکسن سبب تولید سلولهای حافظه در تمام بیماران و سلول کشی اختصاصی از گروه MHC-1 در ۸ بیمار شد که مشابه با $CD8^+$ بودند. بنابر این واکسن ژنی ضد ایدز قادر به نابودی سلولهای آلوده به ویروس قبل از الوده کردن سلولهای دیگر می باشد. این واکسن هیچگونه عوارض جانبی نیز نداشته است .

اخیرا واکسن ژنی جهت سویه آ ویروس ایدز که در افریقا شایع است با همکاری دانشگاه اکسفورد انگلیس و دانشگاه نایروبی کنیا تهیه شده است (سویه غالب در کشورهای غربی از نوع ب می باشد) ازمایش این واکسن در تابستان سال ۲۰۰۰ بروی داوطلبان در افریقا شروع شده است . بررسیهای انجام شده بروی این واکسن ایمنی سلولی بسیار خوبی را نشان داده است و سلولهای ایمنی حاصل قادر به نابود کردن سلولهای آلوده به ویروس هستند. نکته قابل توجه در مورد تهیه این واکسن این است که کل زمان از تحقیقات تا بررسی ان بروی انسان ۱۸ ماه طول کشیده است در حالی زمان مورد نیاز برای برسی واکسنهای نوترکیب بروی اتسان در کشورهای پیشرفته چند سال است .

موسسه واکسن سازی مریو فرانسه مجوز تولید پنج واکسن ژنی را برعلیه ویروس سایتو مگال ، ویروس تنفسی کودکان (srv)، بیماری لایم ، واکسن ضد باکتری عامل زخم معده (Heliobacter pylory) و واکسن مالاریا را دریافت کرده است .

در اواخر سال ۱۹۹۸ نتایج موفقیت فاز آول بررسی ایمنی زایی واکسن ژنی هپاتیت B توسط شرکت PowderJect Inc بروی ۱۲ نفر منتشر گردید. در این بررسی با استفاده از روش غیر تزریقی موسوم به سیستم پودر جت ، ذرات بسیار کوچک طلای پوشیده شده با واکسن ژنی به زیر پوست پرتاب می شود که واجد ۱ - ۵/. میکروگرم واکسن ژنی است . نتایج این بررسی نشان دهنده ایمنی کامل واکسن بوده و میزان واکسن مورد نیاز در مقایسه با واکسن پروتئینی ۱۰۰ برابر کمتر می باشد.

یکی از نتایج بسیار ارزشمند استفاده از واکسن ژنی فوق علاوه بر کاربرد آن در پیشگیری از ابتلا به بیماری هپاتیت ، کاربرد درمانی آن در هپاتیت مزمن است. در این حالت ویروس در کبد مانده و مرتب پادگنهای ویروسی در بدن آزاد می شود که عواقب وخیمی دارد و این فرد یک ناقل می باشد . تعداد افرادناقل مبتلا به هپاتیت B مزمن در جهان بالغ بر ۲۰۰ تا ۳۰۰ میلیون نفر است و با توجه به احتمال ابتلا آنان به سرطان کبد ، ویرو س هپاتیت B را در ردیف یکی ازفعالترین ویروسهای جهش زای جهان قرار داده است و این مشکل در مناطقی که بیماری هپاتیت B بطور بومی شایع است مشکل ساز است . یک بررسی با استفاده از موش تراژن حاوی ژن رمز کننده HBs-Ag (مدل مشابه ابتلا به هپاتیت مزمن) نشان داده است که تزریق واکسن ژنی فوق توانسته است سبب کنترل القا ژن فوق در موش شود . این بدین مفهوم است که تزریق واکسن ژنی در این بیماران می تواند سبب پاکسازی فرد از ویروس هپاتیت شود .

بررسی ایمنی زایی و ایمنی درمانی واکسن ژنی هپاتیت B در مدل ویروس هپاتیت B اردک
duck hepatitis B virus (DHBV) نشاندهنده ایمنی پایدار بر علیه عفونت است و در عین استفاده
از این واکسن جهت درمان حیوانات مبتلا به هپاتیت مزمن، سبب کاهش شدید میزان DNA ویروس در سرم و کبد حیوانات درمان شده در مقایسه با حیوانات شاهد می گردد. بنابر این می توان از این روش در درمان مبتلایان به هپاتیت مزمن استفاده کرد .شرکت Vical نیز داروی Allovectin را که یک داروی ژنتیکی برای درمان سرطان خون بدخیم

است با استفاده از ژن موسوم به MAGE-1 را در دست تهیه دارد . بر اساس این یافته ها تا کنون چندین نو آوری فنی Patent))در زمینه دانش فنی و واکسنهای ژنی تبت گردیده است که.

جدول : واکسنهای ژنی در مراحل ازمایش کلینیکی

باتوجه به کارایی بالای و اکسنهای ژنی بر علیه عوامل عفونی، مراکز نظامی بشدت به این فن آوری علاقمند شده اند تا واکسنهای موثری بر علیه میکروبهای خطرناکی که احتمال کاربرد نظامی یا تروریستی را داشته باشد تهیه نمایند . به همین دلیل موسسه تحقیقات پیشرفته دفاعی امریکا بودجه ای ۴/۳ میلیون دلاری را جهت تحقیق بروی واکسنهای ژنی بخصوص استفاده از روش کتابخانه ژنی جهت تهیه واکسنهای مناسب اختصاص داده است . با توجه باینکه تا ۵ سال آینده ردیفهای ژنوم اغلب میکروبهای عفونی مهم شناسایی خواهد شد بنابراین این امکان وجود دارد تا با استفاده از این اطلاعات واکسنهای موثرتری تهیه گردد . با استفاده مجموعه ژنوم یک میکروب می توان واکسنی تهیه کرد تا بر علیه آن ایمنی قاطع ایجاد نماید بدون انکه خطر عفونت وجود داشته باشد . با استفاده از این روش می توان تعداد زیادی پلاسمید حاوی قطعه های مختلف ژنوم عامل عفونی را بطور ه مزمان تزریق نمود

روشهای مختلف وارد نمودن واکسن ژنی به داخل سلول :

میزان ورود DNA به سلولهای دارای سرعت تقسیم زیاد ده بار بیشتر از سلولهای کند رشد است . بهمین دلیل در سلولهای عضلانی نوزادان که سرعت رشد وتقسیم سلولها در مقایسه با سلولهای ماهیچه بالغ بیش‌تر است میزان بیشتری پلاسمید وارد سلولها میشوند و چون عمدتا ایمن سازی بطور گسترده در نوزادان صورت میگیرد کارایی این نوع واکسنها بالا خواهد بود. در ضمن پاسخ ایمنی تزریق زیر جلدی بمراتب بهتر از تزریق عضلانی است .

مقایسه کارایی واکسن ویروسی و واکسن ژنی آنفلو انزا واجد ژن هماگلوتینین در حیوان نوزاد و بالغ آزمایشگاهی نشان داده که موش نوزاد قادر به تولید آنتی بادی نمی باشد ولیکن پاسخ ایمنی سلولی مناسبتری نسبت به موشهای بالغ به واکسن ژنی دارد . در یک تجربه واکسن ژنی به گروهی از موشهای نوزاد ۳ روزه و موشهای بالغ تزریق و پاسخ ایمنی آنان در طول زمان بررسی گردید . چهار روز پس از اولین تزریق سلولهای ایمنی خاص ضد انتی ژن در تعداد بسیاری از حیوانات مشاهده شد که تا یکسال پس از تزریق نیز وجود داشتند و همانند موشهای بالغ ایمنی در آنها ایجاد شده بود .

برای افزایش کارایی و ورود حامل ژنتیکی ، ایجاد خراش موضعی در محل تزریق، استفاده از محلول ۲۵٪ سوکروز ویا استفاده از موادی که بطور موضعی ایجاد تخریب نسجی میکنند مانند کاردیوتوکسین (Cardiotoxin در حیوانات آزمایشگاهی) و bupivacaine که یک بی حس کننده با فعالیت غشاء سطحی است را بکلو گرفته شده .

از روشهای دیگر انتقال DNA به بافتها استفاده از لیپوزوم Liposome است که دارای انواع مختلف میباشد ولی مشخص شده که لیپوزومهای کاتیونیک بهترین کارایی را داشته اند. انواع مختلفی از لیپوزومهای کاتیونیک وجود دارد که برای انتقال ژنها بداخل سلول اس‌تفاده میشود از جمله لیپوفکتین Lipofectin ، لیپوفکتامین lipofectamin و کلسترل دی.سی DC-cholesterol . ولیکن لیپوزوم DLRIE بیشترین کارایی را نشان داده است.

بدلیل وجود شارژ منفی در پروتئین و شارژ مخالف در لیپوزوم این دو ملکول با جاذبه سطحی بهم متصل شده وسا ختار جدیدی ایجاد میشود که به آن سایتیزوم (Cytisom مجموعه DNA و چربی کاتیونیک) میگویند . اندازه این ذرات بین ۷۰ تا ۳۰۰۰ نانومتر است. در این روش انتقال DNA ، سایتوزوم به جداره سلولی متصل شده و با تشکیل اندوزوم

اولیه بداخل غشاء سلول کشیده شده و پس از تشکیل ا ندوزوم دوم به سایتوزول cytosol و از این طریق به هسته سلول وارد میگردد .

بررسی میزان ورود DNA بداخل سلولها (با استفاده از ژن نشانگر کلرامفنیکل استیل ترانسفراز ((CAT) بااستفاده از تکنولوژی لیپوزوم نشان داده است که در روش استنشاقی با استفاده از ۱۳۲ میکروگرم از DNA خالص حل شده در ۱۰۰ میکرولیتر آب و همین مقدار DNA همراه با DLRIE/DOPE در ۷۰ میکرو گرم به میکروگرم) ، میزان پروتئین نهایی در بافت در محلول لیپوزوم تا۲۵ بار بیشتر بوده است.

از دیگر لیپوزومها میتوان به استروئید های پلی آمینی اشاره کرد که میتوانند مواد متصل بخود را وارد

DLRIE/DOPE : (Dilauryl Rosenthal Inhibitor, (+/-) - N - 92-hydroxyethyl)-N N-dimethyl /2 , 3-bis(dodecyloxy)-1-propanaminium bromide

جدول : میزان ترکیب پلاسمید با لیپوزوم در انواع لیپوزومهای استفاده شده در واکسنهای ژنی

سلول کنند. بررسی واکسن ژنی هپاتیت داخل شده به لیپوزومهای کاتیونیک ۱۰۰ برابر افزایش در واکنش ایمنی در مقایسه با واکسن ژنی خالص را نشان میدهد بنظر میرسد که این روش سبب فعال شدن سلولهای ارائه دهند پادگن در محل ویا در غدد لنفاوی اطراف میگردد . به مجموعه DNA وچربی کاتیونیک لیپولکس Lipolex گفته می شود و استفاده از این مجموعه در واکسن ژنی را Lipofection می نامند.

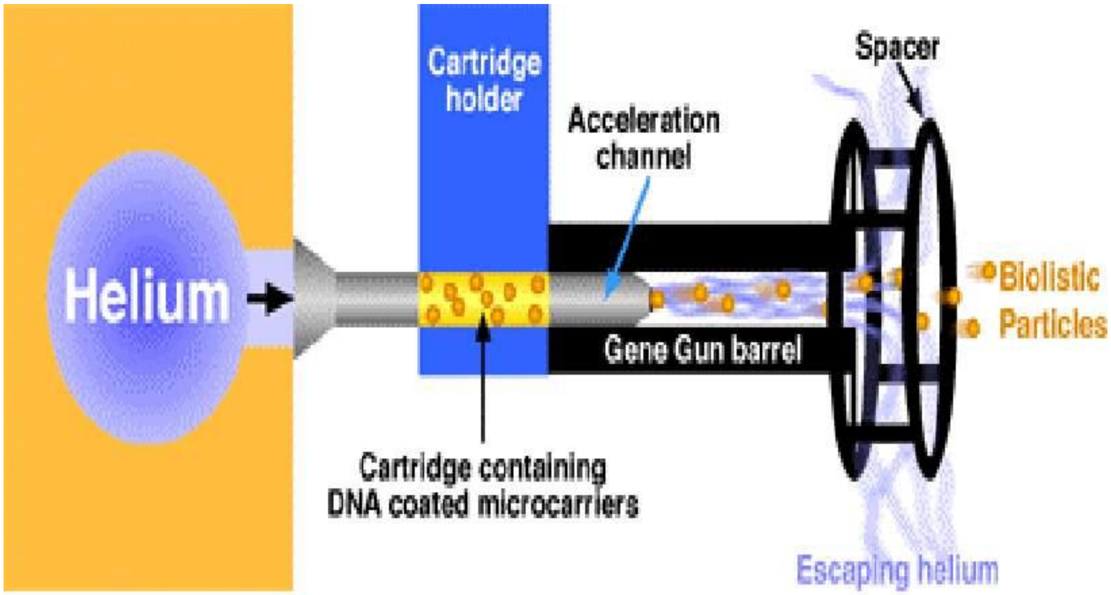
استفاده از نوعی پلیمر انتقال دهنده پلاسمید به داخل سلولها موسوم به دندروزوم Dendrosome که در ایران تهیه شده است) همراه با واکسن ژنی هپاتیت B افزایش مناسبی را در ایمنی خونی در مقایسه با پلاسمیدکنترل را نشان داده است. .

عواملی که در کاربرد لیپوزوم جهت انتقال DNA اهمیت دارند عبارتنداز:

۱- غلظتDNA
۲ - نسبت لیپید به DNA
۳- زمان ترانسفکشن
۳ - نقش پروتئینهای مهار کننده در سرم مانند لیپاز

تفنگ ژنی :

یکی از روشهای جدید و بسیار موثر جهت انتقال واکسن ژنی بداخل سلولها روش تفنگ ژنی است که ذرات واکسن ژنی را با فشار هوای فشرده به زیر پوست منتقل می کند . میزان واکسن ژنی مورد استفاده در این روش تا حد ۱/۵-۲ میکروگرم کاهش می یابد. ارزش این روش که در مجموعه روشه ای موسوم به تجویز غیر تزریقی یا بدون نیاز به سوزن قرار گرفته است مقدار بسیار کم واکسن ژنی مورد نیاز ، همچنین ورود بیشتر پلاسمید به داخل سلولها در مقایسه با روشهای تزریقی و همچنین عدم نیاز به مواد افزودنی جهت افزایش تاثیر واکسن می باشد.


Spacer
Cartridge holder
Acceleration channel
Helium
Biolistic Particles
Gene Gun barrel
Cartridge containing DNA coated microcarriers
Escaping helium

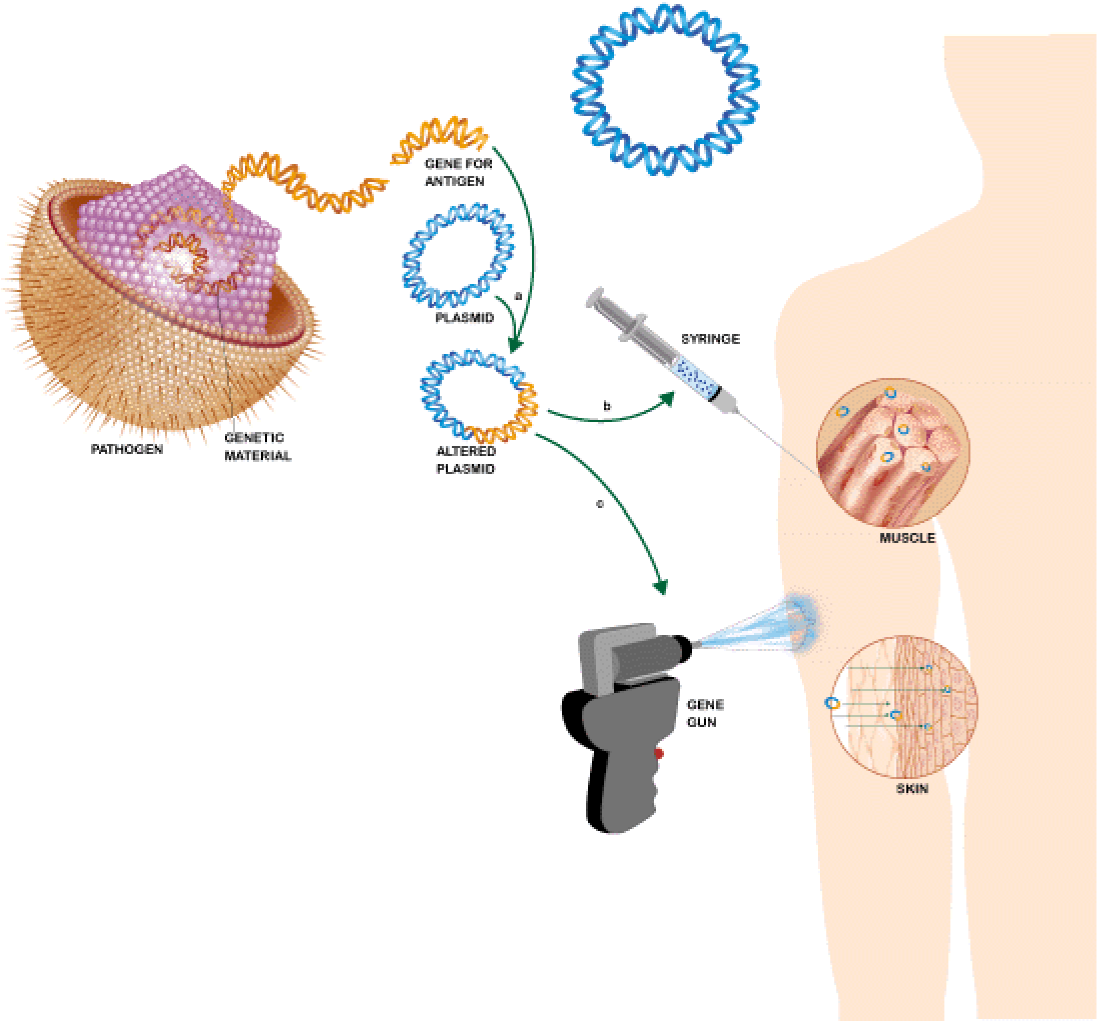
شکل : ساختمان دستگاه تفنگ ژنی

این دستگاه را میتوان بنحوی طراحی کرد که بمقدار مورد نیاز از واکسن را همراه با ذراتی بسیار کوچک و با فشار بدون آنکه ایجاد درد نماید بداخل سلولهای زیرپوست وارد کند و یا از طریق سیستم تنفسی واکسن را بشکل ائروسل (ذرات بسیار ریزی که میتواند در هوا معلق باشد) وارد سلولها نمود.

روش بسیار جدیدتری که در انتقال واکسن ژنی ابداع شده است و به انتقال بدون سوزن معروف است که پرتاپ قطرات بسیار کوچک حاوی DNA بافشارگاز دی اکسید کربن به داخل بافت می باشد که به Biojector یا jet injectionمعروف است. از این روش جهت ایمن سازی در انسان نیزاستفاده می شود.

شکل.... : دستگاه بیوجکتور

در یک بررسی در مرکز تحقیقات نیروی دریایی ارتش امریکا با تزریق واکسن ژنی هپاتیت B در ۳۲ میمون آزمایشگاهی توسط تزریق با سرنگ و استفاده از Biojector بهداخل عضله و زیر جلد مشخص شد ه است که تجویز واکسن ژنی با Biojectorواکنش ایمنی بسیار خوبی را در مقایسه با تزریق با سرنگ ایجاد نموده است . همچنین مشخص شده که تزریق داخل جلدی واکسنهای ژنی توسط سرنگ در میمونها واکنش ایمنی بسیار قوی تری را در مقایسه با تزرق به داخل عضله ایجاد می نماید.


GENE FOR
ANTIGEN
PLASMID
a
ALTERED
PLASMID
b
c
SYRINGE
MUSCLE
GENE
GUN
SKIN
PATHOGEN
GENETIC
MATERIAL

شکل : روشهای مختلف تجویز واکسن ژنی (تزریق با سرنگ و تفنگ ژنی).

سایر روشهای تجویز واکسن ژنی :

از راههای مناسب ایجاد ایمنی مخاطی، تجویز دهانی واکسن است . یکی از واکسنهای ویروسی که تحقیقات بسیاری بروی آن صورت گرفته واکسن روتا ویروسی است . تخمین زده می شود که عفونت روتا ویروسی که موجب اسهال شدید در کودکان است سالانه سبب مرگ ۸۷۰ هزار نفر در کشورهای درحال توسعه می شود.. واکسن موجود ضد روتا ویروس حاوی چند سویه مختلف ویروس ضعیف شده است (RRV-TV), RotaShield که با کسب مجوز بطور گسترده ای از ان استفاده شده ولی‌کن اخیرا توسط اکادمی متخصصین کودکان امریکا گزارشاتی مبنی بر عوارض شدید دستگاه گوارش در مواردی از کودکانی که این واکسن را دریافت کرده اند دیده شده و به پزشکان توصیه شده از تجویز این واکسن تا بررسی مجدد آن خودداری کنند این عوارض بشکل برگشتن دیواره روده بزرگ و خونریزی (intussusception) دیده می شود .

شکل : وسیله ای جهت تجویز واکسن از طریق بینی

تجویز دهانی (خوراکی) واکسن ژنی ضد روتا ویروس نتایج بسیار ارزشمندی داشته است. این واکسن ژنی حاوی پروتئین VP6 ویروس روتا گروه A است که با ذرات poly lactide-coglycolide (PLG) پوشانده شده . تجویز یک دوزاین واکسن سبب تولید مقادیر کافی پادتن IgA می شود . دوازده هفته پس از ایمن سازی با این واکسن و مقابله حیوان با ویروس عفونی مشخص نمود که میزان آنتی ژن ویروسی در مدفوع در مقایسه با حیوانات شاهد بشدت کاهش یافته است .

از باکتریهای زنده ضعیف شده نیز می توان جهت انتقال واکسن ژنی استفاده نمود . تجویز سه دوز بفاصله ۱۵ روز باکتری ضعیف شده سالمونلا Salmonella typhimurium, تضعیف شده AroA- auxotrophic mutant جهت انتقال واکسن ژنی حاوی ژن بتا گالاکتوزیداز (beta-gal) بروش دهانی (خوراکی) در موش سبب القاء پاسخ مناسب ایمنی سلولی و خونی بر علیه beta-gal می شود. استفاده از وکتور ژنی حاوی مارکر پروتئین فلورسنت سبز Green fluorescent protein (GFP) و پیش برنده CMV در مقایسه با سایر پیش برنده ها مشخص نموده است که این باکتری بنحو مناسب ژن مورد نظر را القاء و به سلولهای هدف ارائه نموده است و ۱۹ ٪ سلولهای طحال، ژن GFP را القاء نموده اند (۷۴).

بافت مناسب جهت تلقیح واکسن ژنی :

برای انتخاب بافت مناسب جهت ایمن سازی با واکسنهای ژنی دو عامل را باید در نظر گرفت :

عامل اول میزان القاء ژن در آن بافت و عامل دوم قابل دسترس بودن پادگن برای سیستم ایمنی. میزان پادگنی که باید تزریق شود بر اساس میزان ورود DNA بداخل بافت وزمان بقا ء و القاء ژن در بافت محاسبه میگردد که خود به نوع پلاسمید حامل و پیشبرنده آن و ساختمان پادگن بستگی دارد. پس از القاء ژن وتولید پروتئین در داخل سلول لازم است این پروتئین به نحو مناسب در اختیار سیستم ایمنی قرار گیرد تا واکنش ایمنی مورد نیازخونی و یا سلولی فعال گردد که این موارد نیز به نو ع پادگن و طراحی پلاسمید حمل کننده ژن بستگی دارد.

بافتهای مختلفی جهت تزریق واکسن ژنی با میزان بی شتر ورود DNA بداخل سلولها بررسی شده است که بیشترین تحقیق بروی بافت عضلانی بوده و با اینکه نتایج متنوع و مختلفی در مقایسه با سایر بافتها کسب شده است ولیکن بطور کلی سلولهای عضلانی محل مناسبی جهت وارد نمودن واکسن ژنی تشخیص داده شده است . علت مناسب بودن بافت عضلانی میزان بالای ورود DNA بداخل سلول و القاء ژن میباشد. بررسی با پلاسمیدهای واجد نشانگر لوسیفراز (نوعی نشانگر که به پلاسمید حامل پیوند میشود و بکمک آن میتوان حضور DNA تزریق شده را در بافتها بکمک واکنش

نوری و رنگ مشخصی که تولید میکند، ردگیری و حتی میزان آنرا مشخص نمود) نشان داده است که القاء ژن تزریق شده در سلولهای عضلانی تا ماهها ادامه دارد.

اما با توجه باینکه سلولهای عضلانی از نظر ارائه پادگن به سیستم ایمنی ضعیف هستند واکنش بسیار قوی ایمنی با تزریق واکسن ژنی به عضله تا مدتها مشخص نبود زیرا میزان پادگن تولیدی در عضله انقدر نیست که چنین واکنش قوی را سبب شود و چون این سلولها قادر نیستند پروتئین تولید شده را به سیستم ایمنی ارائه دهند، سلولهای واسطی بین سلول ماهیچه و لنفوسیتهای T لازم است و ارائه به سیستم ایمنی در سطح سلولهای واسط صورت می گیرد . تجربه van Gogh نشان داد که سلولهای دیگری غیر از سلولهای عضلانی در القاء ژن نقش دارند. در این تجربه واکسن ژنی به گوش موش تزریق و سپس بفاصله کوتاهی گوش را قطع نمودند ولیکن موش واکنش ایمنی پایداری را نشان می داد . این تجربه مشخص نمود سلولهای دیگری غیر از سلولهای عضلانی در این فرایند نقش دارند که با دریافت DNA از محل تزریق به القاء آن پرداخته اند.

تحقیقات بیشتر نشان داد که گلبولهای سفید خاصی به نام سلولهای لانگرهانس که از نوع دندریتیک Dendritic می باشند و در همه بافتهای غیر لنفاوی بدن مانند قلب ، کلیه و سایر بافتها غیر از مغز حضور دارند واز سلولهای اساسی و حرفه ای در ارائه پادگن به سیستم ایمنی می باشند و در ارائه پادگنهای تولیدی توسط واکسن ژنی به سیستم ایمنی نقش فعالی دارند . سلولهای دندرتیک ملکولهای کمکی مانند LFA-3/CD58, ICAM-1/CD54 و B7/CD86 را بیان می کنند که با اتصال به گیرنده های سطحی سلولهای T در افزایش تحریک سیستم ایمنی نقش دارند. در ضمن این سلولها با ترشح انواع سایتوکاینها مانند اینترلوکین ۱۲، اینترفرون الفا و گاما سبب القاء سیستم ایمنی می شود. حضور چند سلول دندرتیک جهت انجام این واکنش کافی است.

شکل : وظایف سلولهای دندرتیک

از نظر ایمنی زایی تزریق مستقیم واکسن ژنی به عضله و زیر جلد اغلب سبب القاء واکنش Th1 بامشخصه تولید اینترفرون گاما و آنتی بادی غالب IgG2a می شود در حالیکه تزریق بداخل اپیدرم توسط تفنگ ژنی عمدتا سبب القاء واکنش Th2 بامشخصه تولید اینترلوکین ۴ و آنتی بادی غالب از نوع IgG 1 می شود. مشخص شده که تزریق واکسن ژنی حاوی ژن رمز کننده پروتئینهای ایمنی زای ویروس واریسلا زوستر به بافت عضلانی سبب تجمع DNA در غدد لنفاوی مجاور گردیده است و این غدد نقش مهمی در واکنش اولیه وثانویه ایمنی دارند.

مقایسه نقش محل و روش وارد نمودن واکسن ژنی حاوی ژن رمز کننده پادگن سطحی هپاتیت B(HBsAg) در میزان واکنش ایمنی در حیوانات آزمایشگاهی و نخستینیها (میمون زروس و ماکاک) بروشهای مختلف زیر جلدی ، داخل جلدی ، عضلانی، داخل صفاقی ، وریدی ، استنشاقی، داخل جداره واژن ، خوراکی ، داخل مخاط چشم ، و تفنگ ژنی و بررسی پادتن های ضد (anti-HBs, IgG, IgG1, IgG2a) در سرم حیوانات و همچنین اندازه گیری واکنش ایمنی سلولی مشخص نموده است که بهترین واکنش ایمنی و بالاترین میزان آنتی بادی در تجویز عضلانی ، زیر جلدی و داخل وریدی دیده شده که واکنش ایمنی سلولی را نیز القاء می کنند . تجویز استنشاقی سبب واکنش ایمنی سلولی مناسب گردیده ولیکن میزان تولید انتی بادی ضعیف است . مقایسه تجویز بروش تفنگ ژنی باعضلانی و زیر جلدی

نشان می دهد که حتی یک تزریق واکسن، واکنش بسیار مناسبی را در هرسه روش ایجاد می کند ولیکن بیشترین میزان در تجویز عضلانی دیده شده است . تجویز جلدی و تفنگ ژنی سبب تولید پادتن غالب از نوع IgG1 پس از ۴ هفته و مقادیر کمتری IgG2a در زمانی دیر تر می شود . تجویز عضلانی در عضله پا و زبان غالبا سبب تولید پادتن از نوع (Th1-like) IgG2aمی شود که در طول زمان ادامه دارد . تجویز داخل وریدی واکسن ژنی فوق سبب تولید پادتنهای IgG1 می شود . در میمونها تجویز ۱ میلی گرم از همین واکسن ژنی و ug ۰.۴ بروش تفنگ ژنی در زمانهای صفر و ۸ هفته واکنش ایمنی مشابهی را در تزریق عضلانی و جلدی و واکنش ضعیفتری در تفنگ ژنی نشان می دهد. ولی تجویز ۱ میلی گرم عضلانی و جلدی و ۳.۲ میکروگرم بروش تفنگ ژنی در فواصل صفر ، ۱۲ و ۲۴ هفته سبب واکنش ایمنی قوی تر تفنگ ژنی نسبت به عضلانی و واکنش بهتر عضلانی نسبت به جلدی گردید .

تجویز واکسن ژنی بروش مخاطی از طریق واژن و رکتوم نیز سبب تحریک ایمنی سلولی و مخاطی مناسب می شود که می تواند روش مناسبی جهت مقابله با بیماریهای عفونی این مجاری باشد . همراه کردن لیپوزوم می تواند سبب افزایش کارایی واکسن ژنی از طریق این بافتها شود.

روش غیر تهاجمی تجویز پوستی واکسن ژنی نیز بررسی شده است که با قراردادن مجموعه لیپوزموم + واکسن ژنی بروی پوست و جذب ان صورت می گیرد . این روش از نظر سهولت استفاده مزایای بسیاری دارد.

روش دیگر، استفاده از ویروسهای غیربیماریزا مانند رترو ویروسها، آدنوویروسها، ویروسهای گروه هرپس و ویروس واکسسینیا (Vaccinia) بعنوان حامل واکسن ژنی است . از این روش در ژن درمانی جهت وارد کردن ژن سالم وجایگزین کردن با ژن معیوب درداخل سلولها نیز استفاده میشود ولیکن در مقایسه با استفاده از DNA خالص این روش مشکلتر است و علاوه بر این برخی حاملین ویروسی (مانند رترو ویروسها) ژن الحاق شده به خود را به ساختار ژنتیکی سلولهای میزبان پیوند میزنند که میتواند سبب مشکلاتی گردد و مورد نظر هدف ایمن سازی نیست.

روش دیگر اینست که ابتدا واکسن ژنی در خارج از بدن وارد سلولهای بافت خاصی شده و سپس سلولها به بدن تزریق شوند مانند وارد کردن پلاسمید به سلولهای خونی دریافت شده از فرد (واکسیناسیون غیر مستقیم) ولی این روش مشکل و گران بوده و در ضمن احتمال آلودگی سلولها به ویروسها یا عوامل دیگر عفونی و سمی نیز وجود دارد.

روش دیگری که مورد بررسی قرار گرفته است استفاده مستقیم از قطعات تولیدی بروش PCR است که حاوی ژن مورد نظر و پیش برنده ان باشد . مزیت این روش این است که احتمال آلودگی به اندوتوکسینهای میکروبی که از مشکلات واکسنهای نوترکیب و یا استخراج مواد ژنتیکی از باکتریهاست را ندارد و لیکن با توجه به هزینه بالای تولید مقادیر بسیار زیاد محصول توسط واکنشPCR امکان عملی آن کم است .

کمیته تخصصی واکسنهای ژنی WHO ببررسی استفاده مناسب از این تکنولوژی نوین در تهیه واکسنهای ارزان ضد بیماریهای عفونی شایع در جهان و بخصوص کشورهای کم درآمد پرداخته و ایمنی زایی واکسنهای ژنی از طریق تجویز مخاطی را یکی از بهترین روشهای ایمن سازی تشخیص داده است و برای تحقیقات در سالهای اینده مقایسه دو روش: polylactide-coglycolide-DNA encapsulation و DNA-liposome complexe از نظر کارایی مورد توجه قرار گرفته است که با دو عامل عفونی rotavirus و influenza, که دارای مدلهای حیوانی مناسب هستند مورد بررسی قرار خواهند گرفت . علاوه براینها تحقیقات در عرصه واکسنهای ژنی زیر نیز مورد نظر سازمان بهداشت جهانی میباشد:

۱- واکسن ژنی ضد کزاز با استفاده از قطعه C سم کزاز

۲- الحاق وکتور به سالمونلا

۳- استفاده از سم میکروب عامل وبا بعنوان یاور

عوامل افزاینده پاسخ ایمنی در واکسنهای ژنی :

بطور کلی استفاده از پلاسمیدهای حلقوی (circular) در مقایسه با پلاسمیدهای خطی (Linear) ۵۰ تا ۱۰۰ مرتبه بیشتر موجب القاء ژن می شود اما موارد استثنایی هم وجود دارد بعنوان متال ذکر شده است که در ایمن سازی جوجه ها بر علیه بیماری نیوکاسل واکسن ژنی خطی Linear plasmid Vaccine ایمنی بیشتری نسبت به واکسن حلقوی بر علیه ویروس عفونی ایجاد نموده است . طراحی حامل ژنتیکی سازگار با سیستم تقسیم سلولی وساختارهای ژنتیکی سلولهای میزبان می تواند سبب بهبود و افزایش پاسخ ایمنی گردد.

یکی از روشهای افزایش کارایی واکسنهای ژنی اضافه کردن ژنهای رمز کننده پروتئینهای محرک و یا افزاینده القاء سیستم ایمنی به ساختمان پلاسمید واکسن ژنی است . واکسنهای ژنی ساده صرفا واجد پلاسمیدهای القا ء کننده ژن مورد نظر بودند و لیکن اینک واکسنهای ژنی بهبود یافته ای تهیه شده اند که انواع ترکیبات دیگر در ان دیده می شوند. این واکسنهای ژنی جدید از دو واحد تشکیل شده اند واحد القا ء پادگن مورد نظر antigen unit و واحد افزایش القاء سیستم ایمنی immunomodulatory unit .

سایتوکینهای مختلف مانند GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor) و یا اینترلوکینها می توانند سبب افزایش القا ء سیستم ایمنی شوند . استفاده از GM-CSF در کنار ژن مورد نظر سبب افزایش میزان انتی بادی IgG1 می شود

مشخص شده که GM-CSF که فاکتور رشد گرانولوسیتها و مونوسیتهامی باشد که موجب تمایز بهتر وعرضه آنتی ژن می شود سبب فعال شدن سلولهای دندریتیک نیز می شود .این سایتوکین که یک عامل مهم رشد سلولهای T است بنظر می رسد درآماده نمودن سلولهای معمولی برای تبدیل شدن به سلولهای Th1 یا Th2 نقش دارد . تزریق مکرر اینتر لوکین ۲ بعنوان یاور سبب افزایش واکنش ایمنی از نوع Th1 می شود تا Th2 و در ضمن خاصیت حفاظتی بر علیه عوامل عفونی دارد. ایمنی زایی واکسن ژنی هپاتیت B حاوی ژن اینترلوکین ۲ در مقایسه با واکسن ژنی بدون اینتر لوکین ۲ حداقل ۱۰۰ برابر افزایش داشته است و موشهایی که پادتنی بر علیه واکسن نوترکیب پروتئینی هپاتیت B که بطور تجاری موجود است تولید نمی کردند واکنش بسیار مناسبی به واکسن ژنی فوق داشته اند . بنابر این با کلون کردن ژن رمز کننده پروتئین اینتر لوکین ۲ در کنار ژن آنتی ژن مورد نظر ۱۰ تا ۱۰۰ برابر افزایش در واکنش ایمنی دیده می شود.

بیشترین تحقیقات بروی اینتر لوکین ۲ صورت گرفته است ولیکن اینتر لوکینهای ۷ و ۱۲ نیز جهت افزایش واکنش ایمنی در واکسنهای ژنی بررسی شده اند بعنوان نمونه در واکسن ژنی ایدز در مقایسه با واکسن شاهد تحریک مناسبتری را داشته اند .

در یک بررسی با پیوند ژن رمز کننده IgG انسانی در کنار L-selectin (L-SEL) یا CTL - antigen 4 (CTLA4)دیده شده که L-SEL که در سطح لنفوسیتها القا ء شده با ملکول CD34 متصل شده و سبب ورود لنفوسیتها به غدد لنفاوی می شود . CTLA4 نیز به ملکول B7 که در سطح سلولهای ارائه دهنده پادگن به سیستم ایمنی وجود دارد متصل می شود . دو هفته پس از تزریق واکسن ژنی سطح آنتی بادی تولید شده در موشها ده هزار برابر (۱۰۰۰۰) در مقایسه با موشهای شاهد بود. هشت هفته پس از ایمن سازی سطح آنتی بادی به حد مناسب رسید و ۱۰۰۰ تا ۷۵ بار با استفاده از CTLA4Ig یا L-SELIg در مقایسه با کنترلهای واجد ژن IgG انسانی بتنهایی بود. ایمنی سلولی نیز تا ۸ برابر در پلاسمید ژنی CTLA4Ig در مقایسه با شاهد بود .

خلوص پلاسمید در افزایش تحریک سیستم ایمنی نقش دارد . حضور مواد دیگری مانند RNAs ، اندوتوکسین و پروتئینها سبب کاهش فعالیت واکسن ژنی شده و باید به حد اقل ممکن برسند . .میزان اندوتوکسین باید کمتر از ۰.۱ EU/ug پلاسمید ، میزان DNA باکتری میزبان (E.Coli) کمتر از ۰.۰۱ میکروگرم به میکروگرم پلاسمید و

همچنین فقدان پروتینهای خارجی جهت بهترین پاسخ ایمنی ضروری است.

جدول ... : انواع یاورهای مورد استفاده در افزایش ایمنی زایی واکسنهای ژنی

ساختار : CpG

سالها قبل از کشف واکسنهای ژنی مشخص شده بود که DNA میکروبی قادر به تحریک سیستم ایمنی است . توکوناگا و همارانش در سال ۱۹۸۴ مشاهده کردند که تزریق بخشی از مواد وراثتی استخراج شده از میکرب میکوباکتریوم بوویس (BCG نقش ضد توموری بسیا ر موثری دارد . ان بررسی نشان داد که DNA تزریقی نقش مستقیمی در کشتن سلولهای توموری ندارد بلکه سبب تحریک سلولهای خاصی در سیستم ایمنی می گردد . تحقیقات تکمیلی در کشت سلولی روشن نمود که ژنوم باکتریها قادر به تحری ماکروفاژها و سلولهای کشنده T شده و اثرات ضد ویروسی دارد.
بررسی ها جهت شناسایی دقیق سکانس این ردیفها با تزریق انواع الیگونوکلئوتیدها با سکانسهای مختلف مشخص نمود

که این جایگاهها در باکتریها و ویروسها حاوی نوکلئوتیدهای دوتایی متیله نشده CpG هستند در حالیکه در ژنوم مهره داران اینجایگاههای ویژه متیله شده یا غیر فعال گردیده اند . . این ردیفهای DNA تک زنجیره ای کوتاه تحریک کننده سیستم ایمنی Immmunostimulatory sequence (ISS) نامیده می شوند . ردیفهای این جایگاهها با ترتیب 5- AACGTT-3 , 5- AGCGCT-3 , 5- GACGTC-3 شناسایی شده اند و مشخص شده که فراوانی آنها در ژنوم باکتریها ۲۰ برابر ژنوم پستانداران است . البته تمام تمام جایگاههای واجد این ردیف قادر به تحریک سیستم ایمنی نیستند بلکه حضور سکانسهای ماقبل و مابعد ان نقش تعیین کننده ای در میزان ایمنی زایی دارد.

چگونگی عمل این ردیفها در تحریک سیستم ایمنی هنوز بدرستی شنا خته نشده است و تحقیق در این مورد ادامه دارد . براساس بررسی های انجام شده به نظر می رسد بر اساس ردیفهای استفاده شده برخی از انها بعنوان یاور عمومی عمل می کنند در حالیکه برخی ردیفهای دیگر اختصاصی عمل می کنند . بعنوان مثال برخی از ردیفهایی که قادر به تحریک سیستم ایمنی موش هستند در انسان پاسخی ایجاد نمی کنند . در عین حال نوع پلاسمید استفاده شده نیز می تواند در میزان تاثیر ایمنی زایی این ردیفها موثر باشد . اما نکته مهم اینست که این ردیفها اختصاصی انتی ژن نیستند . مطالعات متعدد حاکی از ان است که وجود ردیفهای محرک سی ستم ایمنی در ژنوم باکتریها می تواند یکی از عوامل اساسی در تولید اینترلوکین ۱۲ باشد . احتمالا این ردیفها قادر به ایجاد واکنش با ملکولهای انتقال دهنده سیگنال در سیتوپلاسم یا غشا سیتوپلاسمی می باشند . فرایند مشابهی در ویروسهای حاوی RNA دورشته ای وجود دارد که م نجر به تولید اینترفرون الفا می شود.

بررسی نقش حضور و عدم حضور این ساختار در پلاسمید واکسن ژنی با متیله کردن این جایگاهها نشان دهنده کاهش سطح ایمنی است ودر مقایسه وارد کردن بیشتر این جایگاه در طراحی واکسن ژنی سبب افزایش قابل توجه واکنش ایمنی سلولی و خونی بخصوص فعال شدن فرایند Th1 ، افزایش فعالیت ماکروفاژها، سلولهای دندرتیک و NK-cell و بدنبال آن تولید آنواع سایتوکینها مانند اینترفرون الفا، بتا و گاما ، انواع اینترلوکینهای ۱۲، ۱۶ و ۱۸ و پادتنهای IgM میشود که نقش مهمی در کنترل عفونتهای باکتریال و ویروسی داخ ل سلولی ایفا می کنند. ایمنی ایجاد شده با مشخصه هایی چون ایجاد سلولهای پایدار Th1CD4+ ، سلولهای T سایتوتوکسیک CD8+ و تولید انتی بادی (که در موش غالبا IgG1-IgG2a) شناسایی می گردد . نکته مهم در خواص ایمنی زایی واکسنهای ژنی حاوی این ردیفها اینست که چنین پاسخ ایمنی را نمی توان با واکسنهای متداول ایجاد نمود و این از مزایای ویژه واکسنهای نسل سوم است. با توجه به اینکه حضور ردیفهای CpG در ساختمان پلاسمید واکسن ژنی سبب تحریک سیستم ایمنی Th1 می شود صورتی که نیاز به پاسخ ایمنی از نوع Th2 می باشد لازم است که از این ردیفها در خارج از ساختمان وکتور بعنوان یاور استفاده شود.

بنابر این استفاده از این ردیفها جهت افزایش کارایی واکسنهای ژنی در تحریک سیستم ایمنی می تواند به دوشکل صورت گیرد:

۱ - استفاده از الیگونوکلئوتیدهای واجد این ردیفها بعنوان یاور همراه با پلاسمید واکسن ژنی
۲ - کلون نمودن این ردیفها در ساختمان پلاسمید واکسن ژنی

روش اول ساده تر است و می تواند همراه هر نوع واکسن ژنی بکار رود . بررسی ها مشخص نموده است که استفاده از الیگونوکلئوتیدهای با ساختمان phosphirothioate همراه با واکسنهای پروتئینی (پروتئینهای نوترکیب) به نوع فسفودی استر که در نوع طبیعی ساختمان DNA ارجحیت دارد زیرا مقاوم به انواع انزیمهای نوکلئاز است اما سبب کاهش القائ ژن در مقایسه با نوع طبیعی می گردد . این عمل ممکن است بدلیل رقابت الیگو با پلاسمید در ورود به سلول که سبب کاهش انتقال پلاسمید به داخل سلول و یا ممانعت از رونوشت برداری و ترجمه ژن باشد که در نتیجه سبب کاهش میزان القا پروتئین گردد . در عین حال تولید سیتوکاینها بدلیل تحریک سیستم ایمنی توسط ردیفهای

ISS می تواند سبب کاهش القا ژن گردد . بعنوان مثال مشخص شده است که انترفرون گاما که در نتیجه حضور این ردیفها تولید می گردد می تواند سبب کاهش فعالیت پیش برنده های ویروسی موجود در پلاسمید واکسن ژنی و در نتیجه کاهش القاو ژن پیوند شده به ان گردد . در حالیکه الیگونوکلئوتیدهای با ساختمان وپیوندهای فسفودی استری طبیعی تاثیر ممانعت کننده در القا ژن ندارند ولیکن بسرعت تو سط نوکلئازهای سلولی تجزیه می گردند و بهمین دلیل تاثیر انها در تحریک سیستم ایمنی بسیار کوتاه و ضعیف است . تحقیقات جهت شناسایی ساختار مناسبی که در عین مقاوم بودن به نوکلئازها سبب ممانعت یا کاهش القا ژنها نباشد ادامه دارد.

اغلب پلاسمیدهایی که در تهیه واکسن ژنی استفاده می شوند واجد این ردیفها هستند (حدود ۳۰۰-۲۰۰) که با توجه به تولید این پلاسمیدها در باکتریها متیله نشده خواهند بود . البته برخی از این ردیفها بر اساس جایگاه می توانند شامل ردیفهای محرک سیستم ایمنی بوده و بعنوان یاور سبب افزایش کارایی واکسن ژنی شوند . البته با توجه به احتمالی بودن این فرایند در مواردی لازم است از ردیفهای شناسایی شده محرک سیستم ایمنی استفاده نمود . البته با توجه به اینکه این پلاسمیدها دارای ساختار طبیعی DNA با پیوندهای فسفو دی استری هستند بدلیل داشتن ساختمان بسته حلقوی تا حدودی در مقایسه با الیگو نولئوتیدها به نوکلئازها مقاو تر می باشند.

با انکه در یک بررسی گزارش گردیده است شده که کلون نمودن فقط دو ISS در پلاسمید واکسن ژنی سبب افزایش بسیار در پاسخ ایمنی در مقایسه با پلاسمید فاقد ان می گردد ولیکن بررسیهای بیشتری در این مورد لازم است زیر ا با توجه به وجود ده ها جایگاه در ساختمان پلاسمیدهای واکسن ژنی اضافه کردن دو ردیف نمی تواند چنین تاثیری فزاینده داشته باشد .

تزریق DNA باکتری و یا قطعه کوتاه تک رشته ای (الیگو) سنتز شده حاوی جایگاه CpG سبب حفاظت حیوان آزمایشگاهی بر علیه دوز کشنده واکسن زنده میکروب فرانسیسلا تولارنسیس Francisella tularensis و باکتری monocytogenes Listeria شده است . هر گونه تغییر در این جایگاه یا متیله کردن ان سبب حذف ایمنی زایی می شود . در واقع این جایگاهها مانند یاور عمل می کنند و استفاده از آن در ساختار پلاسمید واکسن ژنی میتواند سبب افزایش ایمنی زایی ان شود . با توجه به این موارد تحقیقات جدید جهت تهیه حاملین مناسب تر واکسنهای ژنی پیشرفتهای خوبی را درپی داشته است.

همچنان که اشاره شد از این ردیفهای DNA می توان بعنوان یاور در واکسنهای پروتئینی استفاده کرد . در این روش بهتر است از الیگونوکلئوتیدهای سنتز شده با ساختار فسفوتیوات بجای فسفودی استر استفاده کرد .

کشف این ساختارها و نقش آن در سال ۱۹۹۴ توسط آرتور کریگ Arthur Krieg در دانشگاه اتاوای کانادا سبب گردید تا تحقیقات بسیاری جهت استفاده از آنها بعنوان یاور در واکسنهای ضد بی ماریهای عفونی و درمان بیماریهای خودایمنی ، الرژی ، سرطان و آسم صورت گیرد . با توجه به اینکه این ردیفها سبب تحریک سیستم ایمنی Th1، تولید اینترفرون الفا ، در نتیجه کاهش سنتز IgE و همچنین ممانعت از فعالیت سلولهای Th2 می شود می تواند نقش موثری در درمان عوارض الرژیک ایفا نماید.

جهت بررسی کارایی این یاور در واکسنها محققین اقدام به آزمایش کلینیکی برروی ۴۸ داوطلب سالم نموده اند. در این تحقیق از پلاسمید حاوی ردیف CpG خاصی جهت بررسی افزایش ایمنی زایی واکسنها در مقایسه با واکسنهای فاقد این ردیف استفاده می شود . این پلاسمید با نام CpG 7909 در واقع بعنوان یک یاور همراه با واکسن نوترکیب هپاتیت B از نظر بی خطر بودن و عدم ایجاد تولرانس آزمایش می شود . نتایج اولیه آزمایشات پیش کلینیکی این یاور ژنی نتایج بسیارارزشمندی را در مورد افزایش پاسخ ایمنی به واکسن هپاتیت B نشان دا ده است. امید می رود این واکسن علاوه بر بررسی ایمنی زایی آن بر علیه هپاتیت از نظر تحریک مناسب سیستم ایمنی بر علیه سرطان ، الرژی ، اسم و سایر عوامل عفونی نیز مورد آزمایش خواهد بود و بعنوان ایمنی درمانی ((immunotherapeutic می تواند

کاربردهای مختلفی داشته باشد. این گروه علاوه بر ساخت این یاور ژنی نوع دیگری موسوم به CpG 8916 ، CpG 8954را تهیه نموده که به تنهایی و یا همراه با انتی ژنهای عامل بیماریزا در آزمایشات اولیه کلینیکی خواص قوی ضد سرطان و ضد عوامل عفونی را نشان داده است .

جهت بررسی در موش ردیف TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT بسیار مناسب می باشد.

مقدار بسیار کم ۱ میکروگرم این الیگو می تواند موثر باشد، اگرچه در بررسی ها از ۱۰-۱۰۰ میکروگرم استفاده می شود.

هنگام سفارش الیگوها باید دقت شود تا بصورت نمک سدیم بجای نمک امونیوم سفارش داده شود و اگر بشکل خشک شده دریافت گردید می توان مستقیما در بافر حل نمود..

نوع مارکر موجود در پلاسمید ژنی نیز در پاسخ ایمنی نقش دارد . مقایسه حضور ژن مقاومت به آمپی سیلین و کانامایسین kanR در واکسن ژنی با پیش برنده CMV مشخص نموده است که حضور ژن ampR سبب القاء واکنش قوی تری نسبت به کانام ایسین می شود و این افزایش بدلیل تفاوت در میزان تولید آنتی ژن مورد نظر نبوده بلکه وجود دو رونوشت از ردیف تحریک کننده ISS palindromic CpG hexamer 5' AACGTT 3'), در ژن ampR عامل آن است در حالیکه ژن مقاومت به کانا مایسین فاقد این ردیف می باش . تجویز پلاسمیدی حاوی دو رونوشت از ردیف AACGTT در موش آزمایشگاهی ایمنی قوی تری نسبت به پلاسمید فاقد این ردیف را ایجاد می کند.

بر اساس این یافته ها تحقیقات گسترده ای جهت کاربردهای مختلف این ردیفها که با یاورهای ملکولی یا ژنتیکی معروف شده اند جهت تحریک سیستم ایمنی در عرصه های ایمنی درمانی، واکسنهای نوین وژن درمانی در حال انجام است.

میزان حضور پلاسمید در بافت و ورود آن به سلول رابطه مستقیمی با میزان القاء ژن و در نهایت میزان پاسخ ایمنی دارد.

محیط بین سلولی بدلیل وجود انواع آنزیمهای اندونوکلئاز extracellular enduonuclease محیط مناسبی برای پلاسمید حلقوی نمی باشد . وجود این آنزیمها سبب می شود که واکسن ژنی که بطور پلاسمید حلقوی خالص تهیه می شود پس از تزریق، در مدت کوتاهی بشکل پلاسمید خطی Linear و سپس بشکل قطعات کوچک DNA تبدیل شوند. اضافه کردن سرم به پلاسمید حلقوی در محیط آزمایشگاهی نیز سبب تجزیه پلاسمید واکسن ژنی می شود . بنابر این جهت افزایش کارایی واکسن ژنی باید از روشهایی که سبب پایداری بیشتر پلاسمید در بافت قبل از ورود آن به سلول و یا افزایش سرعت ورود پلاسمید و همچنین کاهش سرعت تجزیه آن می شونداستفاده نمود.

استفاده از لیپوزوم ها، پلیمرها و انواع روشهای کپسوله نمودن پلاسمید در درون مواد مختلف می تواند سبب افزایش نیمه عمر آن در بافت گردد که در بخشهای دیگر به آنها اشاره خواهیم کرد. این مواد سبب افزایش میزان انتقال پلاسمید به سلولها نیز می شوند . استفاده از گیرنده های اختصاصی سلولی نیز می تواند سبب افزایش اتصال اختصاصی واکسن ژنی به سلولهای مورد نظر گردد . بعنوان نمونه جهت انتقال اختصاصی واکسن ژنی به سلولهای کبدی میتوان از گیرنده های آسیالو گلایکو پروتئین (Asiaaloglycoprotein) همراه با پلاسمید استفاده کردو مشخص شده است که تجویز وریدی این مخلوط سبب ورود اختصاصی پلاسمید به سلولهای کبدی می شود.

از روشهای دیگر، افزایش اندوسیتوز است مشخص شده که پروتئینهای خاصی از ویروس انفلوآنزا و ویروس سندایی (Sendai Virus)سبب افزایش اندوسیتوز می شوند.

شکل : ساختمان یک پلاسمید جدید واکسن ژنی حاوی دو واحد تولید پروتئین پادگن و واحد القاء سیستم ایمنی

پلاسمیدهای خطی کوچک

باتوجه به اهمیت حذف ردیفهای ژنی غیر ضروری از ساختمان پلاسمید واکسن ژنی وافزایش سطح ایمنی آن در بررسیهای کلینیکی تلاش جهت تهیه پلاسمیدهایی که ضمن انجام وظایف خود فاقد هیچگونه عوارض احتمالی باشد ازجمله اهداف تحقیقات در عرصه واکسنهای ژنی است . ازجمله این موارد تهیه پلاسمید بسیار کوچک خطی (غیر حلقوی) است که در تحقیقات وبررسیهای اولیه وکلینیکی واکسنهای ژنی جهت پیشگیری ودرمان کاربردگسترده ای یافته است . این وکتور که موسوم به (MIDGE) Minimalistic Immunologically Defined Gene Expression می باشد بسیار کوچک بوده و تهیه کنندگان این حامل واکسن ژنی معتقدند که قرار دادن ژن مورد نظر در این پلاسمید، علاوه بر پاسخ ایمنی بسیار مناسب فاقد هر گونه واکنش سیستم ایمنی بر علیه وکتور است ۰این وکتور فاقد ردیفهای غیر ضروری است که نقشی در فعالیت اصلی واکسن ژنی ندارند ۰ ساختمان این پلاسمید که ۲/۵ تا ۵ برابر کوچکتر از پلاسمیدهای واکسنهای ژنی است از یک پیش برنده (promotor)، ژن مورد نظر، ردیفهای پایدار کننده RNA که توسط دو ردیف کوچک سنجاق سر مانند (short hairpin oligonucleotide) پیوند خورده است.

علاوه برآن با اضافه کردن بخشهای کوچکی به وکتور سبب اختصاصی شدن فعالیت وکتور در یک بافت خاص می شوند این وکتور در مقایسه با پلاسمیدهای متدوال واکسن ژنی قدرت نفوذ بیشتری به سلولها دارد وبهمین دلیل مقادیر کمی ازان سیستم ایمنی را در حدمناسب تنحریکمی نماید ۰ازاین وکتور جدید در تحقیقات و کاربردهای درمانی مانند انتقال اینترلوکین ۷ و GM-CSFدر سرطان دستگاه ادراری استفاده شده است ۰

شکل وکتور جدید MIDGE

توانایيها ومزایای واکسنهای ژنی :

۱- عدم ایجاد عفونت.

واکسنهای ژنی با اینکه مانند واکسنهای ویروسی ضعیف شده عمل می کنند ولیکن بدلیل غیر زنده بودن امکان ایجاد عفونت در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی را ندارند در حالیکه واکسنهای زنده ضعیف شده علاوه بر این مشکل امکان باز گشت قدرت بیماریزایی و در نتیجه حاد شدن را دارند.

۲- تحریک ایمنی خونی، سلولی و مخاطی.

مزیت واکسنهای ژنی به واکسنهای نوترکیب پروتئینی قدرت تحریک سیستم ایمنی خونی و سلولی است در حالی که واکسنهای نوترکیب پروتئینی تنها سیسم ایمنی خونی را تحریک می نمایند.

۳- تولید پادتن بر علیه نوع طبیعی پادگن .

برخلاف واکسنهای نوترکیب که پروتئین در یک میکروب تولید شده و پس از استخراج و خالص سازی مصرف می گردد که می تواند در این مراحل فاقد شکل طبیعی پروتئین باشد که سبب تحریک ضعیفتر سیستم ایمنی می شود، در واکسنهای ژنی بدلیل القاء ژن در درون سلولهای بدن تمام مراحل شکل پذیری پروتئین بطور طبیعی صورت گرفته و ساختمان نهایی پروتئین ایمنی زا کاملا بشکل موجود در ساختمان میکروب است بنابر این پاسخ ایمنی بر علیه آن کاملا مشابه پاسخ ایمنی بر علیه میکروب بیماریزا بوده و بهمین دلیل کاملا اختصاصی می باشد.

۴- توان ایمنسازی بر علیه چندین سویه مختلف را دارد.

نشان داده شده که واکسنهای ژنی تهیه شده بر علیه یک سویه قادر به ایجاد ایمنی بر علیه ژنوتیپ و سروتیپ های متفاوت آن سویه می باشد . این مزیت ارزش بسیاری در مقابله با میکروبهای با تنوع پادگنی Antigenic Variation دارد. تزیق پلاسمید حاوی ژن رمز کننده نوکلئو پروتئین ویروس آنفلوانزای انسانی در موش آزمایشگاهی نه تنها سبب حفاظت بر علیه سویه اصلی گردیده بلکه سبب ایمنی بر علیه سویه های دیگر نیز شده است . این ایمنی متقاطع می تواند کاربرد ارزشمندی در تهیه واکسن انفلوانزا داشته باشد.

۵- ایمنی پایدار.

طول دوره ایمنی د ر واکسنهای ژنی بسیار بالاست . علت این امر ترشح داخل سلولی و تدریجی مقادیر اندک انتی ژن و دخالت عناصر مختلف سیستم ایمنی در ایجاد حافظه طولانی ایمنی است که سبب پایداری این واکسن می شود .

۶- نیاز به مقدار بسیار کمتر واکسن در مقایسه با سایر واکسنها (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ بار کمتر).

۷- عدم واکنش سیستم ایمنی به وکتور تزریقی و عدم تولید پادتن بر علیه سلولهای گیرنده وکتور (رفع مشکل پاسخ ایمنی بر علیه حامل زنده یعنی واکسنهای باکتریال - ویروسی زنده ویا وکتورهای ویروسی)

۸- تولید پادگن حفاظت دهنده در شکل کاملا طبیعی و ارائه مناسب پادگن به سیستم ایمنی .

۹- امکان تولید واکسنهای چندگانه.

۱۰- سهولت و سرعت در تولید انبوه ومشابه بودن مراحل تولید واکسنهای مختلف.(Generic production)

۱۱ -سهولت مراحل کنترل کیفی واکسن .

۱۲- پایداری در دماهای مختلف .

یکی از مزایای مهم واکسنهای ژنی نسبت به تمام واکسنهای دیگر اینست که تجویز آن در نوزادان که پادتنهای مادری در جریان خون آنان وجود دارد به هیچ وجه سبب کاهش کارایی واکسن نمی گردد زیرا پادتنهای مادری قادر به شناسایی واکسن ژنی نیستند در حالی که پادتنهای مادری سبب کاهش کارایی واکسنهای متداول در نوزادان می گردد. همچنین استفاده از واکسنهای ضعیف شده در افرادی که دچار نقص سیستم ایمنی هستند خطرناک است ولی واکسنهای ژنی خطری ندارند.

مدلهای حیوانی واکسنهای ژنی :

علاوه بر بررسی فعالیت واکسنهای ژنی (عمدتا بر علیه عوامل ویروسی و استفاده از پادتن های پوششی و یروسها) در کشتهای مختلف سلولی بدلیل ضرورت القاء ژن در سلولهای عالی و فعالیت مشابه واکسنهای ژنی با عفونتهای ویروسی از مدلهای مختلف حیوانی نیز جهت این بررسیها استفاده می شود . اگرچه واکسنهای ژنی بر علیه سایر میکروبها و انگلها نیز بررسی شده است . شایعترین و آسان ترین مدل حیوانی جهت بررسیهای اولیه واکسنهای ژنی موش سفید آزمایشگاهی از نوع بالب سی است که انواع واکسنهای ژنی در آن بررسی شده است . واکنش ایمنی با تولید پادتن غالبا از رده IgG است که نشان دهنده واکنش وابسته به سلولهای T می باشد . در مورد واکسن ژنی هپاتیت B پاسخ ایمنی خونی بمقدار بسیاری مشابه پاسخ ایمنی انسان به عفونت با ویروس هپاتیت شبیه است . واکنش ایمنی سلولی و ترشح سایتوکینها در مدلهای حیوانی مختلفی بررسی شده و نشان دهنده فعالیت نوع Th1 است که مشخصه آن ترشح اینترلوکین ۲ و انترفرون می باشد . پایداری واکنش ایمنی می تواند طولانی باشد و در مورد واکسن ژنی هپاتیت Bك۱۹ ماه مشاهده شده است . فعال شدن قوی لنفوسیتهای سایتوتوکسیک در واکسنهای ژنی یکی از مزایای ویژه این روش ایمن سازی است زیرا پاکسازی سلولهای الوده به ویروس توسط این سلولها صورت می گیرد و قبل از کشف این روش در تحقیقات واکسن سازی تلاش بسیاری جهت ایجاد این فعالیت در واکسنهای فاقد آن صورت می گرفت . یکی از

بررسیهای اساسی با بهره گیری از این فعالیت در واکسنهای ژنی مطالعه امکان ایمنی زایی واکسن ژنی انفلوانزا بر علیه سویه های مختلف و با تغییر آنتی ژنی فصل ی در این ویروس بود و مشخص گردید که با استفاده از واکسن ژنی حاوی ردیفهای مشترک از نوکلئو پروتئین ایمنی بر علیه ویروسهای دیگری که واجد ردیف مشترک در نوکلئو پروتئین ولیکن متفاوت در هماگلوتینین بوده اند ایجاد شده است .

مرحله نهایی بررسی ایمنی زایی واکسنهای ژن ی در مدلهای حیوانی آزمایش قدرت ایمنی زایی و حفاظت واکسن در مقابل ایجاد عفونت با وارد نمودن میکروب بیماریزا به حیوان میباشد (challenge). تاکنون بیشترین بررسیها بروی ویروس انفلوانزا ، هپاتیت B ، هاری ، پلاسمودیوم یولی و مایکوپلاسما پولمونیس انجام شده است . در جدول .... واکسنهای ژنی ومدلهای حیوانی برررسی شده دیده می شود .

جدول : مدلهای حیوانی واکسنهای ژنی برای عوامل عفونی

PATHOGEN	ANTIGENS USED	ANIMAL SPECIES
Borrelia burgdorferi (Lyme Disease)	OspA	Mice
Bovine Herpesvirus	Glycoprotein	Cattle; Mice
Bovine Viral Diarrhea Virus	Major glycoprotein gp53 (E2)	Mice
Cytomegalovirus (human)	ppUL83	Mice
Cytomegalovirus (murine)	pp89	Mice
Encephalitis virus SLE (St. Louis strain)	prM/E	Mice
Feline Immunodeficiency Virus	Entire FIV genome (virus production)	Cats
Hepatitis B Virus	Envelope/HBsAg (HBV surface antigen) Capsid/HBcAg (HBV core antigen)	Chimpanzee; Mice; Rabbit; Rat
Hepatitis C Virus	Core/Nucleocapsid; Nucleocapsid-HBsAg fusion protein; Envelope glycoprotein E2	Mice
Herpes Simplex Virus	Glycoprotein B; Glycoprotein D; gD2; ICP27	Mice; Guinea pigs
Human Immunodeficiency Virus-1	Envelope glycoprotein gp160; Noninfectious particles	Mice; Non-human primates
Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV)	Nucleoprotein; Glycoprotein	Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)
Influenza Virus	Hemagglutinin; Matrix protein;	Chicken; Ferrets;

	Nucleoprotein	Mice; Non-human primates
Leishmania major	Major surface glycoprotein gp63	Mice
Lymphocytic Choriomeningitis Virus	Glycoprotein; Nucleoprotein	Mice
Measles Virus	Nucleocapsid; Hemagglutinin	Mice
Mycobacterium tuberculosis	M. leprae hsp65; Antigen 85	Mice
Mycoplasma pulmonis	M. pulmonis DNA; M. pulmonis DNA expression library; Antigens A7-1 and A8-1	Mice
Newcastle Disease Virus	F Protein	Chicken
Papillomavirus	Major capsid protein L1	Cottontail rabbit
Plasmodium yoelii	Circumsporozoite protein; PyHEP17	Mice
Prion Proteins	Cellular prion (PRNP)	Mice (PrP0/0)
Pseudorabies Virus	gD Glycoprotein	Piglets
Rabies Virus	Glycoprotein	Mice
Rotavirus	Envelope; VP4, VP6, VP7	Mice
Schistosoma japonicum	Paramyosin (Sj97)	Mice
Simian Immunodeficiency Virus	Env; Gag	Monkeys
Tetanus Toxin	Fragment C	Mice
Toxoplasma gondii	p30 Protein	Mice

دیگر مزایای واکسنهای ژنی :

از دیگر مزایای واکسنهای ژنی امکان پیوند ژن رمزکنن ده چندین پادگن مختلف از عوامل عفونی ویروسی، باکتریال و انگلی و تهیه واکسنی است که میتواند بر علیه چندین عامل عفونی مختلف بطور همزمان ایجاد ایمنی کند.

مزیت دیگر واکسنهای ژنی عدم نیاز به استفاده از یاور (Adjuvant) است که در واکسنهای متداول و نوترکیب مصرف میشود و با توجه باینکه پادگن در درون سلولهای بدن تولید و در سطح سلولها ابراز می یابد دارای ساختمان کاملا مشابه پادگن در مقایسه با تولید پادگن در خارج از بدن توسط میکروبها ست (که در تولید واکسنهای پروتئینی نوترکیب صورت میگیرد) به همین دلیل واکنش سیستم ایمنی بر علیه ان بسیار قوی و ایمنی بسیار پایدار خواهد بود . البته با توجه به کارایی مناسب یاورهای تایید شده در واکسنهای موجود بررسی جهت استفاده از یاورهای مناسب و بی خطر جهت افزایش کارایی واکسن ژنی و کاهش مقدار واکسن ژنی مصرفی ادامه دارد.

مزیت دیگر عدم واکنشهای حس اسیتی در نتیجه تزریق مجدد واکسن است . با توجه به اینکه پروتئین تولیدی توسط

سلولهای گیرنده وکتور به آرامی وارد جریان خون می شوند و بر خلاف سایر روشهای ایمن سازی که پروتئین یا واکسن بطور ناگهانی وارد جریان خون شده و سبب واکنشهای حساسیتی و آنافیلاکسی میگردد در مورد واکسنهای ژنی واکنشهای حساسیتی و آنافیلاکسی وجود ندارد و میتوان بارها از واکسن استفاده نمود.

استفاده از روش جدیدی موسوم به ایمن سازی با کتابخانه ژنی (Expression Library Immunization) ELI که در واکسن ژنی ضد عفونت مایکو پلاسمایی مورد ازمایش قرار گرفته است نیز بررسی شده است. بدین صورت که کتابخانه ژنی از ژنوم عامل عفونی در پلاسمید حاوی پیش برنده مناسب تهیه می شود به نحوی که هر پلاسمید شامل بخشی از ژنوم عامل عفونی باشد . این پلاسمید ها از نظر ایمنی زایی ژن موجود در آنها و تحریک سیستم ایمنی سلولی و خونی در گروههای چندتایی بعنوان واکسن در حیوان آزمایشگاهی مورداستفاده قرار میگیرد. سپس با شناسایی گروههای با ایمنی قوی تر، هر پلاسمید بطور جداگانه بررسی می شود . در نتیجه واکنش معادل واکسن زنده بدون خطر آلودگی به عامل عفونی ایجاد میشود. بدین روش میتوان در مدت کوتاهی پادگن ایمنی زا و حفاظت دهنده مناسب یک عامل عفونی را شناسایی نمود . در عین حال از این روش می توان واکسنی حاوی چند ژن میکروبی جهت بهترین پاسخ ایمنی تهیه نمود . بررسی ها نشان داده است که حتی کتابخانه ای شامل برخی از ژنهای عامل عفونی مایکو پلاسما پولمونیس Mycoplasma pulmonis که یک پاتوژن طبیعی در جوندگان است بر علیه این عفونت ایمنی کامل میدهد .

ایمنسازی بر علیه لیشمانیا ماجور L. major با تزریق عضلانی کتابخانه ژنی نشان داده است که یک گروه حاوی تعدادی پلاسمید (که هر کدام واجد بخش کوچکی از ژنوم انگل ا ست) سبب پاسخ ایمنی و حفاظت دهنده بسیار قوی شده و سبب تاخیر ایجاضایعه در موش بسیار حساس یه این انگل می شو.

برای بسیاری از بیماریهای عفونی انسانی و دامی که واکسنهای متداول برای آنها وجود ندارند، میتوان واکسنهای ژنی تهیه نمود در این عرصه واکسن ژنی تب برفکی و هرپس گاوی نتایج خوبی داشته است و در اینده انواع واکسنهای ژنی ضد بیماریهای دامی واردبازار خواهد شد.

واکسنهای ژنی در موارد زیر نیز دارای اهمیت و ارزش بسار هستند :

- زمانی که خالص سازی یک پروتئین مشکل باشد و یا در هنگام خالص سازی ساختمان طبیعی آن دچار اختلا ل شود.
- وقتی که یک پروتئین ناشناخته است اما ژن آن شناسایی شده میتوان انرا از طریق واکسیناسیون ژنی مورد بررسی قرار داد . و یا بسهولت میتوان ایمنی زاترین پروتئین را از بین چند پروتئین شناسایی نمود.

بعنوان متال در یک بررسی جهت شناسایی ایمنی زاترین پروتئین ا ز بین سه ژن شناخته شده میکروب سل از ایمن سازی ژنی استفاده شده است . مقایسه ۳ واکسن ژنی حاوی ژنهای PstS-1, PstS-2, PstS-3 رمز کننده پروتئینهای گیرنده های متصل شونده به فسفات phosphate-binding receptor (PstS) در موش آزمایشگاهی نشان داد که آنتی ژن PstS-3 بهترین ایمنی را در مقابل تزریق باکتری عفونی داشته و می تواند بعنوان پادگن مناسب واکسن ژنی سل استفاده شود.

- از آنتی بادی های حاصل از ایمن سازی ژنی می توان جهت خالص سازی پروتئین مربوطه استفاده نمود.
- می توان از ژنهای همراه مانند پروتئینهای ترشحی جهت بارز شدن پروتئینهای داخل سلولی استفاده کرد .
- پروتئینهایی که خاصیت آنتی ژنی ضعیفی دارند را میتوان به همراه کردن با یک پروتئین ایمنی زا دارای فعالیت مناسب ایمنی نمود.

کلوبردهای دیگر واکسنهای ژنی :

از واکسنهای ژنی می توان جهت تولید دارو و درمان استفاده کرد . جهت رفع کمبود پروتئین هایی که فقدان یا کمبود

آنها بیماریزاست، میتوان بجای تزریق دارو ازحامل ژنتیکی واجد ژن رمز کننده آن استفاده کرد . بدین صورت پروتئین مورد نیاز در بدن بیمار بمقدار مناسب تولید خواهد شد . آزمایشات نشان داده است که تزریق حامل ژنتیکی واجد ژن هورمون رشد گاوی در گاوهای شیرده، توانسته است در بدن گاوبه مقادیر لازم هورمون رشد تولید کند که همانند تزریق مستقیم هورمون رشد، میزان تولید گوشت و شیررا افزایش میدهد.

در همین زمینه استفاده از حامل حاوی پیش برنده RSV (Rous sarcoma virus) و ژن هورمون رشد و تزریق ۵۰ میکروگرم آن به عضله قلب موش و اندازه گیری میزان هورمون رشد انسانی در سرم و عصاره قلب موش بروش رادیو ایمونو اسی ۴ تا ۱۲ روز پس از تزریق DNA نشان داده است که در سرم بمیزان ۳/. نانوگرم به میلی لیتر و در عصاره قلب تا ۱۶ نانوگرم به میلی لیتر هورمون رشد انسانی وجود دارد (میزان هورمون رشد طبیعی در انسان بین ۱/. تا ۲۵ نانوگرم درمیلی لیتر میباشد . بنابراین عضله قلب محل مناسبی برای القاء ژن نمیباشد و باید بافتهای دیگری جهت کاربردهای درمانی هورمون رشد در نظر گرفته شود . در تجربه دیگری پلاسمید حاوی ژن هورمون رشد ا نسانی تحت کنترل پیش برنده ویروس سایتومگال بکمک تفنگ ژنی به سلولهای پوست موش بزرگ آزمایشگاهی وارد گردید. آزمایش بافت پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از ورود پلاسمید بروش رادیوایمونواسی نشان داد که تا میزان ۲۱۸ نانوگرم در میلی لیتر پس از ۴۸ ساعت از ورود پلاسمید، هورمون رشد تولید شده است .

با استفاده از همین سیستم امکان تولید فاکتور ۸ خونی برای درمان بیماران مبتلا به هموفیلی مورد بررسی میباشد و امیدهایی را برای رهایی از تزریق دائمی فاکتورهای خونی که احتمال الودگیهای ویروسی را دارند ایجاد کرده است .

بهمین طریق میتوان سایر مواد اساسی سیستم ایمنی، پادتن های تک دودمانی، فاکتورهای خونی و داروهایی را که ژنهای آنها شناسایی و امکان تولید بروش نوترکیب دارند را بروش واکسن ژنی تهیه و بکار برد (۱۰) .

ژن درمانی و ایمنی درمانی بکمک واکسیناسیون ژنی

از DNA بعنوان دارو پیش از این نیز استفاده شده است . شکل زیر از کتاب مرجع پزشکان فرانسه است که شیشه حاوی DNA باوزن ملکولی بسیار بالا از منشاء اسپرم ماهی سفید است واز ان برای بهبود زخمها و درمان عوارض مختلف استفاده می شده . روشهای تجویز بشکل تزریق عضلانی با میزان تجویز ۲۵۰-۱۲۵ میلی گرم در روز ، یا قرار دادن بروی زخم بشکل خمیر و همچنین قرصهای حاوی ۱۲۵ میلی گرمی بوده . این دارو تا سال ۱۹۶۶ در داروخانه های فرانسه عرضه می شد.

همچنانکه اشاره شد تزریق واکسن ژنی هپاتیت B می تواند سبب کنترل عفونت مزمن هپاتیت شود درمان هپاتیت C مزمن نیز مشکل است . داروی انتخابی در مان هپاتیت C مزمن در حال حاضر اینترفرون آلفا است که جهت کاهش مناسب ژنوم ویروس در گردش خون لازم است بمدت طولانی این دارو تزریق گردد زیرا مشاهده شده که پس از اولین تجویز اینتر فرون الفا میزان RNA ویروسی کاهش می یابد ولیکن پس از ۴۸ ساعت مجددا افزایش پیدا می کند بنابراین تجویز باید ادامه یابد . استفاده از واکسن ژنی سبب کاهش میزان ویروس می گردد.

آخیرا یک گروه تحقیقاتی در شرکت Epimmune با استفاده از برنامه ای رایانه موسوم به سیستم شناسایی اپی توپ (Epitope Identification System (EIS که قادر به شناسایی بخشهای ایمنی زای موجود در پروتئینهای عوامل عفونی و سلولهای سرطانی روش نوینی برای تهیه واکسن جدید ضد هپاتیت C ابداع نموده است . در این روش پس از بررسی ژنوم ویروس هپاتیت سی بخشهای ایمنی زای مشترک بین ژنوتایپهای مختلف ویروس شناسایی می شوند و سپس با تهیه واکسنی ژنی واجد مجموعه این زیر واحدها پرداخته می شود و امید می رود این واکسن بتواند بر علیه تمام آنان ایمنی مناسب ایجاد نماید . کشف این پدیده با مطالعه سیستم ایمنی افرادی که قادر به چیره گی بر عفونت حاد هپاتیت سی و ایدز می شوند ناشی شده است . بنظر می رسد پا کسازی ویروس در این افراد بدلیل فعالیت قوی سیستم ایمنی سلولی انها می باشد . واکسن تهیه شده توسط این گروه قادر به ایجاد ایمنی سلولی قوی برعلیه این

ویروس است .

بیماری سل نیز بعنوان یکی از شایع ترین عفونتهای جهان با مرگ ومیر سالانه ۳ میلیون نفر در سراسر جهان با مشکلات درمانی بسیاری مواجه است . علت این امر عدم واکنش مناسب سیستم ایمنی در مقابل عفونت و برتری میزان رشد باکتری به پاسخ ایمنی است . با اینکه واکسن موجود ضد سل بطور گسترده ای استفاده می شود ولی قادر به پوشش مناسب ایمنی نبوده و ضعفهایی دارد. در عین حال درمان کامل سل نیازمند درمان طولانی و پیگیر بیمار است که بسیار مشکل بوده و ضرورت بستری کردن بیمار در بخشهای درمان سل را ایجاب می نماید که پر هزینه می باشد . و علاوه بر این مشکلات انواع مقاوم باسیل سل به داروهای موجود نیز در حال افزایش است . بدین لحاظ ایمنی درمانی DNA Immunoteraphy بیمار مبتلا به سل به روش واکسن ژنی جهت ایجاد ایمنی مناسب بر علیه این میکروب می تواند روشی بسیار مناسب و عملی باشد . بررسی واکسن ژنی ضد سل در حیوانات آزمایشگاهی نشان داده است که علاوه بر نقش ایمنی زایی واکسن ، قادر است نقش درمانی بسیار قوی در موش آزمایشگاهی بشدت عفونی با میکروب سل داشته باشد و این عمل با تغییر مسیر پاسخ ایمنی بنحوی که قادر به مقابله با میکروب باشد صورت می گیرد که در عفونت با میکروب و یا تجویز واکسن متداول سل امکانپذیر نیست . تلفیق روش ژن درمانی با واکسن ژنی همراه با درمانهای متداول می تواند سبب تسریع درمان عفونت ها گردد.

ژن درمانی برخی از اختلالات ژنتیکی را میتوان با وارد کردن وکتور حامل ژن سالم جهت جایگزینی ژن معیوب یا مفقود جبران نمود.

از این روش می توان در ژن در مانی بیماری دیستروفی عضلانی دوشن استفاده کرد . با تزریق عضلانی واکسن ژنی حاوی ژن کوتاه شده رمز کننده دیستروفین به بیماران (فقدان آن سبب ضعف عضلات می شود) نقص فقدان این پروتئین می تواند برطرف گردد . قبلاً از سلولها در ژن درمانی استفاده شده است و از آن جمله انتقال سلولهای میوبلاست Myoblast transfer در درمان دیستروفی عضلانی نوع دوشن Dochen muscular dystrophy میباشد. ژن درمانی دیستروفی عضلانی دوشن با استفاده از واکسن ژنی حاوی ژن دیستروفین مراحل ازمایشی خود را طی میکند .

ژن درمانی فیبروز کیستی با استفاده از مصرف استنشاقی وکتور حاوی ژن رمز کننده پروتئین CFTR (Cystic fibrosis transmembran conductance regulator) همراه با لیپوزوم در حیوانات آزمایشگاهی نتایج بسیار خوبی را نشان داده است و اولین مرحله بررسی کلینیکی ژن درمانی این بیماری به روش واکسن ژنی در انسان آغاز شده است

تزریق واکسن ژنی حاوی بخشی از DNA زنجیره B انسولین سبب کاهش ۵۰٪ بروز دیابت وابسته به انسولین insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) در موش می شود . جهت مبتلا نمودن موشها به این بیماری از ژن نوکلئو پروتئین ویروس lymphocytic choriomeningitis پیوند شده به سلولهای بتا استفاده می شود که در نتیجه القاء ژن دیابت ایجاد می شود. بنابزاین تزریق واکسن ژنی حاوی ژنهای خودی می تواند روشی جهت پیشگیری از بیماریهای خود ایمن باشد .

استفاده از روش ژن درمانی بروش واکسیناسیون ژنی جهت درمان بیماریهای قلبی- عروقی مورد بررسی بوده است . درمان بیمارن مبتلا به ایسکمی و مرگ سلولهای عروق قلبی coronary artery disease با تزریق ژن فاکتور رشد سلولهای اندوتلیال علاوقی Vascular Endothelial Growth Factor-2 (VEGF-2) در مرحله آزمایش کلینیکی بروی بیماران می باشد.

واکسنهای ضد سرطان یا ایمنی درمانی سرطان :

شناسایی آنتی ژنهای اختصاصی در سلولهای سرطانی که تحریک سیستم ایمنی بر علیه آن می تواند سبب تهاجم

سلولهای کشنده سیستم ایمنی به سلولهای سرطانی شود مبنای روش جدیدی جهت درمان سرطان است که به آن واکسنهای ضد سرطان (چون اغلب واکسنها جهت پیشگیری از ابتلا به بیماریهای عفونی بکار برده می شود) و یا ایمنی درمانی سرطان گفته می شود.

کشف آنتی ژن اختصاصی سلولهای سرطان ملانوما بنام MAGE-1 تحول عمده ای را در این زمینه ایجاد نمود این اولین آنتی ژن اختصاصی تومور بود که شناخته شد. و بر همین اساس اولین واکسن ضد سرطان ملانوما و سرطان سینه موسوم به MAGEVAC ساخته شد . بدنبال آن انتی ژنهای اختصاصی تری به نامهای MART-1 and gp100 شناسایی شد . بررسی آزمایشی واکسن ژنی ضد سرطان ملانوما واجد آنتی ژن gp100 بروی بیماران مبتلا به ملانومای منتشر Metastatic Melanoma آغاز شده است . این روش درمانی توسط موسسه ملی سرطان National Cancer Institute (NCI) با تزریق ۴ دوز واکسن ژنی با فاصله ۴ هفته بصورت واکسن ژنی خالص و یا همراه با ژن اینترلوکین ۲ بروی گروه زیادی از بیماران داوطلبی که بروشهای معمول درمان سرطان ملانومای منتشر پاسخ نداده اند و حداقل ۳ ماه زنده خواهند ماند انجام می شود این واکسنها به دو روش تهیه می شوند :

وارد کردن ژن در یک ویروس حامل و یا واکسن ژنی مانند درمان سرطان با استفاده از حامل ژنتیکی رمز کننده پروتئین کلاس MHC1 HLA/B7 در انسان که مورد بررسی قرار گرفته است . در این روش DNA مستقیما به داخل غده سرطانی تزریق می شود . در تجربه دیگری پلاسمید حاوی ژن پادگن بزرگ سرطانزای T-ag ویروس Simian virus به موش تزریق شد تا امکان ایمنسازی بر علیه سرطان بررسی شود (این ویروس میتواند در موش غدد سرطانی کشنده تولید کند) این تجربه نشان داد که موشها نسبت به سرطان مقاوم شده اند. نتایج حاصل از این تجربیات میتواند راههای جدیدی را در مبارزه با سرطان مطرح سازد.

سه داروی ژنتیکی ضد سرطان اینک مرحله آزمایش بروی انسان را طی می کنند Allovectin-7. که یک واکسن ژنی واجد ژن رمز کننده آنتی ژن HLA-B7 همراه با لیپید است استفاده می شود و در مرحله دوم آزمایش بروی بیماران مبتلا به سرطان سرو گردن و ملانوما (نوعی سرطان پوست) اسـت. درمان بیماری در مراحل اولیه که سلولهای سرطانی در یک منطقه خاص متمرکز هستند با جراحی امکان پذیر است . در صورت عدم درمان بیماری به غدد لنفاوی مجاور، ریه ها ، کبد ، مغز و سایر مناطق منتقل می شود که به این مرحله (مرحله سوم) متاستاتیک ملانوما می گویند که با جراحی و شیمی درمانی امکان درمان دارد ولیکن با ورود به مرحله چهارم رادیو درمانی نیز به آن اضافه می شود و درمان بسیار مشکل است . داروی جدید امیدی را جهت درمان این نوع بیماران ایجاد نموده است . داروی الووکتین ۷ بطور مستقیم به داخل غده سرطانی تزریق می شود . سلولهای سرطانی با دریافت این واکسن ژنی و القاء ژن، سیستم ایمنی بر علیه سلولهای توموری فعال شده و واکنشی مشابه رد پیوند رخ می دهد . اینگونه درمان می تواندعلاوه بر غده سرطانی تمام سلولهای سرطانی منتشر و یا پراکنده در مناطق دیگر را شناسایی و نابود نماید . بررسی های اولیه این دارو بروی بیماران مبتلا به نوع پیشرفته ملانوما توسط کمیته بررسی ایمنی دارو نشان داده است که هیچگونه عوارضی که مانع ادامه این بررسی باشد در بیماران دیده نشده است و آزمایشات جهت مرحله سوم می تواند ادامه یابد . در بررسی دیگری جهت درمان متاستاتیک ملانوما که مرحله لول ازمایشات بالینی ان اغاز گردیده است از واکسن ژنی حاوی دو بخش از ژنهای رمز کننده پروتئین تیروزیناز (پپتیدهای ۱۷-۱ و ۲۱۶-۲۰۷) استفاده می شود . قبلا مشخص شده که این بخشها واجد ردیفهایی است که با تجویز مکرر در بیماران مبتلا به ملانوما با اتصال به HLA-A2 سبب تحریک اختصاصی لنفوفوسیتهای T کشنده می شود.

Leuvectin واکسن ژنی دیگری است که یک مجموعه DNA-Lipid بوده و در مرحله دوم آزمایشات بروی بیماران مبتلا به سرطانهای کلیه ، سارکوما، پروستات و ملانوما می باشد . داروی Vaxid یک DNA واکسن در مرحله دوم آزمایش بروی بیماران مبتلا به سرطان لنفوما B-cell lymphoma می باشد . . سرطان سلولهای کبدی

Hepatocellular cancer که مقدمه سرطان کبد در نتیجه ابتلا به ویروس هپاتیت B می باشد یکی از شایعترین عوامل سرطان و مرگ و میر است (هرسال در حدود ۱/۲ میلیون مورد جدید به افراد مبتلا اضافه می شود) و درمان آن بروش ژن درمانی مورد بررسی قرار گرفته است . استفاده از بخش خاصی از الفا فتو پروتئین (alphafetoprotein) در واکسن ژنی و تزریق ژن به موش مبتلا به سرطان سلولهای کبدی سبب تاخیر در بروز سرطان کبد می شود . کشف این موضوع امید بسیاری را در تهیه واکسن ژنی جهت درمانی این سرطان ایجاد نموده است .

بررسی نقش آنتی ژنهای شناسایی شده در سرطان تخمدان جهت پیشگیری از رشد سلولهای توموری بروش ایمن سازی ژنتیکی کارایی ارزشمندی داشته است. یکی از آنتی ژنهایی که بطور اختصاصی توسط سلولهای سرطانی تخمدان ترشح می شود رسپتورفولات آلفا از پروتئینهای متصل شونده به فولات است Human folate receptor alpha (FR alpha) . تزریق واکسن ژنی حاوی این ژن در موش آزمایشگاهی سبب تاخیر شدید رشد غده سرطانی می شود . تزریق همزمان این واکسن ژنی واجد ژن FR alpha در کنار ژن اینترلوکین ۲ سبب افزایش زمان بقای حیوان و کاهش گسترش سلولهای سرطانی به ریه می گردد بنابر این از این روش میتوان حتی در درمان سرطانهای موجود تخمدان نیز استفاده کرد.

درمان مولتیپل میلوما Multiple Myeloma که یک اختلال شدید سلولهای پلاسمایی است توسط ایمن سازی با واکسن ژنی بررسی شده است . برای این کار ژنهای خاص توموری میلومای موش در پلاسمید واکسن ژنی کلون شده و نقش ان در کنترل بیماری در حال بررسی می باشد .

علاوه بر واکسن ژنی حاوی DNA ، واکسن ژنی حاوی RNA نیز جهت درمان سرطان بررسی شده است . استفاده از ژن رمز کننده پروتئین تقسیم شونده (RNA replicase polyprotein) ویروس Semliki forest virus و پیوند آن در کنار پادگن مورد نظر واکسن ژنی خود تکثیری (self-replicating RNA vaccine) تهیه شده که با یکبار تزریق عضلانی مقدار بسیار اندک ۰.۱میکروگرم این واکسن سبب پاسخ ایمنی مناسب ، تولید پاتن اختصاصی بر علیه پادگن و واکنش سلولی +CD8 شده است . تجویز این واکسن به موشها مانع ایجاد تومور در حیوانات شده و کاربرد درمانی آن در موشهای واجد غده سرطانی سبب طولان ی تر شدن عمر آنان می گردد . این RNA واکسن در مقایسه با DNA واکسن قادر به تولید مقادیر بیشتری از پروتئین پادگن در کشت سلولی نیست ولیکن کارایی بهتری در داخل بافت حیوان نشان می دهد و می تواند روش مناسبی جهت تهیه واکسنهای نوین ضد سرطان باشد.

تجویز استنشاقی پلاسمید حاوی ژن رمز کننده اینترلوکین ۱۲ همراه با یک پلیمرکاتیونیک سبب مهار متاستاز ریوی در موش می شود و حیوانی که این پلاسمید را دریافت کرده است در مقایسه با حیوانات شاهد عمری طولانی تر دارد و استفاده از این روش جایگزین مناسبتری نسبت به تزریق مستقیم اینتر لو کین ۱۲ (protein immunotherapy) می باشد .

در ژن درمانی بروش واکسن ژنی با تزریق مجموعه ای از DNA-RNA اختصاصی جهت اصلاح جهش تک بازی در ژن عامل انعقاد موش بزرگ آزمایشگاهی که سبب اختلال در انعقاد خون می شود مشخص شد که ژنهای سالم تزریقی با موفقیت وارد سلولهای کبدی شده و جایگزین محل جهش یافته شده و با اصلاح ژن معیوب انعقاد خون بحالت طبیعی بازگشته است

همچنین مشخص شده است که تزریق مستقیم ژن رمز کننده بتا اندورفین (یک ضد درد طبیعی) به اطراف اعصاب محل درد سبب کاهش درد می شود

CANCER	ANTIGENS OR IMMUNOTHERAPY USED	ANIMAL SPECIES
Cancer Immunotherapy	IL-2, IL-6 & GM-CSF delivery	Dogs
Anti-tumor CTL	CTL Epitopes: mutant p53, HIV gp120	Mice
B-Cell Lymphoma	Idiotype; Idiotype GM-CSF fusion; scFv-GM-CSF fusion; scFv-IL-1beta fusion	Mice
Melanoma (B16 Cells)	MAGE-1, MAGE-3 and GM-CSF & B7-1 co-delivery; mGM-CSF delivery	Mice
Metastases	Model tumor antigen IL-12 delivery	Mice
Proto-Oncogene	p185erbB2/neu	Mice
Renca Tumor Cells	IL-12 delivery	Mice
SV40 Virus	Large T antigen	Mice

جدول مدلهای حیوانی واکسن ژنی جهت درمان سرطان

ژن درمانی الرژی بروش ایمنسازی با واکسن ژنی :

استفاده از واکسن ژنی دردرمان الرژی های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است . الرژی های غذایی مانند حساسیت به بادام زمینی که عوارض خطرناکی مانند شوک انافیلاکسی را نیز می تواند داشته باشد و هیچ گونه در مان قاطعی نیز برای آن وجود ندارد از جمله این حساسیتها هستند . مشخص شده که استفاده از واکسن ژنی حاوی ژن رمز کننده پروتئین الرژن بادام زمینی (rah2) پیوند شده به پلاسمید PCMV همراه با ماده کیتوزان (یک پلیمر پلی ساکاریدی زیستی) سبب القاء ژن و تولید پروتئین مربوطه در اپیتلیوم دستگاه گوارش شده است که سیستم ایمنی را تحریک و در نتیجه سبب تولید IgA ترشحی مخاطی و IgG2a سرمی گردیده است که در مقایسه با موشهای شاهدی که واکسن ژنی را در یافت نکرده بودند مقدار IgE پلاسما و همچنین انافیلاکسی ناشی از الرژن و میزان هیستامین بشدت کاهش یافته بود. بنابر این واکسیناسیون ژنی می تواند روشی جهت در مان الرژی نیز باشد (۸۷). اخیرا نتایج مرحله اول ازمایش کلینیکی یک روش درمانی ضد الرژی با استفاده از DNA در پنجاه و ششمین کنگره سالانه اکادمی علوم الرژی ، اسم و ایمنی شناسی امریکا در مارس سال ۲۰۰۰ ارائه شد. یکی از روشهای متداول درمان حساسیت شدید به مواد ، تجویز تدریجی مقادیر اندک این مواد بمدت طولانی است که سبب کاهش پاسخ ایمنی و در نتیجه کاهش عوارض حساسیت می شود. ولیکن این روش در طول درمان عوارضی دارد که سبب بروز مشکلات واکنشهای حاد برای بیماران بسیار حساس می شود. در روش ایمنی درمانی جدید از ترکیبی از الرژن خالص همراه با بخش خاصی از DNA استفاده می شود . در این تحقیق که توسط محققین شرکت Dynavax انجام شده است از ماده حساسیت زای یک نوع گیاه بنام purified ragweed allergen (Amb a 1) همراه با واکسن ژنی حاوی ردیفهای ایمنی زای تحریک کننده سیستم ایمنی استفاده شده است . مقایسه واکنش الرژیک از طریق ازمایش پوستی ۶ فرد حساس به این ماده

نشان داد که استفاده از الرژن حاوی DNA در مقایسه با الرژن خالص استخراج شده از گیاه عو ارض بسیار خفیف تری را ایجاد می نماید . توسعه این روش می تواند به روشهای جدید ایمنی درمانی الرژی دفعات کمتر تزریق و عوارض کمتر منجر گردد.

در درمان آسم نیز تزریق سکانسهای القاء کننده سیستم ایمنی واجد بخشهای CpG نشان داده است که قادر به مهار کردن واکنش های ا لتهابی، حساسیتی حاصل از تولید سایتوکینهای وابسته به سیستم Th2 و ائوزینوفیلی مجاری تنفسی می باشد . مشخص شده که این ردیفها سبب القاء و تولید سایتوکینها (اینتر فرون گاما) شده بشدت سبب مهار تولید سایتوکینهای مسیر Th2 یعنی اینترلوکین ۵ و التهاب ائوزینوفیلی می شود.

علاوه بر این کاربردها تحقیقات بروی واکسنهای ژنی سبب روشن شدن بسیاری از سئوالات در زمینه ایمنی شناسی واکسنها مانند نحوه ارائه پادگن به سیستم ایمنی ، نقش سلولهای مختلف در پاسخ ایمنی و عوامل تنظیم ایمنی خواهد شد

ALLERGY MODEL	ANTIGEN	ANIMAL SPECIES
Adjuvant Arthritis	Mycobacterial hsp65	Rat
Autoimmune Disease (anti-DNA autoantibodies; glomerulonephritis; lupus; myositis)	Plasmid DNA	Mice
Autoimmune Encephalomyelitis Rheumatoid Arthritis	T-cell receptor	Mice
House Dust	Mite allergen (Der p 5)	Rat
Model Allergy (IgE)	Beta-Galactosidase	Mice
Systemic Lupus Erythematosus (SLE)	TGFbeta & IL-2 delivery	Mice (MRL/lpr/lpr)

جدول ..... مدلهای حیوانی بررسی شده واکسن ژنی در درمان الرژی

تولید پادتن توسط ایمن سازی ژنی :

با توجه به توانایی ایمن سازی ژنی در تحریک مناسب سیستم ایمنی سلولی و هومورال امکان بکارگیری ان در تولید پادتنهای چند دودمانی (پلی کلونال) و تک دودمانی (مونوکلونال) وجود دارد. با اینکه میزان پروتئین القا شده در اثر تزریق واکسن ژنی بسیار اندک و در حد پیکو گرو تا نانوگرم می باشد که بشیار کمتر از میزان پروتئین تزریقی در روش ایمنسازی متداول می باشد ولیکن تحریک سیستم ایمنی بسیار قوی است . همچنان که توضیح داده شد علت این امر دریافت انتی ژن توسط سلولهای دندرتیک می باشد که پیرو ان سلولهای دیگر سیستم ایمنی تحریک می شود . وجود ردیفهای CpG تحریک کننده سیستم ایمنی در واکسنهای ژنی سبب افزایش القائ سیستم ایمنی در مقایسه با

روشهای دیگر ایمن سازی است. تولید پادتنهای تک دودمانی و چند دودمانی در حیوانات مختلف ازمایشگاهی نشان داده شده و امروزه تعدادی از مراکز صنعتی اقدام به تولید پادتنهای اختصاصی با ارائه ردیف ژن مورد نظر بروش ایمن سازی ژنی می نمایند. حتی به این روش امکان تهیه کتابخانه های ژنی برای تهیه انتی بادی تک زنجیره ای single chain , libraries وجود داردبررسی مزیت ایمن سازی ژنی را در تولید انتی بادی بر علیه پادگن gp120 ویروس ایدر را نسبت به روشهای متداول اثبات نموده است. تحقیق مشابهی در تولید انتی بادی با تزریق پلاسمید حاوی ژن رمز کننده CD4 در مقایسه با تجویز پروتئین نوترکیب CD4 نشان داد که در روش پروتئین نوترکیب فقط دو موش از پنج موش تزریقی پادتن مناسب تولید نموده اند ولیکن در روش واکسن ژنی هر پنج موش قادر به تولید پادتن بوده اند . مزیت اساسی واکسنهای ژنی در این زمینه تولید داخلی پادگن، ساختمان طبیعی ان که شباهت بسیاری به انتی ژن طبیعی دارد و ارائه مناسب ان به سیستم ایمنی در مقایسه با پادگنهای تولید شده در باکتریها و سلولهای دیگر است . مقایسه تزریق پلاسمید حاوی ژن رمز کننده ovalbumin با تزریق مستقیم این پروتئین نشان داده است با اینکه مقدار IgG تولید شده در هر دو روش مشابه می باشد ولیکن پادتنهای حاصل از واکسن ژنی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر قدرت بیشتری جهت اتصال به پادگن مورد نظر دارند(High affinity and avidity). به نظر می رسد علاوه بر ساختمان طبیعی پروتئین تولید کمتر ان در ایمن سازی ژنی سبب تولید پادتنهای با قدرت اتصال بیشتر می شود به این روش می توان پادتنهای بسیار اختصاصی انسانی تولید نمود که کاربردهای درمانی دارد . با توجه به دشواری ها و مشکلاتی که در روشهای متداول تولید پادتنهای تک دودمانی با کیفیت بالا وجود دارد . ب روش تولید انتی بادی بدین شکل است که ژن رمز کننده ای که لازم است پادتن تک دودمانی بر علیه ان تولید شود در پلاسمیدهای خاص واکسن ژنی کلون گردیده و به روش داخل جلدی به سلولهای پوستی حیوان ازمایشگاهی منتقل می شود . در اثر القا ژن پروتئین مورد نظر به شکل طبیعی تولید شده و سلولهای سیستم ایمنی حیوان ازمایشگاهی را تحریک می نماید . سلولهای لنفوسیت فعال شده حیوان جمع اوری و با سلولهای میلوما پیوند زده می شود تا سلولهای هیبریدومای تولید کننده انتی بادی تک دودمانی اختصاصی ایجاد شود. پپس از شناسایی و تولید دودمان سلولهای هیبریدومای خاص، انتی بادی تولید می گردد.

کنترل کیفی واکسنهای ژنی :

مراحل طراحی و تولید وکنترل کیفی واکسنهای ژنی بسیار آسانتر و کم هزینه تر از واکسنهای متداول و نوترکیب است واین از نظر اقتصادی در سطح ملی بسیار با ارزش میباشد و دیگر اینکه واکسنهای DNA را میتوان بشکل خشک شده برای مدتهای طولانی بدون نیاز به یخچال ذخیره نمود و نقل و انتقال آن بسیار با سهولت صورت میگرد و برای مناطقی که مشکلات تهیه سرد خانه وجود دارد بسیار مناسب است.

بدیهی است واکسن ژنی تولیدی جهت ایمنسازی انسان باید فاقد هر گونه ماده سمی وآلودگی به آندوتوکسینها و تب زاهای دیگر باشد . با توجه به اینکه پلاسمید حاوی ژن یا واکسن ژنی معمولا در باکتری تولید میشود و در زمان استخراج میتواند به سایر مواد درون و برون سلولی میکروب آلوده باشد این مواد باید از مجموعه واکسن ژنی خارج گردند. برای این کار روشهای مختلفی جهت استخراج مقادیر انبوه پلاسمید خالص از باکتریها وجود دارد که با کروماتوگرافی تعویض یونی و بافرهای مخصوص هرگونه مواد اضافی و بخصوص مواد تب زا را حذف مینماید.

پلاسمید استخراجی برای ایمنسازی انسان باید بروشهای مندرج در جدول زیر مورد آزمایشات کنترل کیفی از نظرکیفیت DNAقرار گیرد:

جدول ۱: آزمایشات مورد نیازجهت کنترل کیفی تولید واکسنهای ژنی

ماده	**روش اندازه گیری و میزان استاندارد**
آندوتوکسین	روش LAL (* (Limulus Amoebocyte lysate assay باید کمتر از ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی گرم باشد
یکنواختی	DNA بیشتر از ۹۰٪ باید حلقوی باشد RNA+ ssDNA ژل اگاروز و کروماتوگرافی مایع HPLC
DNA ژنوم باکتری میزبان	کمتر از ۵۰ میکروگرم در میلی گرم بروش ساترن بلات
پروتئین	کمتر از ۱۰ میکروگرم به میلی گرم پلاسمید
سترونی	کشت بروی محیط کشت مغذی ، منفی بودن رشد پس از ۲۱ روز
شناسایی وصحت ژن الحاقی	بروش برش آنزیمی
خلوص	اسپکترومتری بین طول موجهای ۲۲۰ و۳۲۰
میزان جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر	باید بین ۱/۷۵ - ۱/۸۵
قدرت ایمنی زایی	آزمایش برروی حیوان

* ازمایش LAL برای تشخیص اندوتوکسین باکتریهای گرم منفی، با پلیمریزه شدن و تشکیل حالت ژلی در صورت وجود اندوتوکسین ایجاد میشود.

ملاحظات و محدودیت واکسنهای ژنی :

بدیهی است با تازه بودن دست آوردهای واکسنهای ژنی همانند تمام دانشهای نوینی که نظرات مختلف ومتفاوتی را بر می انگیزاند سبب طرح سئوالاتی شده است که پاسخ برخی از آنها نیازمند تحقیقات بیشتری است . از جمله اینکه تولید واکسنهای پلی ساکاریدی دراین روش امکانپذیر نیست ولی میتوان پروتئینهای ایمنی زای مناسب دیگری را در این موارد مانند باکتریهای نایسریا مننجایتیس *Nisseria meningitidis* و هموفیلوس انفلوانزا *Haemophilus influenzae* شناسایی نمود و از انها واکسنهای ژنی مناسب طراحی کر د.

بنابر این جهت تهیه واکسن ژنی موتر و بی خطر انسانی مقررات و موازین ویژه ای مورد نیاز است که برخی مراکز آنرا تهیه کرده اند که تمام نکات ایمنی مورد نیاز در تحقیقات ، تولید و آزمایشات کلینیکی واکسنهای ژنی را مطرح و دستور العملهای لازم را ارائه نموده اند

کمیته تخصصی واکسنهای ژنی سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۹۷ مقرراتی را جهت کنترل کیفی واکسنهای ژنی تدوین و منتشر نمود که با ذکر اهمیت واکسنهای ژنی و بی خطر بودن ان بررسیهای لازم جهت تهیه واکسنهای ژنی انسانی را مطرح ساخته است .

موسسه غذا و داروی امریکا FDA قوانین و مقررات کاملی برای خصوصیات واکسنهای ژنی انسانی تدوین نموده که دستورالعملهای لازم برای مراحل مختلف طراحی ، تولید و آزمایش آنرا معین نموده است همچنین موسسه ملی بهداشت NIH اقدام به تنظیم مقرراتی در این مورد نموده است

باتوجه به تحقیقاتی که در کشور ما نیز در عرصه واکسنهای مختلف صورت می گیردلازم است در کشور ما نیز مقررات لازم ایمنی در این مورد تدوین گردد .

بدین لحاظ ضرورت رعایت نکات زیر در بررسی ایمنی زایی واکسنهای ژنی با هدف تهیه واکسن انسانی ضروری است :

الف - بررسی جنبه های ایمنی (بی خطر بودن واکسنهای ژنی) که شامل :
- امکان الحاق پلاسمید به ژنوم میزبان
- ایجاد تولرانس ایمنی به پادگن ،
- عوارض خود ایمنی
- امکان تولید پادتن بر علیه DNA پلاسمیدی باید مورد بررسی قرار گیرد .

امکان الحاق پلاسمید به ژنوم میزبان :

از جمله سئوالاتی که در باره ایمنی واکسنها ی ژنی مطرح است اینست که : آیا وارد کردن حامل ژنتیکی به بدن انسان امکان الحاق آنرا به ساختمان ژنتیکی سلولهای انسان و ایجاد عوارض جدی مطرح نمیسازد؟
پاسخ به این سئوال تا حدود زیادی روشن است زیرا بیش از صد سال است که انواع ویروسهاو باکتریهای کشته ویا ضعیف شده به عنوان واکسن استفاده شده و همه این میکروبها نیز دارای ماده ژنتیکی میباشند و تاکنون این سئوال در مورد آنان مطرح نشده زیرا مشکلی را ایجاد نکرده اند . میزان حضور پلاسمید در بررسیهای مختلف بسیار متفاوت است و از چند ساعت و تا چند ماه اشاره شده است . بررسی مدت حضور پلاسمید واکسن ژنی حاوی ژن هپاتیت B در خون و بافتهای موشهای آزمایشگاهی که مقادیر مختلف ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم واکسن را بروشهای مختلف داخل عضلانی و داخل جلدی دریافت کرده بودند با روش PCR نشان داد که پس از ۱۰۰ ساعت از تزریق هیچکدام از نمونه ها واجد پلاسمید واکسن ژنی نیستند . در یک بررسی با تجویز مقدار ۴۰۰ میکرو گرم واکسن ژنی حاوی ژن HIV-1 gagpol بروش داخل عظلانی به ۶ خرگوش و بررسی حضور پلاسمید واکسن ژنی ۳۰ روز پس از تجویز در بافتهای مختلف بروش PCR نشان داده است که پلاسمید در بافتهای محل تزریق، عضله ، پوست، طحال، تیموس ،غدد لنفاوی و مغز استخوان حضور دارد ولیکن در بافتهای تخمدان، بیضه ، اسپرم و کلیه دیده نمی شود جدول ..... . مشخص می گردد که پلاسمید در بافتهایی که نقش مهمی در فعالیتهای سیستم ایمنی دارند وجود دارد.
در ضمن بررسی علمی امکان الحاق واکسنها ی ژنی با بررسی حضور سکانس واکسن ژنی با تزریق ۲۰۰ میکر گرم پلاسمید ۶ کیلو بازی (۳ x1013 ملکول) به عضله موش بمدت ۱۲ ماه نشان داده است که امکان الحاق واکسن ژنی به ژنوم ۱۰۶-۱۰۳ بلو کمتر از امکان ایجاد جهش خود بخودی در یک ژن است . بررسی خوکچه های هندی تزریق شده با واکسن ژنی در زمانهای مختلف با استفاده از روش فوق هیچگونه الحاق به ژنوم را نشان نداده است . در همین زمینه کمیته استانداردهای مواد زیستی سازمان جهانی بهداشت با تشکیل گروه تخصصی جنبه های مختلف واکسنهای ژنی را مورد برر سی قرار داده و رسما اعلام کرده است که میزان DNA ای که در این مورد استفاده میشود (حدود ۱۰۰ میکروگرم ویا کمی بیشتر) بسیار کمتر ازمیزانی است که این سازمان آنرا مجاز میداند (تا۶۰۰ میکروگرم) . روشهای متعدد و حساس ملکولی قادر به اندازه گیری امکان الحاق ۱ رونوشت از پلاسمید واکسن ژنی در میکر وگرم DNA (معادل ۱۵۰۰۰ سلول دیپلویید) است.
پلاسمیدهای حاملی که برای انتقال واکسن استفاده می شود به نحوی طراحی میشوند که به ساختار ژنتیکی میزبان پیوند نخورند واین مزیت انتقال مستقیم DNA به حاملین ویروسی است.

جدول : میزان حضور پلاسمید واکسن ژنی در بافتهای مختلف در مدل حیوانی . دقت واکنش در حد شناسایی ۱۰۰ کپی پلاسمید در ۱۰۰ میلیون کپی ژنوم استخراجی از بافت می باشد. هیچ نوع پلاسمیدی در بافت مغز و ریه مشاهده نشد.

امکان تولید پادتن بر علیه DNA پلاسمیدی

از نظر واکنش ایمنی بر علیه DNA پلاسمیدی وتولید آنتی بادی ضد آن که می تواند سبب عوارض خود ایمنی مانند لوپوس اریتماتوس گردد ولیکن در باره واکسنهای ژنی واکنش ایمنی بر علیه خود پلاسمید (در مقداری که تزریق میگردد) ایجاد نمیشود بلکه پس از القاء ژن و تولید پروتئین مورد نظر است که سیستم ایمنی بر علیه آن فعال شده و ایمنی ایجاد میگردد. بررسیها نشان داده است که تزریق مکرر واکسن ژنی حاوی ژن CS1 مالاریا و gp160 ویروس ایدز و پلاسمید فاقد ژنهای مزبور به موش آزمایشگاهی و اندازه گیری آنتی بادیهای ضد DNA هیچگونه عوارض خود ایمنی را ایجاد نمی نماید .

علت عدم واکنش سیستم ایمنی بر علیه واکسنهای ژنی می تواند بدلایل زیر باشد :

اولا DNA دوزنجیره ای خالص سبب القاء تولید آنتی بادی بر علیه خود نمی شود . دوما، در اغلب افراد بطور طبیعی آنتی بادیهای ضد DNA بی خطر موجود است . این پادتنها بر علیه DNA باکتریهای خاصی می باشند که بنظر می رسد در طول عفونت با آن میکروب تولید شده اند و هیچگونه واکنش متقاطعی با DNA پستانداران ایجاد نمی کنند . دلیل سوم اینکه تزریق واکسن ژنی به موشهای مبتلا به لوپوس هیچگونه نقشی در افزایش انتی بادی ضد DNA و یا عوارض خود ایمنی نداشته است . و عامل دیگر اینکه تزریق واکسن ژنی به حیوانات سالم سبب تولید انتی بادی ضد DNA قابل توجهی نشده است . تجویز واکسن ژنی و تولید پروتئین مربوطه در سلول سبب القاء واکنشهای ایمنی بر علیه سلول واجد پلاسمید نیز نمیشود و این از مزایای دیگر واکسنهای ژنی میباشد . در حالی که استفاده از ویروسهای حامل ژن سبب فعال شدن سیستم ایمنی بر علیه خود ویروس نیز میشوند.

ایجاد تولرانس ایمنی به پادگن

تزریق مکرر مقادیر اندک آنتی ژن می تواند سبب عدم پاسخ ایمنی یا تولرانس شود . با توجه باینکه تزریق واکسن ژنی سبب تولید مقادیر اندک انتی ژن می شود که می تواند بمدت طولانی ادامه یابد این سئوال مطرح می شود که ایا واکسن ژنی سبب تولرانس می شود یا نه ؟ در مورد امکان استقرار واکسن ژنی به مدت طولانی در بافت تنها در یک گزارش در موش أزمایشگاهی، تا ۱۹ ماه ذکر شده است، و در اغلب گزارشها، واکسن ژنی تزریقی پس ازمدت کوتاهی بدلیل حضور انزیمهای مختلف تجزیه کننده DNA بیگانه در مایعات بدن از بین میروند . در مورد واکسن ژنی هپاتیت B مشاهده شده که پس از دوهفته از تزریق پلاسمید میزان ان بمقدار قابل توجهی کاهش یافته و حذف میشود . در برخیی از تحقیق انجام شده توسط م ولف در مورد واکسن ژنی هپاتیت B بررسی حضور پلاسمید حاوی ژن رمز کننده پادگن سطحی هپاتیت B در موش آزمایشگاهی بروش PCR که قادر به تشخیص حضور حتی چند ملکول پلاسمید در نمونه های خون و بافت میباشد مشخص نمود که تا ۷۲ ساعت از تزریق واکسن ژنی حضور ان قابل تسخیص است ولی پس از آن شناسایی نمی گردد و بدلایل ذکر شده از بین رفته است . . در صورت طولانی تر شدن ابقای پلاسمید میتواند عوارض جانبی چون واکنشهای ایمنی نامناسب را سبب گردد. این مشکل را میتوان با طراحی بهینه پلاسمید نوترکیب، بکارگیری مقادیر مناسب واکسن واستفاده از سیستم انتقال بکمک تفنگ ژنی (چون انتقال در سطح بافت پوست صورت میگیرد) حل کرد. البته در طی مراحل طراحی و آزمایش واکسنها این موارد نیز مورد بررسی قرار میگیرد و رفع میشود.

راه حل دیگری که برای کنترل میزان القاء ژن و تولید مقادیر مشخصی از پروتئین در داخل سلولها مطرح شده وآزمایش گردیده است استفاده از تنظیم گرهای ژنی و مهارکننده های شیمیایی در کاربردهای درمانی از واکسنهای ژنی می باشد . بعنوان نمونه اگر از واکسن ژنتیکی برای تولید هورمون انسولین در داخل بدن برای درمان مرض قند (دیابت) استفاده شود، برای کنترل القاء ژن میتوان از میزان گلوکز خون بعنوان مهار کننده القاء استفاده کرد ، بدین نحو که واکسن ژنی بطریقی طراحی میگردد تا افزایش میزان گلوکز، سیستم را فعال و القاء صورت گیرد . با تولید انسولین و کاهش قند خون سیستم مهار شده و القاء متوقف می گردد . در روش شیمیایی واکسن ژنتیکی دارای محل خاصی برای یک مهار کننده دارویی است که در زمان لازم به بدن بیمار تزریق میشود، این ماده شیمیایی با نشستن برروی محل خود سبب مهار القاء ژن می گردد . انواع سیستم های مهارکننده را میتوان در اوپرونهای مختلف باکتریها مشاهده کرد . تنوع سیستمهای تنظیم گر ژنی حتی میتواند به سیستم های کنترل با دما و اشعه ها بخصوص در درمانهای سرطان و اشعه درمانی محلی (لوکال) و افزایش درجه حرارت بافت مورد هدف انجام گیرد.

خود ایمنی :

خود ایمنی عبارت از تهاجم سیستم ایمنی به بافتهای خودی است . واکنش خود ایمنی می تواند در نتیجه تهاجم سیستم ایمنی به سلولهایی که در اتر ورود واکسن ژنی به تولید پادگن بیگانه می پردازند رخ دهد. هردو واکنشهای فوق

در نتیجه عفونتهای ویروسی و باکتریال بطور طبیعی رخ می دهد یعنی با ورود ویروسها و سایر میکروبهای درون سلولی سلولهای سیستم ایمنی سلوله‌ای الوده را مورد تهاجم قرار می دهند تا از گسترش عفونت به سایر سلولها جلوگیری شود و در عین حال سلولهایی که به ساختن انتی ژنهای میکروبی می پردازند نیز مورد حمله سیستم ایمنی قرار می گیرند و این فرایندها سبب واکنشهای خود ایمنی نمی شوند . از این نظر واکسنهای ژنی نمی تواند سبب عوارض خود ایمنی بیشتر از ابتلا به یک عفونت وبروسی گردد وخطری برای سلامتی ایجاد نمی کند .

بدیهی است که عرصه واکسنهای ژنی بدلیل نو بودن نیازمند تحقیقات بیشتر میباشد و پاسخ به بسیاری از این مجهولات در عرصه تجربه روشن خواهد شد تا از مزایا وکاربردهای گسترده آنها هرچه زودتر سود ببریم.

جنبه های عملی بررسی ایمنی زایی واکسنهای ژنی :

تحقیقات در عرصه واکسنهای ژنی نیازمند مقدمات زیر است :

۱- انتخاب آنتی ژن مناسب جهت استفاده در واکسن ژنی

در صورتی که آنتی ژن مورد نظر شناخته شده و ردیف DNA یا RNA آن شناسایی شده باشد می توان با روشهای مختلف اقدام به استخراج ژنوم وتهیه ژن مورد نظر جهت پیوند نمودن به واکسن ژنی را نمود . در صورتی که تحقیق جهت شناسایی پادگن مناسب صورت می گیرد از روش ایمنسازی با کتابخانه ژنی ELI استفاده کرد که به آن اشاره شد.

۲- انتخاب پلاسمید مناسب جهت پیوند ژن مورد نظر :

انواع پلاسمیدهای القاء کننده آنتی ژن در سلولهای حیوانی و انسانی موجود است . بر اساس هدف تحقیق انتخاب پلاسمید مناسب واجد پیش برنده مناسب ، مارکر آنتی بیوتیکی یا انواع مارکر های لوسیفراز ، بتا گالاکتوزیداز و پروتئین های فلورسنت مانند GFP و و سایر بخشهای مورد نیاز واکسن ژنی را می توان انتخاب نمود . به نقش نوع پیش برنده در القاء ژن و ساختمان این پلاسمیدها در فوق اشاره کردیم.

۳- سلول مناسب جهت تولید واکسن ژنی :

پس از تهیه پلاسمید واکسن ژنی جهت انتقال و تولید آن از سلولهای مختلف E. coli مانند DH5 الفا و یا JM109 و یا سایر رده های سلولی میتوان استفاده نمود.

۴- تهیه مقادیر لازم از پلاسمید واکسن ژنی :

از روشهای مختلفی جهت تولید پلاسمید خالص واکسن ژنی می توان استفاده نمود ولیکن بدلیل نقش آلودگیها در کاهش میزان ترانسفکشن و تحریک سیستم ا یمنی لازم است پلاسمیدی خالص عاری از پروتئینها ، اندوتوکسین ، RNA و مواد دیگر تهیه شود . بدین منظور از روشهای خالص سازی ستونی بروش کروماتوگرافی تعویض یونی anion exchange chromatography ویا روش سزیوم کلراید cesium chloride جهت حذف این مواد باید استفاده شود . در طی مراحل استخراج لازم است از آب و بافرهای فاقد اندوتوکسن استفاده نمود . البته می توان پلاسمید را بروشهای متداول تولید نموده و سپس اقدام به حذف اندوتوکسین و سایر ناخالصی های ان نمود.

پس از تهیه پلاسمید خالص باید آزمایشات لازم جهت تعیین غلظت و خلوص آن و همچنین بررسی برش آنزیمی جهت صحت ساختمان و نقشه ژنی پلاسمید صورت گیرد . بهترین غلظت مورد نظر جهت کار وجود ۱ میکروگرم پلاسمید خالص در میکرو لیتر بافر است . تعین غلظت و خلوص پلاسمید استخراجی با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر صورت می گیرد . در صورتی که نسبت مقدار ۲۸۰/۲۶۰ بیشتر از ۱/۷ باشد پلاسمید دارای کیفیت مناسب است.

نمودار مراحل مختلف تهیه و بررسی واکسن ژنی

تولید انبوه پلاسمید واکسن ژنی :

یکی ازمشکلات اساسی جهت کاربرد گسترده واکسنهای ژنی تولید انبوه و صنعتی پلاسمید خالص با کیفیت مناسب و با هزینه قابل قبول جهت اقتصادی نمودن کاربرد گسترده ان می باشد . تهیه مقادیر مناسب واکسن ژنی با کیفیت بالا در مراحل تحقیقاتی هزینه بالایی دارد و تحقیقات گسترده ای برای تولید انبوه پلاسمید خالص صورت گرفته است . با توجه باینکه اغلب واکسنهای ژنی مطالعه شده در باکتری E.coli تهیه می شوند ضرورت دارد تا بهترین محیط کشت و شرایط مناسب جهت حداکثر تکثیر آن بدست آید . امروزه از محفظه های تخمیر (فرمانتور) جهت این کار استفاده می شود. تنظیم شرایط مورد نیاز جهت حداکثر تولید توده سلولی و در نتیجه پلاسمید در فرمانتورها بسیار حائز اهمیت است . انواع محیط کشتهای ساده ارزان قیمت برای اینکار وجود دارد . در بررسیهای انجام شده با محیط عصاره مخمر با گلیسرول در یک فرمانتور ۷ لیتری جهت تولید انبوه پلاسمیدی با اندازه ۷/۶ کیلوباز مقدار ۶۰ گرم توده سلولی خشک به هر لیتر محیط کشت بدست امده است که در نهایت مقدار ۲۳۰ میلی گرم DNA خالص تولید می گردد . بهینه سازی این روش برای فرمانتور ۲۰۰ لیتری با تغییر عوامل مختلفی چون : نوع پلاسمید ، نوع باکتری میزبان ، ترکیب محیط کشت ، میزان هوادهی و شرایط زیست شیمیایی رشد امکان تولید انبوه با رعایت شرایط استاندارد تولید انبوه GMP good manufacturing practice) صورت گرفته است .

تولید انبوه پلاسمید واکسن ژنی دارای مراحل زیر است :

۱ - تولید انبوه سلول واجد واکسن ژنی
۲ - جمع اوری سلولها
۳ - شکستن سلولها
۴ - جداسازی پلاسمیدها از سایر مواد مانند (DNA کروموزومی ، RNA، لیپید، اندوتوکسین، پروتئینها و کربوهیدراتها/
۵ - خالص سازی پلاسمید سوپرکویل که کاربرد اصلی را دارد از سایر اشکال پلاسمیدی (خطی، شکسته nicked، دایمر و چند شکلی)

روشهای مختلفی جهت شکستن باکتری های حاوی پلاسمید واکسن ژنی بکار می رود ولی شایع ترین ان روش لیز قلیایی است (alkaline lysis) که سبب کاهش مقادیر پروتئین و مواد کروموزومی می گردد. بهینه سازی های بسیاری جهت کاهش مواد اضافی و افزایش خلوص پلاسمیدهای حلقوی صورت گرفته است . انجام دو مرحله حذف پروتئینهای اضافی با امونیوم استات سبب کاهش مقدار RNA ها می شود . پس از این مرحله استفاده از اتانول یا ایزوپروپانول

توصیه می گردد.

جهت خالص سازی پلاسمید تهیه شده از این مراحل از ستونهای تعویض یونی استفاده می شود

روش استخراج پلاسمید فاقد اندوتوکسین بروش کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از کیت کواژن

- از باکتری های مناسبی مانند DH5 استفاده شود
- بافرها ی این روش فاقد اندوتوکسین است
- باکتری حاوی پلاسمید واکسن ژنی در ۵۰۰ میلی لیتر محیط مایع لوریا (LB) کشت می شود
- توسط نیروی گریزازمرکز باکتریها جمع آوری می شود
- باکتریها در بافر مخصوص لیزکننده حل می شود
- بافر مخصوص حذف پروتئینها ومواد زائداضافه می گردد
- پس از رسوب مواداضافی مایع رویی با ایزوپروپانول رسوب داده می شود
- محصول با اتانول شسته و خشک می شود
- پس از حل کردن پلاسمید در بافر واصافه کردن نمک مناسب ، ۲ حجم اتانول اضافه کرده وسپس پلاسمید با نیروی گریز مرکز رسوب داده می شود
- رسوب با اتانول ۷۰٪ شستشو شده و با نیروی گریزازمرکز رسوب داده وحشک می شود
- رسوب در بافر استریل حل شده وبه ستون کروماتوگرافی حذف اندوتوکسین اضافه می گردد
-پس ازشستشوی ستون پلاسمید خالص فاقد اندوتوکسین جمع آوری می گردد
- میزان وخلوص پلاسمید توسط اندازه گیری OD ونسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر محاسبه می شود
- پلاسمید حاصل جهت تزریق در غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر آماده می شود.
- محصول حاصل از۵۰۰ میلی لیتر جهت یک ستون بزرگ کافی است

شرکل مراحل مختلف تخلیص پلاسمید فاقد اندوتوکسن توسط کیت کواژن

جدول نمودار مراحل مختلف تولید انبوه و کنترل کیفی پلاسمید واکسن ژنی بروش cGMP

انتخاب حیوان مناسب جهت بررسی ایمنی زایی واکسن ژنی

جهت بررسی کیفیت پلاسمیدهای خالص شده نهایی علاوه بر انجام ازمایشات مندرج در جدول .... لازم است ایمنی زایی ان در حیوانات ازمایشگاهی مورد بررسی قرار گیرد.

بهتر است در تجربیات اولیه از مدلهای حیوانی ساده تر مانند موش سفید آزمایشگاهی ، خوکچه ، موش بزرگ (رات) یا خرگوش استفاده شود . ولیکن بر اساس نوع عامل عفونی و تجارب قبلی می توان حیوان مناسب را انتخاب نمود . در برررسی واکسنهای ژنی دامی می توان از دام مورد نظر جهت بررسی ایمنی زایی و حفاظت دهی در مقابل استفاده از عامل عفونی بهره گرفت . در جدول .... فهرست مدلهای حیوانی بررسی شده در واکسنهای ژنی را ذکر گردیده است .

- انتخاب مقدار DNA و بافر حلال جهت تجویز، روش تجویزواکسن ژنی (پوستی ، عضلانی ، داخل صفاقی ، استنشاقی ، خوراکی ، وریدی و ..) ، بافت مورد نظر، یاور (ادجوانت) یا حامل مناسب جهت افزایش انتقال پلاسمید بداخل سلولها در صورت نیاز، بررسی نیاز به اماده سازی بافت قبل از تزریق یا بدون آن ، تدوین برنامه ایمن سازی ، فواصل و دفعات تجویز واکسن و روش تهیه نمونه و آنالیز آن از نظر پاسخ ایمنی خونی و سلولی . لازم است قبل از شروع کار تمام موارد فوق و موارد دیگر بر حسب هدف تحقیق مشخص گردد و ابزار و لوازم مورد نیاز آن آماده شود . در صورت نیاز به آماده سازی بافت قبل از تزریق مانند استفاده از کاردیوتوکسین Cardiotoxin یابوپی واکایین Bupivaccain و یا غلظتهای مختلفی از سوکروز برای ایجاد التهاب و افزایش تکثیر سلولهای عضلانی، لازم است این امر در زمان مناسب انجام گیرد.

تزریق عضلانی کاردیو توکسن (تهیه شده از سم مار Naja nigricollis) بمقدار ۱۰۰ میکرولیتر با غلظت ۱۰ میکرو مولار در فسفات بافر صورت می گیرد که سبب بازسازی سلولهای عضلانی می شود . تزریق واکسن ژنی می تواند ۵ تا ۹ روز از تجویز کاردیوتکسین انجام شود . در صورتی که از کاردیوتوکسین استفاده می شود دقت شود که **هرگز** در هنگام تزریق از واکسن ژنی حل شده در سوکروز ۲۵٪ استفاده نشود زیرا بافت بازسازی شده آمادگی این مقدار فشار اسمزی را ندارد (از بافر فسفات استفاده شود).

بهتر است با مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ میکرو گرم پلاسمید خالص در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (PBS) آزمایش شروع شود . تجویز عضلانی میتواند اولین انتخاب بدلیل سهولت کار باشد. میتوان تزریق را با دو تجویز ۵۰ میکرولیتری در عضله پای (Tibialis anterior muscle)راست و چپ موش آزمایشگاهی (با وزن ۱۸ تا ۲۰ گرم) با سرنگهای ۱ میلی لیتری با سر سوزن نمره ۰.۴ x20mm (27G) و یا سرنگ انسولین با سر سوزن ۲۹ G و با فروبردن به آرامی در وسط عضله (تقریبا ۳ میلی متر) انجام داد. برای تنظیم میزان لازم تزریق سوزن میتوان با استفاده از لوله های نازک پلاستیکی سر سوزن را فقط میزان ۲ تا ۳ میلی متر آزاد گذاشت تا تزریق دقیقتر صورت گیرد . بهتر است قبلا تمرین لازم با مرکب هندی جهت تشخیص میزان عمق تزریق بردن سوزن در عضله موش صورت گیرد زیرا نحوه تجویز صحیح

نقش مهمی در ایجاد پاسخ ایمنی دارد.
جهت پیشگیری از ایجاد استرس تزریق و سفتی عضلات می توان حیوان را با مواد شل کننده عضلانی آماده نمود (مانند پنتاباربیتال سدیم بمقدار (۷۵ mg/kg IP) یاهالوتان بشکل استنشاقی) ولیکن در صورت دقت لازم نیازی به این امر نیست . تجویز در سایر بافتها مانند پوست ، داخل صفاقی وموارد دیگر نیز نیازمند دقت لازم است . اغلب سه تجویز بفاصله یک تا دوهفته جهت کسب نتیجه مناسب کافی است و در این بین می توان اقدام به نم ونه گیری های لازم جهت بررسی پاسخ ایمنی نمود . لازم است قبل از تجویز اولین دوز از حیوانات، نمونه گیری خون یا بافت مورد نظربعمل اید تا بعنوان شاهد با نمونه های پس از ایمن سازی مقایسه شود . در موش سفید آزمایشگاهی خونگیری با مقادیر ۱۰۰ میکرولیتر جهت بررسی کافی است .

- بررسیهای ایمونولوژیک و ملکولی پاسخ ایمنی واکسن ژنی در نمونه ها به روشهای مختلفی صورت گیرد.
- مرحله نهایی آزمایشات در این مرحله ، پس از کسب واکنش ایمنی مناسب ، مقابله حیوان مناسب ایمن شده و شاهد (بدون واکسن) با چندین برابر دوز عفونی یا کشنده میکر وب مورد نظر است تا قدرت ایمنی بخشی واکسن مشخص شود .

- پس از طی این مراحل ، جهت ورود به مرحله پیش کلینیکی ، واکسن می بایست از نظر ایمنی و کارایی مورد بررسیهای مختلف قرار گیرد که در بخش جنبه های ایمنی واکسنهای ژنی بدانها اشاره گردید.

_ در صورت تایید واکسن ژ نی از نظر بی خطربودن و کارایی ، محقق می تواند جهت ورود به مرحله اول آزمایشات انسانی بروی تعداد مشخصی اقدام به کسب مجوزهای لازم از مراجع ذی صلاح نماید و فازهای سه گانه آزمایشات کلینکی را جهت بررسی ایمنی زایی واکسن در انسان تحت نظارت مراکز مربوطه انجام گیرد.

با توجه به انجام **طرح تحقیقاتی بررسی ایمنی زایی واکسن ژنی هپاتیت B** در مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی و دانشگاه امام حسین (ع) که در مراحل پایانی خود را قبل از ورود به مرحله آزمایشات پیش کلینیکی طی می نماید بعنوان تجربه تحقیقاتی در زمینه واکسنهای ژنی در کشور و آشنایی محققین با جنبه های عملی تحقیقات در این عرصه توضیح می دهیم .

۱- کلون کردن ژن مورد نظر در وکتور مناسب :
در این تحقیق ژن رمز کننده پادگن سطحی هپاتیت B (HBsAg) بروش PCR از ژنوم ویروس هپاتیت B جداشده و سپس در حامل ژنتیکی حاوی پیش برنده CMV و نشانگر انتی بیوتیکی آمپی سیلین پیوند و به باکتری DH5 الفا منتقل گردید. جهت تولید مقادیر مناسب پلاسمید خالص از روشهای مختلف مانند لیز قلیایی ، استفاده از سیلات و روش استخراج با ستون کروماتوگرافی تعویض یونی با حذف اندوتوکسین استفاده شد که پلاسم ید ژنی با بهترین کیفیت در اختیار قرار می دهد.

باتوجه به نقش روش استخراج در میزان آندوتوکسین موجود در پلاسمید نهایی ونقش مهاری این ماده در میزان ترانسفکشن (جدول ...) و در نهایت فعالیت مناسب واکسن ژنی روش استخراج با کروماتوگرافی تعویض یونی بهترین نتایج را دارد.

جدول .... روشهای مختلف استخراج پلاسمید و میزان اندوتوکسین و ترانسفکشن آن

جهت بررسی ایمنی زایی این واکسن مقادیر ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم از واکسن ژنی حل شده در بافر فسفات ، سوکروز

۲۰٪ و نوعی پلیمر بروشهای عضلانی و داخل جلدی به گروههای مختلف موشهای آزم ایشگاهی تزریق گردید. بررسی ، میزان بقاء وکتور در بافت محل تزریق و یا حضور آن در سایر بافتها بروش PCR صورت گرفت ، بررسی میزان القاء ژن و تولید پروتئین در داخل سلولها، میزان تولید پادتن بر علیه پروتئین تولیدی در نمونه های سرمی ، و در نهایت میزان بقای ایمنی و در نهایت بررسی ایمنی زایی واکسن ژنی هپاتیت B در مقایسه با واکسن نوترکیب پروتئینی هپاتیت B انسانی که اینک بطور گسترده ای در کشور بکار گرفته می شود انجام شده است . نتایج بدست آمده نشان دهنده ایمنی زایی بسیار بالای این واکسن و تولید مقادیر بسیار بالای پادتن ضد HBsAg می باشد . آزمایشات مراحل نهایی خودرا جهت بررسی طول پایداری ایمنی واکسن ژنی هپاتیت B طی می نماید.

انجام این طرحها علاوه بر ایجاد توانمندی در زمینه فن آوری واکسنهای ژنی و بهره گیری از این توان در تمام عرصه های کاربردی آن ، مقدمه ای است جهت ورود به عرصه هایی چون:

- تهیه واکسنهای ژنی ضد بیماریهای عفونی انسانی و دامی.
- طراحی وکتورهای مناسب جهت واکسنهای ژنی.
- تهیه حاملهای ژنتیکی مناسب برای انتقال پروتئینهایی که جنبه درمانی دارند.
- بررسی درمان هپاتیت مزمن بروش واکسن ژنی
- کاربرد واکسنهای ژنی در ژن د رمانی وایمنی درمانی انواع بیماریهایی که امکان درمان آن بدین روش وجود دارد و تحقیق در زمینه توان پیشگیری و درمان سرطانها .
- انتقال ژن به گیاهان و سایر کاربردهایی که برای سیستم های انتقال ژنتیکی پیش بینی میشود.

باتوجه به اهمیت و جایگاه ویژه ایمن سازی در کشور که می تواند از صرف هزینه های کلان درمان و مراقبت بکاهد و توجه ویژه جهانی به توسعه واکسنهای ژنی بدلیل مزایای بسیار آن نسبت به واکسنهای کنونی ، امیداست توجه جدی به این زمینه در کشور ایجاد شود.

منابع :

۱. تحقیقیات دانشمندان ایرانی - اسلامی در زمینه بیماریهای واگیر ، ۱۳۷۵ . دکتر حسن تاجبخش ، مجموعه مقالات کنگره بین المللی تاریخ پزشکی در اسلام و ایران جلد ۲ صفحه ۶۲۵-۶۳۶.

۲. مرتضی فرهادی ، برخی روشهای پیشگیرانه در دانش پزشکی عامیانه در میان ایلات و عشایر و روستای‌یان ، مجموعه مقالات کنگره بین المللی تاریخ پزشکی در اسلام و ایران ۱۳۷۵ جلد ۲ صفحه ۱۰۷۴-۱۰۸۵.

۳. کرمی علی و همکاران ، بررسی ایمنی زایی واکسن ژنتیکی DNA vaccine هپاتیت B در حیوان آزمایشگاهی. هفتمین کنگره بیماریهای عفونی و گرمسیری ایران. بابلسر ۱۴-۱۶ مهر ۱۳۷۷.

۴. کرمی علی ، لهراسبی ت، س ربلوکی م ن ، یخچالی ب . بررسی ایمنی زایی واکسن ژنی هپاتیت B . چهاردهمین کنگره فیزیولوژی و فارماکولوژی ، ۲۶ -۳۰ اردیبهشت ۱۳۷۸ تهران.

۵. کرمی علی و همکاران ، بررسی ایمنی زایی واکسن ژنی ضد هپاتیت B در موش آزمایشگاهی . کنگره سراسری طب پیشگیری ،۲۸-۲۹ مهر ۱۳۷۸ دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی همدان.

6. Michel M-L et all, 1988 Induction of anti-human immunodeficiency virus (HIV) neutralizing antibodies inrabbits immunized with recombinant HIV-hepatitis B surface antigen particles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA-۷۹۵۵۷: ۸۵ ۷۹۶۱

7. Barr. et al . HGH with DNA Vaccine . Science 1991, 254, 1507.

8. Liu et al , Nature Medicine, 6/6.1991.

9. Points to consider on plasmid DNA vaccine for preventive infectious disease indications , FDA, Center for Biologics Evaluation and Research , Office of Vaccine Research and Review , October 1996.

10. Barry, et all, Production of Monoclonal Antibodies by Genetic Immunization. Biotechniques 16 : 616-620 1994.

11. liposome mediated DNA vaccination, Gregoriadis G et al, FEBS Lett, 1997,107-119.

12. Nature Medicine,1997 3, 526-532.

13. Nature Medicine,1997 3, 501-502.

14. Nature Biotechnology,1997, 15, 139-154, .

15. Virology, 225 (2) : 293-299, 1996.

16. Nature Medicine, 2, 893-898, 1996.- 16.

17. Viral Immunology, 9, 1-9. 1996.

18. J. Immunol , 158, 1231-1237, 1997.

19. J, Infect Dis, 175, 91-97, 1997.

20. J Biol Chem, 271, 17861-17868, 1996.

21. Infect Immun, 64, 3168-3173, 1996.

22. DNA Vaccines: The Making of a Revolution., Ann intern Med, 126, 1997:
23. J Immunol 158, 3635-3639, 1997.

24. Nature, 377, 632-635, 1955.

25. Vaccine, 14, 910-915, 1996.

26. Proc Natl Acad Sci USA, 93, 7213-7218, 1996.

27. Proc Natl Acad Sci USA, 92, 5307-5311, 1996.

28. Virology 228, 278-284, 1997.

29. Human Gene Ther 8, 293-300, 1997.

30. Science 259: 1745-8, 1993.

31. Parasitology Today 11: 113-6,1993.

32. Rapaport-D; et all. Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene products in embryonic stem cells and their differentiated derivatives. J-Biol-Chem. 1992 ; 267(30): 21289-92.

33. Shrager-J B et all , A PCR-based assay for the wild-type dystrophin gene transferred into the mdx mouse . Muscle-Nerve. 1992 15(10): 1133-7. J . Immunol 151:1 1757-1746.

34. Hakim et all . J. Immunol 1996, 157: 5503-55011.

35. Whalen RG et all, (1995) DNA-mediated immunization and energetic immune response to hepatitis B surface antigen. Clin Immunol Immunopathol ;75:1-12.

36. Ulmer JB, et all , (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA. Protein. Science ;259:1745-1749.

37. Wang B, et all ,(1993) Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type I . Proc. Natl. Acad. Sci. USA ;90:4156-4160.

38. Davis HL, et all (1993). DNA based immunization for hepatitis B induces continuous secretion of antigen and high levels of circulating antibody

39. Human Molec Genet. ;2:1847-1851.

40. Fynan EF, et all (1993). DNA vaccines protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. P roc Natl Acad Sci USA. 24 : 11478-11482.

41. Gerlich WH, Bruss V (1993). Functions hepatitis B virus proteins and molecular targets for protective immunity; in Ellis RW (ed): Hepatitis B

Vaccines .

42. in Clinical Practice.New York, NY, Marcel-Dekker, pp 41-82.

43. Michel ML, et all. (1995) DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 5307-5311.

44. Davis HL, et all (1993) Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer in adult mouse . Human Gene Ther. ;4:733.

45. Schirmbeck R, et all. (1994). Immunization with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8+cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. J Immunol ;152:1110-1119.

46. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL (1995). A phagosome-to-cytosol pathwayfor exogenous antigens presented on MHC class I molecules. Science 243, 246-67.

47. Davis HL, et all (1995). DNA-mediatedimmunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to thehepatitis B envelope protein. Hum Gene Ther ;6:1447-1456.

48. Whalen RG, (1995). Activation and entrainment of the immune response after DNA mediated immunization to thehepatitis B surface antigen. New York Academy of Sciences. 772:187-195.

49. Holt JT (1995) A 'senseless' immune response to DNA. Nature Medicine ;1:407-408.

50. Borisova G, (1993). Hybrid hepatitis B, virus nucleocapsid bearing animmunodominant region from hepatitis B virus surface antigen. J Virol ;671993:3696-3701.

51. Schodel F, (1994).Immunity to malaria elicited by hybrid hepatitis B virus core particles carrying circumsporozoiteprotein epitopes. J Exp Med ;180:1037-1046.

52. Michel M-L et all (1984). Synthesis in animal cells of hepatitis B surface antigen particles carrying a receptor forpolymerized human serum albumin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA ;81:7708-7712.

53. Xiang ZQ,et all.(1994)Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunityagainst rabies virus. Virology ;199:132-140.

54. Davis HL, et all. (1993) Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. Hum Gene Ther apy, 151 : 151-159

55. Jon A. Wolf et all 1990. Direct gen transfer into Mouse muscle in vivo Science vol 247 : 1465-1468.

56. Jyotsan Dhawan et all1991 Systemic delivery of Human Growth hormone
57. by injection of genetically engineered myoblasts .Sicence vol 254, 1509-1512.

58. Gyula Aesadi et al. 1991. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA construt .Nature, vol 352, 815-818.

59. Martha Sedegha et all 1994. protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsprozoit protein . proc. natl.acad.sci.

usa. 91. 9866-9870.

60. Michael A. barry et all. 1994. production of monoclonal antibodies by genetic Immunization. Biotechniques. 16, 616-619.

61. Jyotsan Dhawan et all . 1991 . Systemic delivery of Human Growth hormone by injection of genetically engineered myoblasts. Sicence vol 254, 1509-1512.

62. d'Oliveira C, et all, Induction of protective immunity to Theileria annulata using two major merozoite surface antigens presented by different delivery systems. Vaccine 1997;15(16):1796-1804

63. The Scientific Future of DNA for Immunization, 1997, Report from American Society for Microbiology.

64. Third National Symposium on Basic Aspects of Vaccines, April 1998- Capt .Stephen L. Hoffman, M.D., of the U.S. Naval Medical Research Institute .

65. Kren, B.T. et all . In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. Nature Med. 1998. 4(3):23

66. L. Davis et all, Direct Gene Transfer in Skeletal Muscle: Plasmid DNA-based Immunization against the Hepatitis B Virus Surface Antigen. Vaccine 1994 12 Number 16

67. Gramzinski RA, et all, Immune response to a hepatitis B DNA vaccine in Aotus monkeys: a comparison of vaccine formulation, route, and method of administration. Mol Med 1998 ;4(2):109-118

68. Science . 1997. 272, 1711-1714.

69. Lancet 1998, volume 351.

70. Guidlines for assuring the quality of DNA vaccines. WHO technical report series, 5 march 1997, Final Draft WHO expert committe on biologivcal standardization.

71. PowderJect's Hepatitis B DNA Vaccine First to Successfully Elicit Protective Immune Response in Humans, Dec. 7, 1998 /PRNewswire. PowderJect Pharmaceuticals plc.

72. Tacket CO, et all, Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery

device.Vaccine 1999 ;17(22):2826-9

73. Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors. J Immunol. 1999 Jan 15;162(2):1113-9.

74. Immune responses after immunization with plasmid DNA encoding bet v 1, the major allergenof birch pollen. J Allergy Clin Immunol. 1999 Jan;103(1 Pt 1):107-13

75. Genetic vaccination against coccidioides immitis: comparison of vaccine efficacy of recombinant antigen 2 and antigen 2 cDNA. Infect Immun. 1999 ;67(2):630-5.

76. Tolley ND, et al. DNA vaccination against Theiler's murine encephalomyelitis virus leads to alterations in demyelinating disease. J Virol. 1999 Feb ;73 (2): 993-1000.

77. Klavinskis LS, et al. Intranasal immunization with plasmid DNA-lipid complexes elicits mucosal immunity in the female genital and rectal tracts. J Immunol. 1999 ;162(1):254-62.

78. Amici A, et al. Genetic immunization against neu/erbB2 transgenic breast cancer. Cancer Immunol Immunother. 1998 ;47(4):183-90

79. Ward-G; Rieder-E; Mason .Plasmid DNA encoding replicating foot-and-mouth disease virus genomes induces antiviral immune responses in swine. J-Virol. 1997 ; 71(10): 7442.

80. Kodihalli-S; et all . Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine tothe hemagglutinin. J-Virol. 1997 May; 71(5): 3391.

81. Sakaguchi-M; et all , Protection of chickens from Newcastle disease by vaccination with a linear plasmid DNA expressing the F protein of Newcastle disease virus. Vaccine. 1996 ; 14(8): 747-52I.

82. Nichols W.W et al , Potential DNA vaccine integration into host cell genome. Annal. NY. Acad. Scie.

83. Knowles. R.M et all, (1998) Human Gene Therapy, 9: 249-269.

84. Yu, Z et all, 1998, Vaccine. 16(17), 1660-1667.

85. Blezinger P, et all, Pericle F. Intratracheal administration of interleukin 12

plasmid-cationic lipid complexes inhibits murine lung metastases.Hum Gene Ther 1999 10(5):723-31 .

86. Mancini M, et all. Regulation of hepatitis B virus mRNA expression in a hepatitis B surface antigen transgenic mouse model by IFN-gamma-secreting T cells after DNA-based immunization. J Immunol 1998 ;161(10):5564-70

87. Whitton, L. J et all. DNA Immunization : Mechanistic studies. Vaccine 1999, 17: 1612-1619.

88. Plotkin SA & Mortimer EA (Eds). Vaccines. Philadelphia WB Saunders, 1994.

89. Kruskall, M. et all. (1992). The immune response to hepatitis B vaccine in humans: Inheritance patterns in families. J. Exp. Med. 175, 495-502.

90. Pougatcheva SO ,et all. Development of a rubella virus DNA vaccine. Vaccine 1999 ;17(15-16):2104-12.

91. Cornell KA, et all. Genetic immunization of mice against Listeria monocytogenes using plasmid DNA encoding listeriolysin O. J Immunol 1999 ;163(1):322-9.

92. Pereira-Chioccola V et all. Comparison of antibody and protective immune responses against Trypanosoma cruzi infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. Parasite Immunol 1999 ;21(2):103-10.

93. Endresz V, et all. Induction of human cytomegalovirus (HCMV)-glycoprotein B neutralizing antibody and phosphoprotein 65 (pp65)-specific cytotoxic T lymphocyte responses by naked DNA immunization. Vaccine 1999 ;17(1):50-8.

94. Walker PS, et all. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12 and IFN-gamma-dependent mechanisms. Proc Natl Acad Sci U S A 1999 ;96(12):6970-5.

95. Gu ML, et all. Protection against anthrax toxin by vaccination with a DNA plasmid encoding anthrax protective antigen.Vaccine 1999 ;17(4):340-4

96. Gurunathan S, et all. (1997). Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with Leishmania major. Journal of Experimental Medicine, 186: 1137-1147.

97. Loirat D, et all. Muscle-Specific Expression of Hepatitis B Surface Antigen: No Effect on DNA-Raised Immune Responses. Virology 1999 ;260(1):74-83

98. Brinster RL, et all (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 836-840.

99. Kozak M (1989). Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. Molecular and Cellular Biology, 9: 5134-5142.

100.Yu Z, et all. Protection by minigenes: a novel approach of DNA vaccines. Vaccine 1998 ,16(17):1660-7.

101. Darquet AM, et all. A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. Gene Ther 1997 ,4(12):1341-9.

102. Buendia, M.A. (1992) Hepatitis B viruses and hepatocellular carcinoma. Adv. 69- Cancer Res. 59, 167-226.

103. Purcell, R.H. (1994) Hepatitis viruses: Changing patterns of human disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2401-2406.

104. Antohi S,et all. The reactivity pattern of hemagglutinin-specific clonotypes from mice immunized as neonates or adults with naked DNA. Int Immunol 1998 ;10(5):663-8.

American Academy of Pediatrics 1999) www.fda.gov/cber/vaers/report.htm).

Chen SC et all . Protective immunity induced by oral immunization with a rotavirus DNA vaccine et encapsulated in microparticles. J Virol 1998 ;72 (7) :5757 – 61.

Paglia P et all . Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination With Salmonella7 typhimurium, results in protective immunity against a murine .fibrosarcoma. Blood .1998 ;92(9): 3172-6 .

McCluskie MJ, et all, Route and Method of Delivery of DNA Vaccine Influence Immune Responses in Mice and Non-Human Primates. Mol Med 1999 (5) :287-300.

Shi Z, Curiel DT, Tang DC . DNA-based non-invasive vaccination onto the skin. Vaccine 1999 ;17(17):2136-41 .

Well et all , FEBS Lett 332, 179-182, 1993.7.

Klinman DM, et all. (1998). CpG motifs as immune adjuvants. Vaccine,17: 19-25.

Boyle et all, Nature 392, 408-410, 1998.

Elkins KL, et all . Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. J Immunol 1999; 162 (4) :2291-8.

Sato Y, et all. (1996). Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. Science, 273: 352-354.

Piedrafita D, Protective Immune Responses Induced by Vaccination with an Expression Genomic Library of Leishmania major. J Immunol 1999 ;163(3):1467-1472.

Coon B, et all.DNA immunization to prevent autoimmune diabetes. J Clin Invest 1999 ;104 (2)189-194.

Van Der Bruggen et al 1991 Science, 254:1643-7, 84- P.

Ying H, et all. Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. Nat Med 1999 ;5(7):823-7 .

Human Gene Therapy 1999;10:1251-1257.

Roy K , et all , Oral gene delivery with chitosan DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. Nat Med 1999 ; 5 (4) : 387 - 91 .

Broide D et all DNA- Based Immunization for Asthma. Int Arch Allergy Immunol 1999 .118(2-4):453-456. -

More et al. Hum. Gen. Therapy , 8, 293 -300, 1997.

Sarboloki M.N, Karami A**.** Lohrasebi T, Sadeghizadeh M, Yaghobi M.M. Dendrosome A novel Familly of Vehicle for Transfection and Therapy. Biotechnica Congress. Oct 28-30, 1999 Hannover Germany.

Neglia F, DNA vaccination against the -associated antigen folate receptor alpha (FRalpha) induces cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice. Cancer Gene Ther 1999 ; 6(4):349-57.

Davis HL. DNA vaccines for prophylactic or therapeutic immunization against hepatitis B virus. Mt Sinai J Med 1999 ;66(2):84-90.

Robert Finn . (1998) DNA Vaccines Generate Excitement As Human Trials Begin, The Scientist 12 (6).

DL Lodmell,et all. 1998 . DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. Nature Medicine 4(8):949-52 .

E.D. Anderson et al., Molecular Marine Biologyand Biotechnology, 5[2];114-22, 1996.

Pfarr DS, Differential effects of polyadenylation regions on gene expression in mammalian cells. DNA 1986 ;5(2):115-22.

Klavinskis LS, et all . Intranasal immunization with plasmid DNA-lipid complexes elicits mucosal immunity in the female genital and rectal tracts.
J Immunol 1999 ;162(1):254-62.

Tanghe A, Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors. J Immunol 1999 ;162(2):1113-9.

Lowrie DB, et all. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination.
Nature 1999 ;400(6741):269-71.

Immunization of Patients with Metastatic Melanoma Using DNA Encoding t The .GP100 Melanoma Antigen, Warren Grant Magnuson Clinical Center (CC)National Institutes of Health (NIH) Bethesda, Maryland 20892. Last update: 07/31/99.

Rosenberg. 1998. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma,
Nat Med, Vol. 4, p. 321.

RESEARCH ON DNA VACCINES FOR INFECTIOUS DISEASES
NIH GUIDE, Volume 22, Number 22, June 18, 1993.

Delivery of exogenous DNA sequences in a mammals 3 Dec 1996, Vical Inc. USA.

Induction of a protectiv immune response in a mammal by injecting a DNA sequence 31 Dec 1996, vical Inc. USA.

Genetic immunization, The Wistar Institute, Jan 1997.

DNA vaccines against rotavirus infections, University of Massachusetts

Medical Center. 15 April 1997.

Method of in vivo delivery of functioning foreign genes, Vanderbilt University (Nashville, TN) Oct 1997.

Polynucleotide tuberculosis vaccine, Merck & Co., Inc , APr 1998.

Dry powder formulations of polynucleotide complexes, Regents of the University of California, Sept 1998.

Protective 17 KDA malaria hepatic and erythrocytic stage immunogen and gene Secretary of the Navy (Washington, DC) , Sept 1998.

Nucleic acid respiratory syncytial virus vaccines. Connaught Laboratories Ltd (North York, Canada), Dec 1998.

Ulmer B, et all. Toward the development of DNA Vaccine. (1996) Current Opinion in Biotechnology 7: 653-658.

S. Kodihalli, H. Goto, D.L. Kobasa, S. Krauss, Y. Kawaoka and R.G. Webster. 1999. DNA vaccine encoding hemagglutinin provides protective immunity against H5N1 influenza virus infection in mice. Journal of Virology, 73: 2094-2098. 11-Mar-1999.

Hu GJ, Wang RY, Han DS, Alter HJ, Shih JW . Characterization of the humoral and cellular immune responses against hepatitis C virus core induced by DNA-based immunization. Vaccine 1999 ;17(23-24):3160-70.

Arichi T,et all. (2000) Prophylactic DNA vaccine for hepatitis C virus (HCV) infection: HCV, Proc Natl Acad Sci U S A, 97: 297-302.

Le TP, Coonan KM, e all. Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. Vaccine 2000 Mar 1;18(18):1893-1901.

Lefevre P,et all. Cloning of the gene encoding a 22-kilodalton cell surface antigen of mycobacterium bovis BCG and analysis of its potential for DNA vaccination against tuberculosis. Infect Immun 2000 ; 68 (3) :1040-7.

Abendroth A, et all, Analysis of immune responses to varicella zoster viral proteins induced by DNA vaccination. Antiviral Res 1999 ;44(3):179-92.

Dubensky TW, et all. Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1984 ;81(23):7529-33.

Wang S, et all , Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with calcium- or aluminum phosphate. Vaccine 2000 Jan 18;18(13):1227-35.

Konishi E,et all.(2000) A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. Vaccine, 18: 1133-1139.

Vercammen M, et all. (2000) DNA vaccination with genes encoding Toxoplasma gondii antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. Infect Immun, 68: 38-45.

Hooper JW, et all, (2000) DNA vaccination with vaccinia virus L1R and A33R genes protects mice against a lethal poxvirus challenge. Virology, 266: 329-339.

Jain V, Mekalanos JJ (2000) Use of lambda phage S and R gene products in an inducible lysis system for Vibrio cholerae- and Salmonella enterica serovar typhimurium-based DNA vaccine delivery systems. Infect Immun, 68: 986-989.

Singh M, Briones M, Ott G, O'Hagan D (2000) Cationic microparticles A potent delivery system for DNA vaccines : Proc Natl Acad Sci U S A, 97: 811-816.

Fan H, Lin Q, Morrissey GR, Khavari PA, Immunization via hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin. Nat Biotechnol 1999 ;17(9):870-2.

CpG ImmunoPharmaceuticals , http://www.cpgdna.com.

J Infect Dis 2000;181:317-324.

Encke J, et all , DNA vaccines. Intervirology 1999 ;42(2-3):117-24.

Delivery of a PCR amplified DNA fragment into cells: a model for using synthetic genes for gene therapy -Gene Ther 1997 4(5)449-454.

DNA vaccines, New era in Vaccinology , Ann.N.Y. Acad. Scie, Vol 772, 1995.

Mol Med Today 2000 Feb;6(2):66-71.

Gebhard JR, et all, DNA immunization utilizing a herpes simplex virus type 2 myogenic DNA vaccine protects mice from mortality and prevents genital herpes. Vaccine 2000 ;18(17):1837-1846.

Bennett AM, et all.Gene gun mediated vaccination is superior to manual delivery for immunisation with DNA vaccines expressing protective antigens from Yersinia pestis or Venezuelan Equine Encephalitis virus. Vaccine 1999 ;18(7-8):588-96.

Abendroth A, et all. Analysis of immune responses to varicella zoster viral proteins induced by DNA vaccination. Antiviral Res 1999 ;44(3):179-92.

Gendon IuZ, Progress in developing viral polynucleotide (DNA) vaccines. Vopr Virusol 1999 ;44(4):148-54.

Beard C, et all, Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and non-replicating nucleic acids in swine. J Biotechnol 1999 ;73(2-3):243-9.

He J, Hoffman SL, Hayes CG , DNA inoculation with a plasmid vector carrying the hepatitis E virus structural protein gene induces immune response in mice. Vaccine 1997 ,15 (4):357-62.

Lu F, et all. A preliminary study on immune response to hepatitis E virus DNA vaccine in mice. Chin Med J (Engl) 1996 ;109(12):919-21.

Rollier C, et all, Protective and therapeutic effect of DNA-based immunization against hepadnavirus large envelope protein. Gastroenterology 1999 ;116 (3) : 658-65.

David L. et all, The Effect of Different Promoters And Adjuvants for Intramuscularly Injected Dna Vaccines In Chickens, Second Annual Conference on Vacine Research March 28 - 30, 1999. National Foundation for Infectious Diseases.

Bohm W et all, Routes of plasmid DNA vaccination that prime murine humoral and cellular immune responses. Vaccine 1998 ;16(9-10):949-54.

Inchauspe G, DNA vaccination for the induction of immune responses against hepatitis C virus proteins. Vaccine 1997 ;15 (8) :853-6.

Nakano I, et all. Immunization with plasmid DNA encoding hepatitis C virus envelope E2 antigenic domains induces antibodies whose immune reactivity is linked to the injection mode. J Virol 1997 ;71(9):7101-9.

Cho JH, Lee SW, Sung YC, Enhanced cellular immunity to hepatitis C virus nonstructural proteins by codelivery of granulocyte macrophage-colony stimulating factor gene in intramuscular DNA immunization. Vaccine 1999 ;17(9-10):1136-44.

Inchauspe G DNA vaccine strategies for hepatitis C. J Hepatol 1999

;30(2):339-46.

Papa S, et all.Development of a multigenic plasmid vector for HCV DNA immunization. Res Virol 1998 ;149(5):315-9.

Zhu N, et all, Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. J Virol 1998 ;72 (5) :3691-7.

Routes Anne Fournillier et all. Modulation of Immune Responses to Hepatitis C Virus Envelope E2 Protein Following Injection of Plasmid DNA Using Single or Combined Delivery. Hepatology, 28, (1). 237-244,

Xavier forns, DNA Immunization of Macaques and chimpanzees with plasmid encoding hepatitis C virus envelope E2 protein. Hepatology, 30 , (4) 353.

Ledwith B, et all. Plasmid DNA vaccine assay for intergration into the host genome. International Conferrence ,, Development and clinical progress of DNA vaccine,, Oct 6-8 1999, Paul-Ehrlich Inst, Langen, Germany.

Karami A. et all, Nucleic Acid Vaccination Against hepatitis B surface Antigen. International Conferrence ,, Development and clinical progress of DNA vaccine,, Oct 6-8 1999, Paul-Ehrlich Inst, Langen, Germany.

Karami A, Nucleic Acid Vaccination Against Hepatitis B Surface Antigen in Mice. Second Annual Conference on Vacine Research , March 28 - 30, 1999 National Foundation for Infectious Diseases USA.

Henke A, Immune response in Coxsakie Virus B3- infectedd mice following DNA vaccination. International Conferrence ,, Development and clinical progress of DNA vaccine,, Oct 6-8 1999, Paul-Ehrlich Inst, Langen, Germany..

Krinner, E. Establishing Anti- Idiotypic DNA Vaccine Against Multiple myeloma. International Conferrence ,, Development and clinical progress of DNA vaccine,, Oct 6-8 1999, Paul-Ehrlich Inst, Langen, Germany.

Santak M, Construction of Mumps Virus DNA Vaccine. International Conferrence ,, Development and clinical progress of DNA vaccine,, Oct 6-8 1999, Paul-Ehrlich Inst, Langen, Germany.

Schmidt T, Plasmid fermentation . International Conferrence ,, Development and clinical progress of DNA vaccine,, Oct 6-8 1999, Paul-Ehrlich Inst, Langen, Germany.

Smahel M. DNA immunization against oncogenic human papilomavirus type 16 . International Conferrence , Development and clinical progress of DNA vaccine, Oct 6-8 1999, Paul-Ehrlich Inst, Langen, Germany.

Robaczewska T, Naked DNA immunization induces specific humoral response to duck hepatitis B virus capsid protein . International Conferrence : Development and clinical progress of DNA vaccine, Oct 6-8 1999, Paul-Ehrlich Inst, Langen, Germany.

Nishmura Y, A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural protein under the elongation factor 1 promoter elicit HCV - specific T- lymphocyte (CTL). Vaccine 2000, 18, 675-680.

Mohamad N Sarboloki, Majid Sadeghizadeh, Mohamad M Yaghobi . ALI Karami and Tahmineh Lohrasebi, Dendrosome : a Novel Familly of Vehicle for Transfection and Therapy. J. Chem Technology and Biotechnology, 75:1-4 (2000).

DNA Vaccines , Methods and protocols . D. B. Lowrie and R. G Whalen. In Methods in Molecular Mefdicine, Human press 2000.

Evaluation of single and combination DNA vaccines against Leishmania mexicana in mice and hamsters Dumonteil E, Universidad Autńoma de Yucat⌡n, Mexico
FOURTH TDR 1 /IDRI 2 MEETING ON SECOND-GENERATION VACCINES AGAINST LEISHMANIASIS Universidad Autńoma de Yucat⌡n, Mexico, 1-3 May 2001.

Cysteine proteinases of leishmanias: a putative vaccine
candidate , Rafati S, Pasteur Institute of Iran, Tehran, FOURTH TDR 1 /IDRI 2 MEETING ON SECOND-GENERATION VACCINES AGAINST LEISHMANIASIS Universidad Autńoma de Yucat⌡n, Mexico, 1-3 May 2001.

پیوستها

پیوست ۱ : فهرست واکسنهای سازمان بهداشت جهانی (ماه می ۲۰۰۱)

WHO list of vaccines for purchase by UN agencies As of May 2001

PRODUCER	VACCINES
Aventis Pasteur, Canada	DTP, measles
Aventis Pasteur, France	BCG, DT, dT, DTP, OPV, TT, measles, Hib, yellow fever, Meningococcal A + C
Biken, Japan	Measles
Bio Farma, Indonesia	DT, DTP, OPV, TT, measles
Cheil Jedang, Korea	Hepatitis B (plasma derived)
Chiron Behring, Germany	DTP
Chiron Vaccines, Italy	DTP, MMR (measles, mumps, rubella combination), OPV, measles, Hib
CSL, Australia	DT, DTP, TT
GlaxoSmithKline, Belgium	Hepatitis B, Hib, OPV, Meningococcal A + C, DTP-Hep B, DTP-Hep B to be combined with Hib (pentavalent), MMR
GreenCross Vaccine Corporation, Korea	Hepatitis B (recombinant)
Human Co., Hungary	DT, TT
Institut Pasteur Dakar, Senegal	Yellow fever
Japan BCG	BCG
Lucky Goldstar, Korea	Hepatitis B (recombinant)
Medeva, U.K.	BCG, Yellow fever
Merck and Co. Inc, USA	Hepatitis B
National Center for Infectious and Parasitic Diseases, Intervax, Bulgaria	BCG
Serum Institute of India	DT, dT, DTP, TT, MR, measles
Statens Seruminstitut, Denmark	BCG
Swiss Serum and Vaccine Institute, Switzerland	DT, TT, measles
Wyeth Lederle Vaccines and Pediatrics, USA	Hib

پیوست ۲ : ثبت اختراعات (Patent) مرتبط با واکسنهای ژن بترتیب سال ثبت :

2002

1. Formulation of nucleic acid and acemannan
2. Nucleic acid immunization using a virus-based infection/transfection system
3. Compositions and methods for the prevention and treatment of M. tuberculosis
4. Prokaryotic polynucleotides polypeptides and their uses
5. Noninvasive genetic immunization, expression products therefrom and uses thereof
6. Methods of inducing mucosal immunity

2001

1. Methods of identifying bacterial genes that are incompatible with bacterial pathogenicity, and the use of such genes, such as cadA, to reduce pathogenicity in a bacteria or to combat pathogenic bacterial infections.
2. Vectors and methods for immunization or therapeutic protocols.
3. Episomal expression vector for human gene therapy
4. Marek's disease virus vaccines for protection against Marek's disease
5. DNA cytokine vaccines and use of same for protective immunity against multiple sclerosis
6. Nuclear targeted peptide nucleic acid oligomer
7. Tick (Ixodes scapularis) vector saliva-induced Lyme disease spirochete (Borrelia burgdorferi) antigens as vaccine candidates
8. Adjuvant and vaccine compositions containing monophosphoryl lipid A
9. Replication genes and gene products from small cryptic plasmids and methods for constructing controlled-replication plasmid vectors
10. Compounds and methods for immunotherapy and diagnosis of tuberculosis
11. Vaccines against circovirus infections
12. Vaccines with enhanced intracellular processing
13. Plasmid-based vaccine for treating atherosclerosis
14. Method for generating transcriptionally active DNA fragments

2000

1. Method of making microencapsulated DNA for vaccinatiion and gene therapy

2. Method for genetic immunization and introduction of molecules into skeletal muscle and immune cells

3. DNA vaccines against tick-borne flaviviruses

4. Cryptopain vaccines, antibodies, proteins, peptides, DNA and RNA for prophylaxis, treatment and diagnosis and for detection of cryptosporidium species

5. Nucleic acid vaccines for ehrlichia chaffeenis and methods of use

6. Method for purifying covalntly closed circular DNA

7. Immunostimulatory nucleic acid molecules

8. Vectors for DNA immunization against cervical cancer

9. DNA immunization against chlaymdia infection

10. Plasmids encoding immunogenic proteins and intracellular targeting sequences
11. :
12. Composite vaccine which contains antigen, antibody and recombinant DNA and its preparing method

13. Induction of a protective immune response in a mammal by injecting a DNA sequence

14. Methods of augmenting mucosal immunity through systemic priming and mucosal boosting

15. Immunostimulatory nucleic acid mole

16. Immunization of infants

17. Coccidiosis polypeptide and vaccines

18. DNA based vaccination of fish

19. Therapeutic delivery using compounds self-assembled into high axial ratio microstructures

20. Method for treating allergic lung disease

21. DNA vaccines against rotavirus infections

22. Chemical modification of DNA using peptide nucleic acid conjugates

23. Vaccine compositions and methods useful in inducing immune protection against arthritogenic peptides involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis

24. Method for introducing and expressing genes in animal cells, and live invasive bacterial vectors for use in the same

25. Method for immunization against hepatitis B

26. Polynucleotide immunogenic agents

27. Functional DNA clone for hepatitis C virus (HCV) and uses thereof

28. DNA vaccines for eliciting a mucosal immune response

29. Method for introducing pharmaceutical drugs and nucleic acids into skeletal muscle

30. Gene delivery by microneedle injection

31. HIV envelope polypeptides and vaccine

32. Induction of nucleic acid into skin cells by topical application

33. Mycobacterium tuberculosis specific proteins and genes, mixtures of antigens and uses thereof

34. Bi-functional plasmid that can act as both a DNA vaccine and a recombinant virus vector

35. Genetically modified tumor-targeted bacteria with reduced virulence

36. Recombinant dengue virus DNA fragment

37. DNA vaccine for parvovirus

38. Nucleic acid vaccines against rickettsial diseases and methods of use

39. Recombinant avian type i interferon

40. Nucleic acid based immunotherapy of chronic hepatitis B infection

41. Bovine viral diarrhea virus II vaccine and method of immunization

42. Methods for enhancement of protective immune responses

1999

1. Recombinant live feline immunodeficiency virus and proviral DNA vaccines

2. Mycobacterium vaccae antigens

3. Expression library immunization

4. Vaccines for plague

5. Gene delivery system

6. DNA vaccines for herpes simplex virus

7. DNA vaccination for induction of suppressive T cell response

8. Nucleotide sequences encoding a CS2 pilin protein

9. DNA transcription unit vaccine that protect against avian influenza viruses and methods of use thereof

10. Bayou hantavirus and related methods

11. Plasmids suitable for gene therapy

12. Treatment of infection in fowl by oral administration of avian interferon

13. Immunomodulatory peptides

14. Methods for enhancement of protective immune responses

15. Method for introducing and expressing genes in animal cells and live invasive bacterial vectors for use in the same

16. Polynucleotide vaccine for papillomavirus

1998

1. Black creek canal hantavirus and related methods

2. Compositions and methods for administering Borrelia DNA

3. Nucleic acid respiratory syncytial virus vaccines

4. Alternative open reading frame DNA of a normal gene and a novel human cancer antigen encoded therein

5. Shigella vector for delivering DNA to a mammalian cell

6. Vaccine compositions and method for induction of mucosal immune response via systemic vaccination

7. Recombinant gas vesicles and uses thereof

8. Protective 17 KDA malaria hepatic and erythrocytic stage immunogen and gene

9. Dry powder formulations of polynuleotide complexes

10. Sperm as immunogen carriers

11. DNA-based vaccination of fish

12. Vaccine compositions and methods useful in inducing immune protection against arthritogenic peptides involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis

13. Polynucleotide tuberculosis vaccine

14. Immunogenic composition against Bovine Viral Diarrhea Virus II glycoprotein 53 (BVDV-II gp53)

15. Purification of plasmid DNA during column chromatography

1997

1. Expression library immunization

2. Generation of antibodies through lipid mediated DNA delivery

3. Expression of exogenous polynucleotide sequences cardiac muscle of a mammal

4. Method of in vivo delivery of functioning foreign genes

5. Plasmids suitable for IL-2 expression

6. DNA vaccines against rotovirus infections

7. Specific DNA and RNA sequences associated with US IBDV variants, vector carrying DNA sequences, host carrying cloned vector, deduced amino acid sequences, vaccine and method of vaccination

8. Genetic immunization

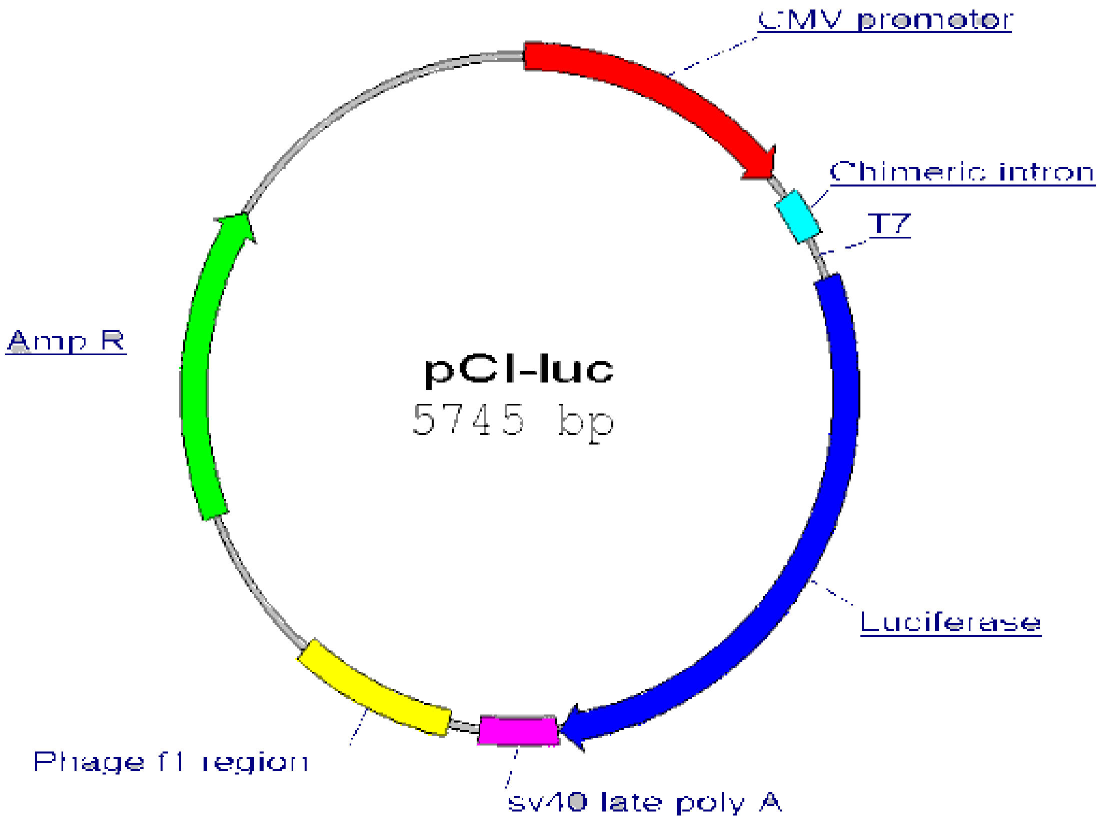
1996

1. -Induction of a protective immune response in a mammal by injecting a DNA sequence

2. Delivery of exogenous DNA sequences in a mammal

3. Production of pharmaceutical-grade plasmid DNA

پیوست ۳ : ساختمان پلاسمید حاوی ژن لوسیفراز جهت مطالعه القائ ژن در واکسنهای ژنی


CMV promotor
Chimeric intron
T7
Amp R
pCI-luc
5745 bp
Luciferase
Phage f1 region
sv40 late poly A

پیوست ۴ : فهرست و مشخصات واکسنهای مختلف موجود بر علیه عوامل عفونی شایع و نظامی

Licensed Product:	Anthrax Vaccine
Countermeasure to	**Bacillus anthracis**
Status	Licensed in U.S. since 1971
Expected Route of Exposure	Inhalation or possibly dermal
Availability	Currently available
Manufacturer	Michigan Department of Public Health
Product Description	Formalin-inactivated cellular supernatant vaccine comprising the protective antigen (PA) of the organism.
Effectiveness	By Route of Exposure: Protects against dermal exposure in occupational setting. Probably protects against inhalant exposure based on animal studies and occupational experience. Vaccine may be less effective with overwhelming challenge of inhaled spores. Immune Response in Humans: Antibody against PA develops in 85 to 95 percent after initial 3 doses, and in 100 percent after 12-month dose.
Dose & Administration	Primary Immunization Dose/Schedule: 0.5 ml dose/6 dose primary series given at 0, 2, 4 weeks, then 6, 12, and 18 months. Minimum Time/&num Doses to Protection: Primate studies indicate that protection is afforded 2 weeks after minimum of 2 doses (abbreviated series) given approximately 2 weeks apart. Booster Schedule: Yearly after primary series. Preliminary data indicate boosters given after longer intervals (up to 2 years after initial abbreviated series) may be effective.
Side Effects	Primarily local: 5 to 8 percent will have tenderness, redness, swelling, itching at inoculation site for up to 72 hours; less than 1 percent will have more severe local reactions; moderate systemic reactions and severe reactions such as anaphylaxis are rare.
Shipping/Handling Requirements	Store at 2-8 degrees C.
Other Available Countermeasures	Antibiotic prophylaxis given immediately post-exposure with penicillin, ciprofloxacin or doxycycline may suppress clinical illness.Concomitant vaccination is necessary to produce immunity and prevent illness after antibiotic withdrawal. Penicillin or ciprofloxacin may be used to treat symptomatic cases: effectiveness depends on how early treatment is started and the antibiotic sensitivity of organism. Case-fatality rate is high following onset of pulmonary signs and symptoms.

Licensed Product:	**Plague Vaccine**
Countermeasure to	Bubonic plague, caused by *Yersinia pestis*, a gram-negative coccobacillus
Status	Licensed
Expected Route of Exposure	Inhalation or possibly via infected vectors (fleas) or secondary transmission
Availability	Currently available
Manufacturer	Greer Laboratories, P.O. Box 800, Lenoir, NC 28645
Product Description	Formalin-killed, whole cell vaccine product now being manufactured by Greer Laboratories.
Effectiveness	By Route of Exposure: Experience from Vietnam, where plague is endemic, suggests that the vaccine protects against intradermal exposure. Recent animal studies (mice, guinea pigs, and primates), however, cast doubt on the efficacy of the current vaccine against inhalant exposure. Immune Response in Humans: After 3 doses most recipients have titers greater than 1:128 against the F1 antigen. Approximately 7 to 8 percent of recipients do not show any antibody response to the vaccine.
Dose & Administration	Primary Immunization Dose/Schedule: The standard schedule that is recommended is 1.0 ml IM, followed by 0.2 ml IM 1 to 3 months later, and 0.2 ml IM at 3 to 6 months. Preliminary data indicate that a rapid immunization schedule of 0.5 ml IM at 0, 1, and 2 weeks produces similar antibody titers to that observed after the third dose of the standard schedule. Minimum Time/&num Doses to Protection: Extrapolations from animal studies indicate that at least 3 doses will yield protective immune response to intradermal challenge at 4-7 months under the current dose schedule. Booster Schedule: Recipients should receive 3 additional doses of a 0.2 ml IM booster every 6 months after the primary series, and then 0.2 ml every 1 to 2 years subsequently for continued protection.
Side Effects	8 to 10 percent of inoculations result in local reactions including redness, swelling, induration, and tenderness. These reactions usually resolve within 48 hours. About 7 to 10 percent of inoculations result in systemic side effects of malaise, lymph node swelling, and fever. Severe side effects are rare. Systemic side effects tend to increase in frequency after more than 5 doses of the vaccine have been given to an individual.

Shipping/Handling Requirements	Store at 4 degrees C.
Other Available Countermeasures	Post-exposure prophylaxis with either doxycycline or tetracycline has been recommended in known exposures. Based upon animal experiments, ciprofloxacin may also provide protection. Doxycycline and ciprofloxacin resistant strains have been reported. The addition of chloramphenicol or ceftriaxone is recommended for plague meningitis.

Licensed Product:	**Smallpox Vaccine (Vaccinia)**
Countermeasure to	Variola virus (smallpox), a member of the Orthopoxvirus
Status	Licensed, Wyeth Laboratories
Expected Route of Exposure	Inhalation or direct contact
Availability	Currently available
Manufacturer	Repository at Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia
Product Description	Live, attenuated vaccine
Effectiveness	By Route of Exposure: Reliable data are surprisingly sparse as to efficacy and durability of protection. Indirect evidence indicates a highly effective vaccine.
	Immune Response in Humans: > 95% of primary vaccinees develop neutralizing or hemagglutination inhibition antibody titers greater than or equal to 1:10.
Dose & Administration	Primary Immunization Dose/Schedule: 1 dose by the scarification technique Minimum Time/&num Doses to Protection: 14 days/ 1 dose Booster Schedule: Repeat dose every five to ten years for protection against variola major virus
Side Effects	Infrequent other than short-lived mild temperature elevation. Occurrences of complications are as follows: Cases/1,000,000 Vaccine Recipients: Accidental autoinoculation: 25.4 primary, 0.8 booster Generalized vaccinia: 23.4 primary, 1.2 booster Eczema vaccinatum: 10.4 primary, 0.9 booster Progressive vaccinia: 0.9 primary, 0.7 booster Post-vaccinal encephalitis: 2.9 primary, < 0.1 booster

Shipping/Handling Requirements	Maintain at 2-8 degrees C, reconstitute with sterile water. May be used for three months after reconstitution if stored below 0 degrees C. Sterilize vials and syringes prior to disposal.
Other Available Countermeasures	Vaccinia immune globulin - 0.6 mg/kg IM, or primary vaccination within 3-4 days of exposure yields some protection. Vaccinia immune globulin should be kept available for potential complications.

Licensed Product:	**Adenovirus Vaccine, Type 4, Live, Oral**
Countermeasure to	Acute, febrile respiratory tract infections caused by adenovirus type 4 infection
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Wyeth-Ayerst, P.O. Box 8299, Philadelphia, PA 19101, 610-688-4400
Product Description	This vaccine contains a selected viable strain of Type 4 adenovirus prepared from tissue cultures of human diploid fibroblast cells (Strain WI 38). The vaccine is formulated as a tablet, each of which contains not less than 32,000 tissue-culture infective doses.
Effectiveness	The use of adenovirus vaccines has been shown to achieve dramatic reduction in the occurrence of disease and associated hospital admissions in military environments.
Dose & Administration	Single tablet taken orally without chewing, preferably 2-4 weeks prior to exposure. May be administered simultaneously with the type 7 vaccine.
Side Effects	Administration of vaccine to several hundred-thousand military recipients has been accomplished without evidence of untoward effects.
Shipping/Handling Requirements	Maintain tablets at 2-8 degrees C.
Other Available Countermeasures	Adenovirus Type 7 vaccine

Licensed Product:	**Adenovirus Vaccine, Type 7, Live, Oral**
Countermeasure to	Acute, febrile respiratory tract infections caused by adenovirus type 7 infection
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Wyeth-Ayerst, P.O. Box 8299, Philadelphia, PA 19101, 610-688-4400
Product Description	This vaccine contains a selected viable strain of Type 7 adenovirus prepared from tissue cultures of human diploid fibroblast cells (Strain WI 38). The vaccine is formulated as a tablet, each of which contains not less than 32,000 tissue-culture infective doses.
Effectiveness	The use of adenovirus vaccines has been shown to achieve dramatic reduction in the occurrence of disease and associated hospital admissions in military environments.
Dose & Administration	Single tablet taken orally without chewing, preferably 2-4 weeks prior to exposure. May be administered simultaneously with the type 4 vaccine.
Side Effects	Administration of vaccine to several hundred-thousand military recipients has been accomplished without evidence of untoward effects.
Shipping/Handling Requirements	Maintain tablets at 2-8 degrees C.
Other Available Countermeasures	Adenovirus Type 4 vaccine

Licensed Product:	**Cholera Vaccine**
Countermeasure to	Cholera
Status	FDA licensed
Availability	Currently available, but not recommended
Manufacturer	Wyeth-Ayerst, P.O. Box 8299, Philadelphia, PA 19101, 610-688-4400
Product Description	Sterile suspension of equal parts of phenol-killed Ogawa and Inaba serotypes of Vibrio cholerae .
Effectiveness	This cholera vaccine does not prevent transmission of infection, and is not recommended by the World Health Organization, or the DoD.
Dose & Administration	The primary immunizing course consists of two doses administered 7-30 days apart. Vaccine may be administered subcutaneously, intramuscularly or intradermally. For persons over 10 yrs, individual doses (for both primary series and boosters) are 0.2 ml, 0.5 ml, and 0.5 ml for the intradermal, subcutaneous and intramuscular routes, respectively. Subsequent single booster doses should be given every 6 months to those entering endemic areas.
Side Effects	Typical local injection site reactions may occur and persist for a few days. Other fairly common reactions include malaise, headache, and mild-to-moderate temperatures that persist for 1-2 days.
Shipping/Handling Requirements	Store between 35-46 degrees F, do not freeze.
Other Available Countermeasures	Rehydration orally if possible; tetracycline 2 gms per day in divided doses.

Licensed Product:	**Hepatitis A Vaccine, Inactivated**
Countermeasure to	Hepatitis A virus
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	SmithKline Beecham, P.O. Box 7929, Philadelphia, PA 19101, 215-751-4000
Product Description	Formalin-inactivated Hepatitis A virus (strain HM17C) in suspension ready for injection. Virus particles derived from human diploid cells.
Effectiveness	In clinical studies of over 400 adults, 96% of subjects developed antibody within 1 month of a single 1.0 ml dose (80-98% developed antibody within 15 days). 100% of 269 vaccinees produced protective antibodies (within 1 month) after a booster dose was given 6 months after the primary injection. Based on data from clinical trials in 19,000 Thai children, the protective efficacy was determined to be 94%.
Dose & Administration	Primary immunization is a single 1.0 ml dose administered IM. A booster dose (1.0 ml IM) is recommended after 6-12 months. May be given with immune globulin, though resulting vaccine-induced antibody levels may be lower.
Side Effects	Side effects occurring in 1-10% of injections include redness and swelling at the injection site, fatigue, malaise, fever > 37.5 degrees C, anorexia, and nausea. All other reported adverse reactions have occurred in less than 1% of injections.
Shipping/Handling Requirements	Store between 2-8 degrees C; do not freeze.
Other Available Countermeasures	Immune globulin is available for induction of passive immunity

Licensed Product:	**Hepatitis B Vaccine (Recombinant)**
Countermeasure to	Hepatitis B virus
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Merck & Co., P.O. Box 4, West Point, PA 19486-0004, 800-672-6372; SmithKline Beecham, P.O. Box 7929, Philadelphia, PA 19101, 215-751-4000
Product Description	Both the Merck and the SmithKline Beecham vaccines are non-infectious subunit vaccines derived from Hepatitis B surface antigen (HBSA) produced in yeast cells.
Effectiveness	Merck Vaccine: For 1,213 adults receiving a 3 dose regimen, vaccination produced protective antibodies in 96%. SmithKline Beecham Vaccine: Following vaccination with the recommended 3 dose regimen, protection was observed in 79% at 6 months and 96% after the 7th month in healthy adults and adolescents.
Dose & Administration	Merck Vaccine: The recommended dose regimen is 3 doses administered IM in the deltoid muscle at day 0, 1 month and 6 months. The recommended dose varies with age: for persons < 20 yrs, administer three 0.5 ml doses. For persons > 20 yrs, administer three 1.0 ml doses. SmithKline Beecham Vaccine: Recommended: 1.0 ml administered IM into deltoid muscle at day 0, 1 month, and 6 months. An alternative regimen (3 doses) for travelers to high risk areas is also recommended, consisting of doses at 0, 1 month, and 2 months. Though no efficacy data are available for exposed persons, it is recommended that they receive Hepatitis B immune globulin (0.06 ml IM) as soon as possible, followed by recommended 3 dose Hepatitis B vaccination initiated within 7 days.
Side Effects	Merck Vaccine: Side effects occurring after < 1% of injections: fatigue, weakness, headache, fever > 100 degrees F, as well as injection site reactions (i.e., pain, redness, swelling). SmithKline Beecham Vaccine: Side effects recorded from 1-10% of injections: fever (> 100 degrees F), headache, dizziness, as well as injection site reactions (pain, swelling, etc)
Shipping/Handling Requirements	Vaccine requires no reconstitution; store at 36-46 degrees F
Other Available Countermeasures	There are also plasma-derived Hepatitis B vaccines that are apparently less immunogenic.

Licensed Product:	**Human Tetanus Immune Globulin**

Countermeasure to	Exotoxin of tetanus organism Clostridium tetani
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Miles Biologicals, 400 Morgan Lane, West Haven, CT 06516
Product Description	Sterile solution of tetanus hyperimmune immunoglobulin pooled from individuals immunized with tetanus toxoid vaccine. The solution is 15-18% protein, of which 90% is IgG.
Effectiveness	20 patients with tetanus were treated with human tetanus immune globulin in single doses. Six patients died of causes other than tetanus. No further data are given.
Dose & Administration	Recommended for administration during the initiation of active immunization with tetanus toxoid vaccines: 250 units should be administered by deep IM injection. For wound management treatment, dosing depends on the vaccination status of the individual. For persons known to have completed active tetanus immunization, no immune globulin is required if last immunization was < 10 yrs prior for clean, minor wounds and < 5 yrs prior for other wounds. For all wounds other than clean, minor wounds, if last immunization was > 5 yrs prior, administer 250 units by deep IM injection along with a tetanus/diphtheria toxoid booster.
Side Effects	No major side effects other than soreness at injection site and occasional mild fever.
Shipping/Handling Requirements	Maintain at 2-8 degrees C.
Other Available Countermeasures	See tetanus toxoid and tetanus/diphtheria combination toxoid vaccines.

Licensed Product:	**Immune Globulin, Human U.S.P.**
Countermeasure to	Hepatitis A
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Armour Pharmaceutical Company, 502 Arcola Road, P.O. Box 1200, Collegeville, PA 19426-0107, 610-454-8000
Product Description	A sterile solution of immunoglobulin principally IgG, containing approximately 17% protein. Product is intended for intramuscular injection to provide passive immunity to hepatitis A.
Effectiveness	Peak IgG levels are obtained within 2 days of injection, with a plasma half-life in normal individuals of 23 days. Passive immunization with immune globulin attenuates hepatitis A, and its prophylactic value is maximized when given before or soon after exposure.
Dose & Administration	For persons entering endemic areas, the dose depends on the anticipated length of stay. For less than 3 months, 0.02 ml/kg administered IM in the gluteal region is recommended. For greater than 3 months, 0.06 ml/kg is recommended, repeated every 4-6 months. Total doses over 10 ml should be divided and injected in several muscle sites to reduce local pain and discomfort.
Side Effects	Local pain at the injection site, hives and angioedema may occur. Anaphylactic reactions have been noted but are rare.
Shipping/Handling Requirements	Store at 2-8 degrees C (35-46 degrees F). Do not freeze. Do not use past expiration date. Visually inspect for the presence of particulate matter and discoloration. If present, discard.
Other Available Countermeasures	Hepatitis A Vaccine

Licensed Product:	**Influenza Virus Vaccine, Trivalent Types A and B recent Formula**
Countermeasure to	Selected strains of influenza virus
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Connaught Laboratories, Swiftwater, PA 18370, 800-VACCINE
Product Description	The recent formula is a sterile suspension for intramuscular injection containing formaldehyde-inactivated influenza virus harvested from infected chick embryos. It contains 45 mg hemagglutinin per 0.5 ml dose, combining 15 mg each of the recent strains according to recommendations of the USPHS. Whole virion and split virion formulations are available. The injectable solution is essentially clear and slightly opalescent in color. It should be noted that influenza vaccines are updated annually to incorporate antigen characteristics of each year's current strains.
Effectiveness	Most vaccinated children and young adults develop high post-vaccination hemagglutinin-inhibition antibody titers that protect against infection by strains similar to those in the vaccine and related variants. The effectiveness of a current year's influenza vaccine in preventing or attenuating illness varies, depending on the similarity between vaccine strains and viruses circulating in the population. When there is a good match, the protective efficacy is typically 70% in young adults.
Dose & Administration	For persons > 12 years of age, immunization consists of a single 0.5 ml injection administered IM In the deltoid muscle.
Side Effects	The composition of influenza vaccines rarely causes systemic or febrile reactions. It cannot cause influenza. The most frequent side effect is soreness at the infection site.
Shipping/Handling Requirements	Store between 2-8 degrees C (35-46 degrees F). Do not freeze.
Other Available Countermeasures	Each year, a new formulation of the influenza vaccine is developed.

Licensed Product:	**Japanese Encephalitis Vaccine, Inactivated**
Countermeasure to	Japanese encephalitis virus
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Research Foundation for Microbial Diseases, Osaka, Japan, distributed in the U.S. by Connaught Labs, Swiftwater, PA 18370, 800-VACCINE
Product Description	Freeze-dried preparation for reconstitution consisting of formaldehyde-inactivated Japanese encephalitis virus (Nakayama - NIH strain) derived from infected mouse brains.
Effectiveness	The precise relationship between antibody level and efficacy has not been established. Tests in 43,708 Thai children vaccinated with two 1.0 ml doses of JE vaccine resulted in only 2 cases of JE. Three-dose vaccination is recommended by CDC for full immunogenicity. CDC experience shows neutralizing antibodies in > 80% following two doses, falling rapidly after 6 months, for most JE vaccines. Two 3-dose regimens (0, 7 & 14 days vs 0, 7 & 30 days) were evaluated for immunogenicity in 538 people. All had neutralizing antibodies at 2 and 6 months. Persons given a third dose on day 30 initially showed higher antibody response, but no difference in antibody levels was observed after 12 months. Duration of protection is unknown. Follow-up study in 273 of initial 538 subjects tested the effectiveness of boostering. 252 out of 273 persons were boostered at 1 year - all had antibody 1 year post-booster. Antibody persisted for two years in the other 12 persons who did not receive boosters.
Dose & Administration	Three 1.0 ml doses given subcutaneously on day 0, 7, & 30 is recommended (alternate schedule of 0, 7 & 14 days can be used if recommended regimen is impractical due to time constraints). When neither 3-day schedule is possible, two doses given a week apart will produce protective antibodies in about 80%. A single 1.0 ml booster dose may be given subcutaneously after 2 years. Efficacy of additional boosters beyond 2 yrs has not been tested. Vaccinated persons should be monitored for 30 min and have ready access to medical care for 10 days after vaccination. Injectable epinephrine should be immediately available in the event of anaphylatic reactions (severe allergic reaction with shock).
Side Effects	Headache, rash, edema and generalized hives or angioedema may occur usually within 10 days (most within 2 days, some up to 17 days) of vaccination. Side effects are more likely in persons with history of hives. An Army study of 4,034 showed arm soreness (23%), local redness (5%), headache (15%), and fever (6%). In a 3-dose vaccination study in 538 persons, incidence of side effects diminishes for subsequent doses. Less than 1% of side effects were reported as severe. Data from a Navy immunization program of 35,253 persons showed allergic reactions (rash, wheezing) occurring in about 63 per 10,000 persons, none of the reactions were considered life-threatening.
Shipping/Handling	Reconstituted vaccine should be stored at 35-46 degrees F and used

Requirements	within 8 hours. Inspect for discoloration and presence of particulate matter; if present, do not administer. Reconstituted vaccine is a clear, colorless liquid.
Other Available Countermeasures	Symptomatic and supportive care if sick Use of skin and clothing insect repellents to prevent infection

Licensed Product:	**Measles, Mumps & Rubella Vaccine, Live**
Countermeasure to	Measles (rubeola), mumps, and rubella (German measles) viruses
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Merck & Co., P.O. Box 4, West Point, PA 19486-0004, 800-672-6372
Product Description	Freeze-dried preparation for reconstitution consists of a combination of live, attenuated measles virus (derived from Ender's attenuated Edmonston strain), live mumps virus (Jeryl Lynn - B level strain), and live-attenuated rubella (virus/Wistar RA 27/3 strain). Measles and mumps viruses are grown in chick embryos; rubella virus is grown in human diploid cells.
Effectiveness	Vaccine is a combination of individual measles, mumps and rubella vaccines (MMR). In clinical studies of 279 unimmunized children, a single dose of the MMR vaccine produced protective antibodies to measles, mumps, and rubella in 95%, 96%, and 99%, respectively. The rubella strain used in this vaccine more closely mimics natural infection and produces increased and broader profile protective antibody responses than other rubella vaccines. Protective antibody levels for all three viruses persist up to 11 years without substantial decline.
Dose & Administration	Administer a single 0.5 ml dose subcutaneously in the outer aspect of upper arm. Revaccination of previously immunized persons entering endemic areas is recommended to prevent import of any of the viruses into the U.S. upon return. To avoid subsequent unnecessary vaccination, ensure written documentation of vaccination. Do not give immune globulin concurrently. Routine concurrent administration with diphtheria, tetanus, pertussis, or oral poliovirus vaccines is not recommended but is acceptable. Measles vaccine should not be given less than one month before or after administration of other virus vaccines. Epinephrine injection should be immediately available in the event of anaphylactic reaction.
Side Effects	The MMR vaccine produces mild, modified symptoms of the natural illnesses, such as fever, rash, swollen glands. Moderate fever (< 103 degrees F) occurs occasionally; higher fever is rare. Joint pain and transient arthritis, features of natural rubella infections, may occur. Other side effects may include malaise, sore throat, cough, runny nose,

	headache, dizziness, fever, rash, nausea, vomiting, and diarrhea; mild local reactions such as redness, tenderness, stinging; swollen testes, nerve deafness, blood changes (thrombocytopenia), hemorrhagic lesions in the skin. Other reported side effects include otitus media, conjunctivitis, and polyneuritis. Rare effects may include vasculitis, optic neuritis, and encephalitis.
Shipping/Handling Requirements	Protect from light. Store refrigerated at 36-46 degrees F. When reconstituted, vaccine is clear yellow. Visually inspect for presence of particulate matter or discoloration. If present, do not use. Discard reconstituted vaccine if not used within 8 hrs.
Other Available Countermeasures	Individual licensed vaccines for measles and rubella, and a combination measles/rubella vaccine are available.

Licensed Product:	**Measles & Rubella Vaccine, Live (M-R-Vax)**
Countermeasure to	Measles (rubeola) and rubella (German measles) viruses
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Merck & Co., P.O. Box 4, West Point, PA 19486-0004, 800-672-6372
Product Description	Freeze-dried preparation for reconstitution consists of a combination of live-attenuated measles virus (derived from Ender's attenuated Edmonston strain) and live attenuated rubella virus (Wistar RA 27/3 strain). The viruses used in this combination are identical to those used in individual measles and rubella vaccines.
Effectiveness	Vaccine is a combination of individual measles and rubella vaccines (M-R). In clinical studies of 237 unimmunized children, a single dose of the M-R vaccine produced protective antibodies to measles and rubella in 95% and 99%, respectively. The rubella strain used in this vaccine more closely mimics natural infection and produces increased and broader profile protective antibody responses than other rubella vaccines.
Dose & Administration	Administer a single 0.5 ml dose subcutaneously in the outer aspect of upper arm. Revaccination of previously immunized persons entering endemic areas is recommended to prevent import of any of the viruses into the U.S. upon return. To avoid unnecessary vaccination, ensure written documentation of vaccination. Do not give with immune globulin. Concurrent admin of diphtheria, tetanus, pertussis, or oral poliovirus vaccines is not recommended but is acceptable. Measles vaccine should not be given less than one month before or after administration of other virus vaccines. Epinephrine injection should be immediately available in the event of anaphylactic reaction.
Side Effects	The M-R vaccine produces mild, modified symptoms of the natural illnesses, such as fever, rash, swollen glands. Moderate fever (< 103

	degrees F) occurs occasionally; higher fever is rare. Arthralgia and transient arthritis, features of natural rubella infections, may occur. Other side effects may include malaise, sore throat, cough, runny nose, headache, dizziness, fever, rash, nausea, vomiting, and diarrhea; mild local reactions such as redness, tenderness, stinging; nerve deafness, blood changes (thrombocytopenia), hemorrhagic lesions in the skin. Other reported side effects include allergic reactions, otitis media, conjunctivitis and polyneuritis. Rare effects may include vasculitis, optic neuritis, and encephalitis.
Shipping/Handling Requirements	Protect from light. Store refrigerated at 36-46 degrees F. When reconstituted, vaccine is clear yellow. Visually inspect for presence of particulate matter or discoloration. If present, do not use. Discard reconstituted vaccine if not used within 8 hrs.
Other Available Countermeasures	Individual licensed vaccines for measles and rubella, and a combination measle/mumps/rubella vaccine are available.

Licensed Product:	**Measles Virus Vaccine, Live Attenuated**
Countermeasure to	Measles virus (rubeola)
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Merck & Co., P.O. Box 4, West Point, PA 19486-0004, 800-672-6372
Product Description	Freeze-dried preparation for reconstitution of a more attenuated line of live measles virus derived from Enders' attenuated Edmonston strain.
Effectiveness	Extensive clinical trials indicate that the measles vaccine is highly immunogenic and generally well tolerated. Single injections have been shown to induce measles-inhibiting antibodies in more than 97% of susceptible persons. These antibody levels persist for at least 13 years. Vaccine may provide some protection if given immediately after exposure to natural measles.
Dose & Administration	Administer a single 0.5 ml dose subcutaneously in the outer aspect of upper arm. Revaccination of previously immunized persons entering endemic areas is recommended to prevent import of the virus into the U.S. upon return. Do not give immune globulin concurrently. Simultaneous administration of mumps and rubella vaccines is common. If measles-only vaccine is unavailable, combined measles, mumps, and rubella vaccine can be used regardless of immune status to mumps and rubella. Routine concurrent administration with diphtheria, tetanus, pertussis, or oral poliovirus vaccines is not recommended but is acceptable. Measles vaccine should not be given less than one month before or after administration of other virus vaccines. Epinephrine injection should be immediately available in the event of anaphylactic

	reaction.
Side Effects	Vaccine produces a modified measles reaction. Occasionally, moderate fever (101-103 degrees F) occurs in the first month; higher fever is rare. When present, fever and/or rash (mild) often occur between days 5 and 12. More severe rash and other more severe reactions requiring hospitalization are rare.
Shipping/Handling Requirements	Protect from light. Store refrigerated at 36-46 degrees F. When reconstituted, vaccine is clear yellow. Visually inspect for presence of particulate matter or discoloration. If present, do not use. Discard reconstituted vaccine if not used within 8 hrs.
Other Available Countermeasures	Inactivated measles vaccine Combined measles, mumps and/or rubella vaccines

Licensed Product:	**Meningococcal Vaccine (A/C/Y/W-135)**
Countermeasure to	Neisseria meningitidis , the causative agent of meningitis and meningococcemia
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Connaught Laboratories, Swiftwater, PA 18370, 800-VACCINE
Product Description	Freeze-dried preparation of the group-specific polysaccharide antigens of N. meningitidis Groups A, B, C, and W-135.
Effectiveness	This vaccine induces antibodies to the serogroups A, C, Y, & W-135 of N. meningitidis . The serogroup A microbe is the most common cause of epidemics outside the U.S. The group A component has been shown to have a clinical efficacy of 85-95% and to be of use in controlling epidemics. Similar efficacy has been observed for the group C component in military recruits. Group Y and W-135 components have been demonstrated as safe and efficacious, though clinical protection has not been demonstrated directly. Protective antibody levels are achieved within 10-14 days of a single dose of vaccine. Protection against groups A & C serotypes last for up to 3 years.
Dose & Administration	Primary immunization: single 0.5 ml dose administered subcutaneously. Need for revaccination in adults is unknown. Declining antibody levels after three years suggest the possible need for revaccination for individuals at high risk.
Side Effects	Adverse reactions are infrequent and usually mild, typically being limited to redness at injection site lasting 1-2 days. As with any vaccine, hypersensitivity reactions are possible. Epinephrine injection should be immediately available in the event of an allergic reaction.
Shipping/Handling	Freeze dried and reconstituted vaccine should be stored at 35-46 degrees

Requirements	F. Multidose vials of reconstituted vaccine should be discarded after 5 days; single dose vials are discarded after 1 day. Injection solutions should be visually inspected to ensure the absence of particulate matter or discoloration prior to injection.
Other Available Countermeasures	Parenteral aqueous penicillin; prophylactic rifampin.

Licensed Product:	**Mumps Virus Vaccine, Live**
Countermeasure to	Mumps virus
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Merck & Co., P.O. Box 4, West Point, PA 19486-0004, 800-672-6372
Product Description	Freeze-dried preparation for reconstitution containing live mumps virus (Jeryl Lynn B level strain) derived from chick embryos.
Effectiveness	Extensive clinical trials have shown the vaccine to be highly immunogenic and well tolerated. A single injection produces mumps neutralizing antibodies in > 97% of children and > 93% of adults for at least 15 years. The close resemblance of vaccine-induced antibody response to that of the natural infection suggests that vaccine protection may be permanent (although this hasn't been completely established).
Dose & Administration	Single 0.5 ml dose administered subcutaneously into the outer aspect of upper arm. Although not recommended for routine concurrent administration with diphtheria/tetanus/pertussis or oral poliovirus vaccines, these vaccines can be administered concurrently (using separate injection sites) under extenuating circumstances. The mumps vaccine should not be given less than one month before or after administration of other virus vaccines. DO NOT administer to persons with any febrile or respiratory illness, and DO NOT administer immune globulin concurrently.
Side Effects	The vaccine produces a modified, non-communicable mumps infection. Occasional adverse effects include mild fever (< 103 degrees F), cough, runny nose, diarrhea, swollen lymph nodes. Fever > 103 degrees F is rare.
Shipping/Handling Requirements	Protect unreconstituted and reconstituted vaccine from light; store at 36-46 degrees F; discard reconstituted vaccine if not used within 8 hrs.
Other Available Countermeasures	This vaccine is also a component of the combined measles/mumps/rubella vaccine. For concurrent vaccination for mumps and measles or rubella, the combination vaccines are available as described elsewhere in this document. If only mumps vaccination is required, but single vaccine is not available, the combination vaccine may be used according to its specific instructions.

Licensed Product:	**Pneumococcal Vaccine**
Countermeasure to	The 23 most prevalent types of Streptococcus pneumoniae , causative agent of approximately 25% of serious cases of pneumonia
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Lederle Laboratories, American Cyanamid Co., Pearl River, NY 10965 (Also supplied by Merck & Co.)
Product Description	A mixture of purified capsular polysaccharide antigens from 23 types of S. pneumoniae in thiomersal preservative.
Effectiveness	More than 90% of adults show at least a twofold rise in type-specific antibodies for all 23 types within 2-3 weeks of immunization. Antibody levels remain elevated for at least 5 years but may fall to pre-immunization levels by 10 years.
Dose & Administration	Vaccine is administered intramuscularly or subcutaneously. Immunization requires a single 0.5 ml dose. Reimmunization should be cautiously considered for only the highest risk situations in persons who received the 23 valent vaccine more than 6 years earlier. Reimmunization should be strongly considered for persons receiving the 14 valent vaccine (a different vaccine) if they are at the highest risk of fatal infection only.
Side Effects	Relatively low incidence of adverse effects has been reported. Observed reactions are typically short-lived and mild. In one study of 32 patients, 72% experienced soreness at injection site up to 3 days post-administration. Mild fever (less than 100 degrees F) and muscle pains usually resolve in 24 hrs. Other side effects including fever over 102 degrees F, rash, arthralgia, arthritis, adenitis, and serious anaphylactoid reactions are rare.
Shipping/Handling Requirements	Store refrigerated at 36-46 degrees F. Do not freeze.
Other Available Countermeasures	In addition to the 23 valent vaccines, lesser valent vaccines (8, 13, and 14) have been used clinically.

Licensed Product:	**Poliovirus Vaccine, Inactivated**
Countermeasure to	Paralytic poliomyelitis caused by poliovirus infection
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Connaught Laboratories, Swiftwater, PA 18370, 800-VACCINE
Product Description	A clear, colorless sterile suspension for subcutaneous injection. Contains formaldehyde-inactivated polioviruses (Types 1-3) produced by microcarrier culture. Each 0.5 ml immunizing dose contains 40D, 8D, and 32D antigen units of Type 1, 2, and 3 polioviruses, respectively.
Effectiveness	Studies with infants and children have shown the vaccine to produce high levels of neutralizing antibodies for all three types of poliovirus in > 99% of vaccinees after two doses. Field studies in Europe with a similar inactivated poliovir us vaccine indicated the persistence of circulating antibodies for at least 10 years.
Dose & Administration	For unvaccinated adults, the recommended primary series is two 0.5 ml s.c. injections at a 1-2 month interval, followed by a booster dose (0.5 ml s.c.) 6-12 months later. If less than 3 months are available, three doses can be given one month apart. If less than one month is available, a single dose of this product or oral vaccine is recommended. Incompletely vaccinated adults at high-risk should either complete a primary series or receive oral vaccine. Previously vaccinated persons of increased risk may receive a single dose as a booster.
Side Effects	In a U.S. study, there were no significant local or systemic reactions. 7%, 12%, and 4% of children experienced temperatures over 100.6 degrees F after the 1st, 2nd and 3rd doses, respectively.
Shipping/Handling Requirements	Store between 2-8 degrees C (35-46 degrees F). Do not freeze.
Other Available Countermeasures	A licensed, live, attenuated oral poliovirus vaccine is available from Lederle Laboratories.

Licensed Product:	**Poliovirus Vaccine, Live, Oral**
Countermeasure to	Poliomyelitis caused by poliovirus types 1, 2, & 3
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Lederle Laboratories, American Cyanamid Company, Pearl River, NY 10965
Product Description	Mixture of Sabin strain types 1, 2 and 3 attenuated polioviruses propagated in monkey kidney cell culture.
Effectiveness	When used in the prescribed manner, type-specific neutralizing antibodies

	to poliovirus types 1, 2, and 3 will be induced in 95% or more of susceptible persons.
Dose & Administration	Unimmunized persons should receive two doses (0.5 ml each) 6-8 weeks apart (8 weeks preferred). A third dose is given 6-12 months after the second dose. In cases of substantial risk, the third dose can be given 6-8 weeks after the second dose. Previously immunized persons entering endemic areas should be given a supplemental dose (0.5 ml). Oral poliovirus vaccine can be administered simultaneously with tetanus/diphtheria toxoid, pertussis vaccine, and measles-mumps-rubella vaccine. Vaccine should not be administered during the course of any acute illness or when adverse gastrointestinal symptoms are present (vomiting, diarrhea).
Side Effects	Paralytic disease has been observed rarely in persons receiving the vaccine, and in persons who were in close contact with a person receiving the vaccine. The historical incidence in over 274 million administrations is 1 per 2.6 million. The incidence of paralytic disease is slightly higher for persons in contact with an individual undergoing immunization than for persons being immunized.
Shipping/Handling Requirements	Store below 32 degrees F. Must be completely thawed prior to use. May undergo up to 10 freeze-thaw cycles, provided it never exceeds 46 degrees F during thaw, and cumulative thaw time is less than 24 hrs. If thawed beyond 24 hrs, vaccine must be used within 30 days. Normally pink in color, but slight yellowing is acceptable.
Other Available Countermeasures	An inactivated poliovirus vaccine (IPV) is available and efficacious. In unimmunized adults, ACIP recommends primary immunization with IPV rather than oral vaccine.

Licensed Product:	**Rabies Vaccine, Globulin (Human), USP**
Countermeasure to	Rabies
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Miles Inc., Consumer Health Care Products, P.O. Box 340, Elkhart, IN 46515
Product Description	A sterile solution of antirabies immunoglobulin for intramuscular administration prepared from human plasma.
Effectiveness	Rabies immunoglobulin (human) is extremely effective in preventing rabies in humans when administered immediately after exposure. It can also be used simultaneously with initial vaccination using duck-embryo or human diploid cell derived vaccines. It should not be used in individuals who have previously been vaccinated against rabies and who have confirmed adequate antibody titer against rabies. Such people should receive vaccine only.

Dose & Administration	For treatment: A single dose containing 20 IU/kg of body weight intramuscularly, preferably at the time of first vaccine dose, but at a different site. It may be given through the seventh day after first vaccine dose. If anatomically feasible, up to one half the dose should be thoroughly infiltrated in the area around the wound. The remainder of the dose should be administered in the gluteal area.
Side Effects	Soreness at the site of injection and mild temperature elevation may occur. Sensitization to repeated injections may occasionally occur in immunoglobulin deficient patients.
Shipping/Handling Requirements	Provided in 10 ml vials with an average potency of 150 IU/ml. Store refrigerated between 2-8 degrees C (35-46 degrees F). Do not freeze.
Other Available Countermeasures	Antirabies vaccines are available as licensed products.

Licensed Product:	**Rabies Vaccine, Human Diploid Cell**
Countermeasure to	Rabies virus from bites or non-bite exposure to tissues from infected animals
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Pasteur Merieux; Lyon, France, distributed in the U.S. by Connaught Labs, Swiftwater, PA 18370 800-VACCINE
Product Description	Freeze-dried suspension of rabies virus for reconstitution. Virus is harvested from human diploid cells and inactivated chemically.
Effectiveness	Protection: WHO specifies protection at 0.5 IU specific antibody titer, while CDC specifies a 1:5 titer for complete inhibition of the RFFIT test as acceptable. Protection is described in terms of Pre and Post exposure to rabies. Pre: Clinical trials in Europe - 100% of patients receiving 2 doses 1 month apart developed protective antibody titer > 10 IU. Clinical trials in U.S. - vaccination gave mean titers of 12.5 IU/ml and 5.1 IU/ml at day 49 and day 90, respectively. Post: 45 persons bitten by rabid animals were vaccinated within hours and up to 14 days after the bites. All were fully protected against rabies. Note - Pre-exposure vaccination does not eliminate need for treatment following exposure
Dose & Administration	Vaccine should be administered in deltoid muscle. Pre-exposure immunization consists of three 1.0 ml doses on days 0, 7, and 21 or 28. Boosters not required except under extreme circumstances. In high risk situations, serologic tests every 2 years should be conducted. If serology

	reveals titer below 1:5, boost with a single 1 ml dose. Post-exposure therapy of previously immunized persons consists of two 1.0 ml doses (IM) at day 0 and day 3 post-exposure. No rabies immune globulin (RIG) is necessary. For previously unimmunized persons, ACIP recommends five IM doses (1 ml each) at day 0, 3, 7, 14, & 28 in conjunction with RIG at day 0.
Side Effects	Local reactions (pain, redness, swelling, itching) at injection site and mild systemic reactions (nausea, headache, abdominal pain, muscle aches, dizziness) were noted in 25% & 20% of cases, respectively. "Immune complex-like" reactions, consisting of hives, arthritis, joint pain, nausea and vomiting, fever have occurred in up to 6% of persons receiving boosters (much less frequent in primary immunization). If these reactions occur, test serum for antibody titers to determine whether therapy should be continued. Treatment of allergic reactions with corticosteroids may interfere with development of immunity.
Shipping/Handling Requirements	Freeze-dried vaccine is stable if refrigerated between 36-45 degrees F. Do not freeze. Preparation contains no preservatives and must be used immediately after reconstitution. If not administered promptly, discard.
Other Available Countermeasures	Post-exposure treatments have included rabies immune globulin. An intradermally administered version of the same rabies vaccine is also available from Connaught.

Licensed Product:	**Rubella Virus Vaccine, Live**
Countermeasure to	Rubella virus (German measles)
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Merck & Co., P.O. Box 4, West Point, PA 19486-0004, 800-672-6372
Product Description	Freeze-dried preparation for reconstitution containing live-attenuated rubella virus (Wistar RA 27/3 strain) derived from human diploid cells.
Effectiveness	Extensive clinical trials have been conducted with the rubella strain used in this vaccine (28,000 subjects), as well as this particular formulation (11,000). A single injection produces rubella-inhibiting antibodies in more than 97% of susceptible persons. The rubella strain used in this vaccine produces higher and broader profile antibody responses, and stimulates natural infection more closely than strains used in other vaccines. Vaccine-induced antibody levels persist for at least 10 years.
Dose & Administration	Single 0.5 ml dose administered subcutaneously. Although not recommended for routine concurrent administration with diphtheria/tetanus/pertussis or oral poliovirus vaccines, these vaccines can be administered concurrently (using separate injection sites) under extenuating circumstances. However, the rubella vaccine should not be

	given less than one month before or after administration of other virus vaccines. DO NOT administer to persons with any febrile or respiratory illness, and DO NOT administer immune globulin concurrently.
Side Effects	Vaccine produces a modified, non-communicable rubella infection, possibly consisting of rash, sore throat, fever, headache, dizziness, nausea, vomiting, diarrhea, runny nose, mild regional lymphadenopathy, joint pain, and/or transient arthritis. Fever is usually less than and rarely greater than 103 degrees F.
Shipping/Handling Requirements	Protect unreconstituted and reconstituted vaccine from light; store at 36-46 degrees F; discard reconstituted vaccine if not used within 8 hrs.
Other Available Countermeasures	This vaccine is also a component of combined measles/rubella and measles/mumps/rubella vaccines. For concurrent vaccination for rubella and measles or mumps, the combination vaccines are available as described elsewhere in this document. If only rubella vaccination is required, but single vaccine is not available, combination vaccines may be used according to their specific instructions.
Licensed Product:	**Tetanus & Diphtheria Toxoid**
Countermeasure to	Exotoxin produced by Clostridium tetani (tetanus) and diphtheria toxin produced by Corynebacterium diphtheriae
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Connaught Laboratories, Swiftwater, PA, Lederle Laboratories, Pearl River, NY and Wyeth-Ayerst, Philadelphia, PA
Product Description	Formaldehyde detoxified tetanus and diphtheria toxins.
Effectiveness	Despite the ubiquitous presence of C. tetani spores, only 90 cases are reported annually in the U.S., testimony to the efficacy of tetanus vaccination. Complete primary immunization with tetanus toxoid typically produces protective levels of antitoxin that persist for at least 10 years. Likewise, the incidence of diphtheria has decreased from 200,000 cases in 1921 (before general use of toxoid vaccine) to only 15 cases reported between 1980-1983 and only one case in 1994. As with tetanus toxoid, diphtheria toxoid produces protective levels of antitoxin for at least 10 years.
Dose & Administration	Most Americans have undergone primary immunization. Vaccine is administered intramuscularly in the deltoid muscle. Primary immunization consists of two 0.5 ml doses 1-2 months apart, followed by a reinforcing dose (0.5 ml) 1 year after the second dose. Previously immunized persons require boosters consisting of a single 0.5 ml dose every 10 years. For wound management or diphtheria exposure, boosters should only be given if the previous booster or primary immunization was more than 5 years prior. If a booster is given sooner than 10 years for wound management or diphtheria exposure, the next booster should be administered only after 10 years. More frequent boostering can

	increase the incidence and severity of adverse reactions.
Side Effects	Local reactions (redness, soreness) are common and require no therapy. Nodule, sterile abscess formation, or subcutaneous atrophy may occur at injection site. Fever, chills, and myalgias & headache may occur. High fever may occur when boosters are given too frequently. Neurologic complications, including convulsions, encephalopathy, mono- and polyneuropathies, and hypersensitivity reactions including rash, arthralgia, difficulty breathing and shock may be severe but occur rarely.
Shipping/Handling Requirements	Store at 36-46 degrees F, do not freeze. Properly prepared vaccine is a homogenous white suspension. Visually inspect for presence of particulate matter and discoloration; if present, do not administer.
Other Available Countermeasures	Tetanus immune globulin 3,000-6,000 IU, IM Diphtheria antitoxin 20,000-100,000 units IM after sensitivity testing

Licensed Product:	**Tetanus Toxoid**
Countermeasure to	Exotoxin produced by Clostridium tetani
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Lederle Laboratories, American Cyanamid Company, Pearl River, NY 10965
Product Description	Formaldehyde detoxified tetanus and diphtheria toxins.
Effectiveness	Despite the ubiquitous presence of C. tetani spores, only 90 cases are reported annually in the U.S., testimony to the efficacy of tetanus vaccination. Complete primary immunization with tetanus toxoid typically produces protective levels of antitoxin that persist for at least 10 years.
Dose & Administration	Most Americans have undergone primary immunization. Vaccine is administered intramuscularly in the deltoid muscle. Primary immunization consists of two 0.5 ml doses 1-2 months apart, followed by a reinforcing dose (0.5 ml) 6-12 months after the second dose. Previously immunized persons require boosters consisting of a single 0.5 ml dose every 10 years. For wound management, boosters should only be given if the previous booster or primary immunization was more than 5 years prior. If a booster is given sooner than 10 years for wound management, the next booster should be administered only after 10 years. More frequent boostering can increase the incidence and severity of adverse reactions.
Side Effects	Local reactions (redness, soreness) are common and require no therapy. Nodule, sterile abscess formation, or subcutaneous atrophy may occur at injection site. Fever, chills, and myalgias and headache may occur. High fever may occur when boosters are given too frequently. Neurologic complications, including

	convulsions, encephalopathy, mono- and polyneuropathies, and hypersensitivity reactions including rash, arthralgia, difficulty breathing and shock may be severe but occur rarely.
Shipping/Handling Requirements	Store at 36-46 degrees F, do not freeze. Properly prepared vaccine is a homogenous white suspension. Visually inspect for presence of particulate matter and discoloration; if present, do not administer. Shake vigorously prior to administration.
Other Available Countermeasures	Tetanus immune globulin 3,000-6,000 IU, IM A combined tetanus and diphtheria toxoid vaccine, utilizing the same tetanus component, is available
Licensed Product:	**Typhoid Vaccine; Live, Oral Ty21a**
Countermeasure to	Typhoid fever
Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Swiss Serum and Vaccine Institute, distributed in the U.S. by Berna Products Corp., Coral Gables, FL 33146
Product Description	Live, attenuated vaccine for oral administration. Contains 2-6 X 109 viable attenuated S. typhi (Strain TY21a) and 6-50 X 109 nonviable S. typhi Ty21a. The vaccine is freeze-dried and prepared in capsule form for oral administration.
Effectiveness	Immunization with three doses of vaccine resulted in a 95% decrease in the incidence of typhoid fever during a 3-year field study of > 32,000 Egyptian children. In large field trials (Chile), the vaccine efficacy for subjects aged 15-44 years was approximately 60%. Efficacy has been shown to persist for up to 5 years.
Dose & Administration	For primary immunization four doses are required: one capsule should be taken orally approximately 1 hour before a meal on days 1, 3, 5 and 7. An optimal booster schedule has not been determined, but for cases of repeated or continuous exposure, the currently suggested booster regimen is to repeat the primary series every 5 years.
Side Effects	In several large field trials, as well as "post-marketing surveillance", noted side effects were infrequent, transient, and self-limiting. Reported effects included nausea, abdominal cramps, vomiting, and skin rash.
Shipping/Handling Requirements	Store between 2-8 degrees C (35-46 degrees F). Each package shows an expiration date.
Other Available Countermeasures	Two licensed typhoid vaccines are available: a killed vaccine and a Vi polysaccharide vaccine
Licensed Product:	**Typhoid Vi Polysaccharide Vaccine**
Countermeasure to	Typhoid fever

Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Connaught Laboratories, Swiftwater, PA 18370, 800-VACCINE
Product Description	Sterile solution for intramuscular injection containing the cell surface Vi polysaccharide extracted from Salmonella typhi Ty2 strain. The vaccine appears as a clear, colorless solution. Each 0.5 ml dose contains 25 μ g of purified Vi polysaccharide.
Effectiveness	3,454 subjects were vaccinated in Katmandu, Nepal to test the efficacy of this vaccine. The overall protective efficacy was determined to be 74% during 20 months of post-vaccination follow-up. Correlation of vaccine-induced antibody levels with subsequent efficacy, or levels that will provide protection have not been determined. Immunogenicity studies have shown that a single dose produces a four-fold increase in antibody levels in 88-96% of subjects within 1 month post-vaccination.
Dose & Administration	Primary immunization is a single 0.5 ml IM injection administered in the deltoid region. A booster injection (0.5 ml IM) may be given under conditions of repeated or continuous exposure. Optimal booster schedules have not been determined, but the current recommendation is every two years (for persons at high-risk).
Side Effects	Adverse reactions noted in clinical trials in over 10,000 subjects were predominantly minor transient local reactions. Local tenderness and pain were commonly observed, while induration and erythema were observed occasionally (approximately 5%). Common systemic reactions in approximately 15% were malaise and headache. Myalgia, nausea and diarrhea were observed in about 5% of cases, and slight fever (> 100 degrees F) was noted in about 1% of subjects.
Shipping/Handling Requirements	Store between 2-8 degrees C (35-46 degrees F). Do not freeze.
Other Available Countermeasures	Two licensed typhoid vaccines are available: a killed S. typhi vaccine and a live, attenuated oral S. typhi vaccine . Comparative efficacy studies of this and other typhoid vaccines have not been performed.

Licensed Product:	**Yellow Fever Vaccine**
Countermeasure to	Yellow fever virus

Status	FDA licensed
Availability	Currently available
Manufacturer	Connaught Labs, Swiftwater, PA 18370, 800-VACCINE
Product Description	Freeze-dried vaccine for reconstitution is prepared by culturing the 17D strain of yellow fever virus in chick embryos.
Effectiveness	Tests in 18 persons showed production of protective antibodies in all subjects. Immunity develops by the 10th day. WHO recommends revaccination every 10 years.
Dose & Administration	A single 0.5 ml dose administered subcutaneously. Should be administered one month apart from other live-virus vaccines, but data indicate the simultaneous administration with the most widely used live vaccines have not resulted in impaired antibody responses or increased side effects. Epinephrine injection should be immediately available in the event of anaphylactic reaction (severe allergic reaction with shock).
Side Effects	Fever or malaise, typically appearing 7-14 days after immunization, has been noted with a frequency of 10%.
Shipping/Handling Requirements	Freeze dried vaccine must be maintained constantly at 32-41 degrees F. Reconstituted vaccine should be used within 1 hour or discarded. Properly reconstituted, vaccine appears slightly opalescent and light orange.
Other Available Countermeasures	Symptomatic and supportive treatment Use of skin and clothing insect repellents to prevent infection

RDA Product:	**Tick-Borne Encephalitis Vaccine, Inactivated**
Countermeasure to	Tick-Borne Encephalitis
Status	IND &num 1836
Availability	Must be purchased from the manufacturer

Manufacturer	Immuno AG, Industria Strasse 67, 1220 Vienna, Austria
Product Description	A highly purified, formalin-inactivated virus vaccine. Provided ready to use in single dose syringes.
Effectiveness	This vaccine has been administered as a licensed product in Europe to over 3 million people, but is not yet licensed by FDA for use in the U.S. The vaccine must be administered under a contingency use protocol as an Investigational New Drug (IND). The vaccine produces antibodies in up to 93% of individuals receiving the first 2 doses of the 3 dose series, and in virtually all persons following the third dose. The vaccine is 80 to 90% effective in preventing disease.
Dose & Administration	An accelerated dose schedule is the only schedule allowed under the contingency protocol. Primary immunization is three 0.5 ml doses intramuscularly at days 0, 7, 28. A booster dose of 0.5 ml should be administered intramuscularly at 9 months after the first dose, and annually thereafter.
Side Effects	There are no reports of serious adverse reactions having occurred with this product. Up to 25% of recipients have experienced mild swelling, redness and soreness at the injection site, as well as temporary headache and malaise. Less than one person in 100 has had a fever over 38 degrees C (100.4 degrees F).
Other Available Countermeasures	Supportive care. Use of skin and clothing insect repellents to prevent tick bites. Monitor milk supply; boil pasteurized milk of susceptible animals.