

## ارزیابی روش تزریق عضلانی و داخل جلدی پلاسمید باکتریایی حاوی ژن نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا

عباس جمالی<sup>۱</sup>، فرزانه صباحی<sup>۲\*</sup>، طراوت بامداد<sup>۳</sup>، حمیدرضا هاشمی<sup>۴</sup>، فریدون مهبودی<sup>۵</sup>، معصومه توسی خیری<sup>۶\*\*</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- کارشناس ارشد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۶- استادیار، واحد آنفلوانزا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۱۲/۰۹

دریافت مقاله: ۸۸/۰۹/۲۹

### چکیده

**هدف:** استفاده از واکسن‌های ژنی بر پایه کاربرد پلاسمیدهای باکتریایی به منظور القای ایمنی سلولی بر ضد عوامل بیماری‌زا یکی از رویکردهای نوین به‌شمار می‌رود. ساز و کارهایی که توسط آن سلول‌های ایمنی اختصاصی بر ضد آنتی‌ژن عرضه شده توسط واکسن‌های پلاسمیدی شکل می‌گیرند، هنوز به‌طور کامل شناخته شده نیست. از این‌رو، لازم است تا چند راه تزریق واکسن به‌منظور یافتن بهترین راه ایمن‌سازی در مورد هر آنتی‌ژن منحصر به فرد، ارزیابی شود. در این پژوهش روش تزریق عضلانی ناقل ژنی حاوی نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا با روش تزریق داخل جلدی مقایسه شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، توانایی دو روش مختلف ایمن‌سازی (داخل عضلانی و داخل جلدی) در القای پاسخ سلول‌کشی لنفوسیت‌های T و نیز توانایی این دو روش در پاک‌سازی ویروس آنفلوانزا از ریه موش‌های BALB/c مقایسه شد. به این منظور، موش‌های BALB/c جنس ماده در روزهای ۰، ۱۴ و ۲۸ با پلاسمید بیانی ژن نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا ایمن‌سازی شدند. دو هفته پس از تزریق آخر، میزان پاسخ سلول‌کشی لنفوسیت‌های T به روش لاکتات دهیدروژناز ارزیابی شد. همچنین، موش‌های مورد آزمایش با ویروس آنفلوانزا چالش شدند و عیار ویروس آنفلوانزا در ریه موش‌ها ۴ روز پس از چالش سنجش شد.

**نتایج:** آزمایش‌های صورت گرفته نشان داد که ایمن‌سازی موش‌ها به روش تزریق عضلانی پاسخ سلول‌کشی لنفوسیت‌های T قوی‌تری در مقایسه با روش داخل جلدی القا می‌کند. همچنین موش‌های ایمن شده به روش تزریق عضلانی سطح بالاتری از پاک‌سازی ویروس از ریه را نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت در روش ایمن‌سازی با استفاده از واکسن ژنی نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا منجر به القای متفاوت پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌شود.

**کلیدواژگان:** واکسن ژنی، نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا، لنفوسیت‌های T کشته، تزریق عضلانی، تزریق داخل جلدی

Email: sabahi\_f@modares.ac.ir

\*\*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی پزشکی، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶

Email: mtkheiri@pasteur.ac.ir

\*\*نشانی مکاتبه: تهران، انستیتو پاستور ایران، واحد آنفلوانزا، کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

## ۱- مقدمه

ویروس آنفلوانزا (Influenza virus) از اعضای خانواده ارتومیکسوویریده (Orthomyxoviridae) است که توانایی ایجاد عفونت‌های تنفسی را دارد [۱]. به‌طور رایج این ویروس شامل سه نوع A، B و C است که براساس تفاوت در پروتئین‌های داخلی نظیر نوکلئوپروتئین و ماتریکس طبقه‌بندی هستند [۱، ۲]. این سه نوع ویروس علاوه بر این تفاوت‌های ساختاری، از لحاظ عفونت‌زایی و سازماندهی ژنومی نیز متفاوت هستند [۲]. نوع A این ویروس در جمعیت‌های وسیعی از حیوانات خونگرم یافت شده است در حالی که نوع B و C معمولاً عامل عفونت‌زای انسانی هستند [۳]. سه زیر نوع ویروس آنفلوانزای A شامل H3N2، H2N2، H1N1 و H5N1 به‌همراه آنفلوانزای نوع B از لحاظ عفونت‌زایی در انسان‌ها حایز اهمیت هستند [۲]. عفونت ویروس آنفلوانزا به‌طور معمول در انسان‌ها کشنده نیست اما در نوزادان، سالمندان و افراد دارای بیماری‌های زمینه‌ای و نقص ایمنی حتی می‌تواند کشنده باشد [۳]. در چند سال اخیر زیر نوع H5N1 که ویروس فوق حاد پرندگان است با قابلیت ایجاد مرگ و میر در جمعیت‌های انسانی گزارش شده است [۴].

به دلیل دارا بودن ژنوم RNA، این ویروس هر ساله دچار جهش‌هایی در توالی اسیدآمینه‌ای گلیکوپروتئین‌های غشایی خود می‌شود که در نتیجه باعث پیدایش اپیدمی‌های جدید در سراسر جهان می‌شود [۵]. علاوه بر این، قطعه قطعه بودن ژنوم ویروس آنفلوانزا به‌طور بالقوه می‌تواند منجر به جابه‌جایی قطعات ژنومی بین دو سویه ویروس آنفلوانزا و پیدایش پاندمی‌های بزرگ نظیر آنچه در ۱۹۱۸ اتفاق افتاد، شود [۶، ۷]. از این رو، طراحی یک واکسن دائمی و کارا به یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش روی پژوهشگران علوم نوین پزشکی تبدیل شده است [۸].

نوکلئوپروتئین (Nucleoprotein: NP) ویروس آنفلوانزا، یک پروتئین حفاظت شده به‌شمار می‌رود. NP با اتصال به RNA تک‌ رشته‌ای از تخریب آن در برابر آنزیم‌های نوکلئاز حفاظت می‌کند

[۱]. پژوهش‌های گوناگونی نشان داده است که پاسخ سلول‌کشی لفسوسیت‌های T (Cytotoxic T Lymphocyte: CTL)، نقش بسیار مهمی در پاک‌سازی ویروس آنفلوانزا از ریه ایفا می‌کند [۹، ۱۰]. از این رو با توجه به وجود توالی‌های تحریک کننده پاسخ CTL در NP که بین تمامی زیرنوع‌های آنفلوانزای A مشترک است، ایده طراحی یک واکسن دائمی براساس NP در ذهن پژوهشگران شکل گرفت [۱۱]. با وجود مزیت‌هایی نظیر بی‌خطر بودن مصرف واکسن‌های غیرفعال آنفلوانزا، اما به دلیل ایجاد پاسخ ضعیف در جمعیت‌های در معرض خطر مانند نوزادان و سالمندان و نیز نیاز به تغییرات هر ساله در آن، محققان را بر آن داشته است که به دنبال واکسن کارآمدتری باشند که نیاز به تغییر نداشته باشد و بتواند ایمنی متقاطع قابل قبولی را ایجاد کند [۷، ۸].

برای اولین بار اولمر (Ulmer) و همکاران نشان دادند که DNA واکسن ژنی NP قابلیت القای ایمنی متقاطع بر علیه سویه‌های آنفلوانزا A را دارا است [۱۲]. در سال‌های اخیر با شیوع عفونت H5N1، تحقیق روی استفاده از NP به‌عنوان واکسن با ایجاد ایمنی متقاطع بر ضد آن آغاز شد و اپستین (Epstein) و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که NP در قالب DNA واکسن می‌تواند بر علیه این سویه نیز در دوزهای پایین چالش، حفاظت ایجاد کند [۱۳]. در سال ۲۰۰۷ میلادی تلاش به‌منظور افزایش القای ایمنی ادامه یافت و در دو تحقیق جداگانه افزایش کارایی ایمنی‌زایی واکسن ژنی نوکلئوپروتئینی با استفاده از ایجاد جهش در آن و نیز استفاده از ناقل بیانی اینترفرون آلفا (Interferon alpha) ارزیابی شد [۱۴، ۱۵].

با وجود پژوهش‌های فراوان در این زمینه، هنوز بسیاری از نکات به‌ویژه درباره راه‌کارهای افزایش القای پاسخ ایمنی قوی‌تر توسط این واکسن‌ها، نیاز به بررسی دارد.

تولید ناقل بیانی NP آنفلوانزا و کاربرد آن به‌عنوان واکسن ژنی به دهه پیش بر می‌گردد [۱۲]. مطالعات اولیه نشان داده‌اند که NP توانایی ایجاد پاسخ نسبی ایمنی حفاظتی بر ضد سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا نوع A را دارد [۱۶]؛ از این

در هر ناحیه به حجم ۲۰ میکرولیتر (سری ۳ و سری ۴ به ترتیب) تزریق شد.

## ۲-۴- سنجش فعالیت CTL

دو هفته پس از ایمن‌سازی نهایی، موش‌ها قربانی شدند و طحال آن‌ها در شرایط استریل خارج شد. فعالیت CTL بر پایه آزاد شدن لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase: LDH) ارزیابی شد. طحال هر موش به‌طور جداگانه همگن و گلبول‌های قرمز آن حذف شد. سلول‌های طحالی به‌عنوان سلول‌های عامل (Effectors) تهیه شد. یاخته‌های P815 به‌عنوان سلول‌های هدف با ویروس A/New Caledonia\20\99 H1N1 ضریب عفونی (Multiplicity of infection: MOI) ۵ آلوده شدند. مهم‌ترین ویژگی یاخته‌های P815، عدم بیان Major MHC (Histocpatibility Complex) کلاس ۲ است که در نتیجه آن CTL منحصر به T CD8 می‌شود [۲۲]. پس از یک شب مجاورت سلول‌های هدف با ویروس، تعداد  $2 \times 10^4$  سلول هدف با ۵۰ برابر و ۱۰۰ برابر سلول‌های طحالی مجاور شد. پس از ۶ ساعت گرمخانه‌گذاری، ترشح LDH در محلول رویی براساس دستورالعمل کیت (Takara, Japan) ارزیابی شد.

## ۲-۵- چالش با ویروس

دو هفته پس از ایمن‌سازی نهایی، موش‌ها با ۱۰۰۰ برابر دوز آلوده کننده ۵۰ درصد موش‌ها (MID<sub>50</sub> ۱۰۰۰) از طریق داخل بینی چالش شدند. طی این مدت، موش‌های هر گروه درون قفس‌های مجزا و در زیر هود آزمایشگاهی سطح ۲ ایمنی موجود در حیوان‌خانه انستیتو پاستور در اتاق حیوانات واحد آنفلوآنزا، نگهداری شدند. پس از ۴ روز، از ریه هرکدام از موش‌ها از تیتراژ  $10^{-1}$  تا تیتراژ  $10^{-7}$  رقت تهیه شد. عیار ویروس در ریه موش‌ها با بردن رقت‌های تهیه شده روی کشت سلول‌های MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) ارزیابی شد.

رو تلاش برای افزایش کارایی ایمنی ایجاد شونده توسط NP به‌خصوص پس از گزارش ایجاد عفونت کشنده توسط ویروس آنفلوآنزای H5N1، افزایش چشمگیری یافته است [۱۷، ۱۸]. یکی از زمینه‌های پژوهشی در زمینه افزایش کارایی واکسن‌های ژنی، راه‌های متفاوت تزریق است. راه‌های مختلفی تا به امروز به‌منظور تجویز واکسن‌های ژنی مختلف بررسی شده است که مهم‌ترین آن‌ها شامل داخل جلدی، عضلانی و زیرجلدی است [۱۹، ۲۰]. از این‌رو، در این پژوهش تلاش شده است تا دو راه رایج ایمن‌سازی واکسن‌های ژنی در القای پاسخ CTL توسط ناقل ژنی حاوی ژن NP ویروس آنفلوآنزا در مدل موشی ارزیابی شود.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- ناقل ژنی

در این پژوهش از ناقل بیانی pcDNA3-NP که در مطالعه پیشین طریقه ساخت و نحوه ارزیابی بیان ژن NP ویروس آنفلوآنزای A/New Caledonia\20\99 H1N1 توسط آن توصیف شده است، استفاده شد [۲۱].

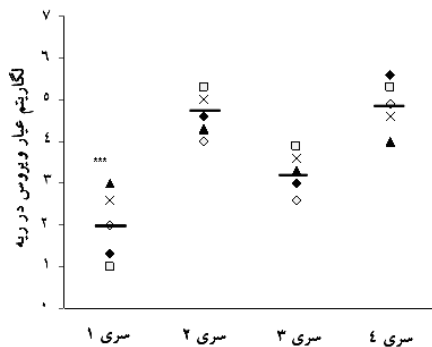
### ۲-۲- حیوان آزمایشگاهی

موش‌های ماده بالغ ۶ تا ۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران فراهم و برطبق راهنمای مراقبت از حیوانات انستیتو پاستور ایران نگهداری شدند.

### ۲-۳- برنامه ایمن‌سازی

تزریق اول در زمان صفر و دو تزریق به فاصله دو هفته انجام گرفت. در هر تزریق ۵۰ میکروگرم از pcDNA3-NP یا pcDNA3 به‌عنوان شاهد منفی به‌صورت عضلانی در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر، ۵۰ میکرولیتر به ماهیچه ران هرکدام از پاها (سری ۱ و سری ۲ به ترتیب) یا داخل جلدی به ۵ ناحیه،

معنی داری نسبت به گروه‌های شاهد منفی منجر به کاهش معنی دار تیترو ویروس در ریه می‌شود، اما روش عضلانی ایمن سازی ناقل ژنی حاوی ژن NP منجر به بیشترین کاهش تیترو ویروس در ریه می‌شود ( $P < 0/05$ ).



نمودار ۲ سنجش عیار ویروس در ریه موش‌ها؛ پس از چالش، سری رقت‌های سوسپانسیون ریه موش‌ها به کشت سلولی انتقال داده شد و عیار ویروس در هر کدام مشخص شد. سری ۱) گروه ایمن شده با pcDNA3-NP به روش عضلانی، سری ۲) گروه ایمن شده با pcDNA3 به روش عضلانی، سری ۳) گروه ایمن شده با pcDNA3-NP به روش داخل جلدی، سری ۴) گروه ایمن شده با pcDNA3 به روش داخل جلدی  
 \*\*\* سری ۱ به‌طور معنی داری بالاتری در پاک‌سازی ویروس از ریه در مقایسه با سری ۳ نشان داد ( $P < 0/05$ ).

## ۴- بحث

در این پژوهش نشان داده شد که تزریق عضلانی ناقل ژنی حاوی ژن NP در مقایسه با روش تزریق عضلانی پاسخ CTL قوی تری را القا می‌کند که منجر به پاک‌سازی بیشتر ویروس آنفلوانزا از ریه موش‌های چالش شده می‌شود.

یافتن روش بهینه تزریق واکسن ژنی یکی دیگر از راه‌کارهای افزایش کارایی این واکسن‌ها به‌شمار می‌رود. هر چند تحقیقات اولیه نشان داده بودند که سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن نقش اصلی را در القای پاسخ‌های ایمنی توسط واکسن‌های پلاسمیدی برعهده دارند [۲۳، ۲۴]، پژوهش‌هایی که در ادامه صورت گرفت، آشکار ساخت که سلول‌هایی نظیر سلول‌های پوستی و عضلانی در محل تزریق نقش مهمی در شکل‌گیری پاسخ‌های ایمنی

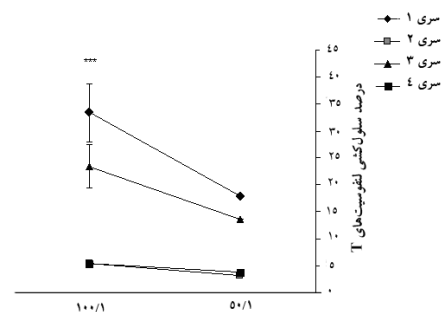
## ۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

پس از جمع‌آوری داده‌های خام، از آزمون آنوای یک طرفه (One-way Anova) و در ادامه از آزمون توکی (Tukey's test) استفاده شد. سطح اطمینان بالای ۹۵ درصد در اختلاف میانگین بین دو گروه به‌عنوان سطح معنی دار تعیین شد.

## ۳- نتایج

### ۳-۱- پاسخ CTL

همان‌گونه که در نمودار ۱ نشان داده شده است، هر چند هر دو نوع روش تزریق ناقل ژنی حاوی ژن NP به‌طور معنی داری نسبت به گروه‌های شاهد منفی پاسخ CTL بالاتری را نشان می‌دهند، اما روش عضلانی ایمن‌سازی ناقل ژنی حاوی ژن NP در مقایسه با گروه ایمن شده با روش داخل جلدی، سطح بالاتری از پاسخ CTL را القا می‌کند ( $P = 0/002$ ).



نمودار ۱ پاسخ CTL؛ سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده به قرار زیر به‌عنوان اثرکننده با دو نسبت ۱۰۰:۱ و ۵۰:۱ با سلول‌های هدف P815 مجاور شد و میزان ترشح LDH در محلول رویی اندازه‌گیری شد. سری ۱) گروه ایمن شده با pcDNA3-NP به روش عضلانی، سری ۲) گروه ایمن شده با pcDNA3 به روش عضلانی، سری ۳) گروه ایمن شده با pcDNA3-NP به روش داخل جلدی، سری ۴) گروه ایمن شده با pcDNA3 به روش داخل جلدی  
 \*\*\* سری ۱ به‌طور معنی داری پاسخ CTL قوی تری در مقایسه با سری ۳ نشان داد ( $P = 0/002$ ).

### ۳-۲- پاک‌سازی ویروس از ریه

همان‌گونه که در نمودار ۲ نشان داده شده است، هر چند هر دو نوع روش تزریق ناقل ژنی حاوی ژن NP به‌طور

می‌شود. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که القای پاسخ CTL بر علیه NP آنفلوانزا، منجر به کاهش تیترو ویروس در ریه موش‌های آلوده شده، می‌شود [۱۶، ۱۸]. بنابراین احتمالاً القای قوی‌تر این پاسخ در روش تزریق عضلانی سبب پاک‌سازی بیشتر ویروس آنفلوانزا از ریه در مقایسه با روش ایمن‌سازی داخل جلدی شده است.

سخن آخر این‌که نتایج این پژوهش نشان داد که تزریق عضلانی ناقل بیانی ژن NP ویروس آنفلوانزا بر پایه روش‌های به‌کار رفته در این پژوهش، منجر به القای پاسخ قوی‌تر CTL می‌شود. در این مطالعه ایمن‌سازی با استفاده از روش رایج استفاده از سرنگ انجام شد، از این رو مطالعات بیشتری در آینده نیاز است که سایر ابزارهای جدید ایمن‌سازی نظیر تفنگ ژنی و روش تاتو پوستی نیز بررسی شود.

## ۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود فرض می‌دانند از همکاران محترم واحد آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران بابت کمک‌های بی‌دریغشان در این مرحله از تحقیق، تقدیر و تشکر نمایند.

توسط این واکسن‌ها ایفا می‌کنند [۲۵، ۲۶]. نشان داده شده است سلول‌های عضلانی که واکسن پلاسمیدی را دریافت کرده‌اند، قادرند آنتی‌ژن موجود در این واکسن‌ها را بیان و به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن ارائه دهند [۲۷].

در این پژوهش نشان داده شد که تزریق عضلانی منجر به القای قوی‌تر پاسخ CTL در مقایسه با روش داخل جلدی می‌شود. پژوهشی جدید در سطح سلول‌ها و نیز در مدل‌های حیوانی نشان داده است که انتقال پلاسمید و بیان آن در سلول‌های عضلانی منجر به افزایش بیان مولکول‌های سیستم اصلی MHC کلاس ۱ بر سطح این رده از سلول‌ها می‌شود که این مولکول‌ها نقش اصلی را در عرضه آنتی‌ژن به CTL برعهده دارند [۲۸]. همچنین نشان داده شده است که بیان پلاسمید درون سلول‌های عضلانی منجر به افزایش بیان مولکول BB-1 (B Lymphoblast Antigen) بر سطح این سلول‌ها می‌شود [۲۹]. مولکول‌های BB-1 سبب القای ترشح سیتوکین‌های کمک‌کننده به تحریک لنفوسیت‌های T نظیر اینترلوکین ۲ (Interleukin 2: IL-2) می‌شود [۳۰]. در این پژوهش نشان داده شد که تزریق عضلانی منجر به کاهش ویروس در ریه موش‌ها در مقایسه با روش داخل جلدی

## ۶- منابع

- [1] Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. Orthomyxoviruses. In: Fields virology, New York: Lippicott Williams & Wilkins 2007; vol 2, 5<sup>th</sup> ed, p: 1691-740.
- [2] Zambon MC. Epidemiology and pathogenesis of influenza. J Antimicrob Chemother 1999; 44 Suppl B: 3-9.
- [3] Monto AS. Epidemiology and virology of influenza illness. Based on a presentation by Arnold S. Monto, MD. Am J Manag Care 2000; 6(5 Suppl): S255-64.
- [4] Subbarao K, Katz J. Avian influenza viruses infecting humans. Cell Mol Life Sci 2000; 57(12): 1770-84.
- [5] Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. Vaccine 2007; 25(39-40): 6852-62.
- [6] Nguyen-Van-Tam JS, Hampson AW. The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. Vaccine 2003; 21(16): 1762-8.
- [7] Treanor J. Influenza vaccine--outmaneuvering antigenic shift and drift. N Engl J Med 2004; 350(3): 218-20.

- [8] Kaiser J. A one-size-fits-all flu vaccine? *Science* 2006; 312(5772): 380–2.
- [9] Hogan RJ, Usherwood EJ, Zhong W, Roberts AA, Dutton RW, Harmsen AG, Woodland DL. Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections. *J Immunol* 2001; 166(3): 1813–22.
- [10] Turner SJ, Cross R, Xie W, Doherty PC. Concurrent naive and memory CD8(+) T cell responses to an influenza A virus. *J Immunol* 2001; 167(5): 2753–8.
- [11] Townsend AR, McMichael AJ, Carter NP, Huddleston JA, Brownlee GG. Cytotoxic T cell recognition of the influenza nucleoprotein and hemagglutinin expressed in transfected mouse L cells. *Cell* 1984; 39(1): 13-25.
- [12] Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Donnelly JJ, Liu MA. Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines. *Vaccine* 1994; 12(16): 1541–4.
- [13] Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993; 259(5102): 1745–9.
- [14] Saha S, Yoshida S, Ohba K, Matsui K, Matsuda T, Takeshita F, Umeda K, Tamura Y, Okuda K, Klinman D, Xin KQ, Okuda K. A fused gene of nucleoprotein (NP) and herpes simplex virus genes (VP22) induces highly protective immunity against different subtypes of influenza virus. *Virology* 2006; 354(1): 48–57.
- [15] Roy S, Kobinger GP, Lin J, Figueredo J, Calcedo R, Kobasa D, Wilson JM. Partial protection against H5N1 influenza in mice with a single dose of a chimpanzee adenovirus vector expressing nucleoprotein. *Vaccine* 2007; 25(39-40): 6845–51.
- [16] Epstein SL, Kong WP, Misplon JA, Lo CY, Tumpey TM, Xu L, Nabel GJ. Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine* 2005; 23(46-47): 5404–10.
- [17] James CM, Abdad MY, Mansfield JP, Jacobsen HK, Vind AR, Stumbles PA, Bartlett EJ. Differential activities of alpha/beta IFN subtypes against influenza virus in vivo and enhancement of specific immune responses in DNA vaccinated mice expressing haemagglutinin and nucleoprotein. *Vaccine* 2007; 25(10): 1856–67.
- [18] Ohba K, Yoshida S, Zahidunnabi Dewan M, Shimura H, Sakamaki N, Takeshita F, Yamamoto N, Okuda K. Mutant influenza A virus nucleoprotein is preferentially localized in the cytoplasm and its immunization in mice shows higher immunogenicity and cross-reactivity. *Vaccine* 2007; 25(21): 4291–300.
- [19] Giese M. DNA-antiviral vaccines: new developments and approaches--a review. *Virus Genes* 1998; 17(3): 211-32.
- [20] Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 617–48.
- [21] Jamali A, Sabahi F, Bamdad T, Hashemi H, Mahboudi F, Kheiri MT. DNA vaccine-encoded nucleoprotein of influenza virus fails

- to induce cellular immune responses in diabetic mice model. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(4): 683-6.
- [22] Epstein SL, Stack A, Mispion JA, Lo CY, Mostowski H, Bennink J, Subbarao K. Vaccination with DNA encoding internal proteins of influenza virus does not require CD8(+) cytotoxic T lymphocytes: either CD4(+) or CD8(+) T cells can promote survival and recovery after challenge. *Int Immunol* 2000; 12(1): 91-101.
- [23] Iwasaki A, Torres CA, Ohashi PS, Robinson HL, Barber BH. The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. *J Immunol* 1997; 159(1): 11-14.
- [24] Casares S, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM, Bona CA. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J Exp Med* 1997; 186(9): 1481-6.
- [25] Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, Liu X, Donnelly JJ, Liu MA. Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med* 1997; 3(6): 362-71.
- [26] Klinman DM, Sechler JM, Conover J, Gu M, Rosenberg AS. Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J Immunol* 1998; 160(5): 2388-92.
- [27] Nagaraju K. Immunological capabilities of skeletal muscle cells. *Acta Physiol Scand* 2001; 171(3): 215-23.
- [28] Shirota H, Petrenko L, Hong C, Klinman DM. Potential of transfected muscle cells to contribute to DNA vaccine immunogenicity. *J Immunol* 2007; 179(1): 329-36.
- [29] Wiendl H, Hohlfeld R, Kieseier BC. Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological micro-environment. *Trends Immunol* 2005; 26(7): 373-80.
- [30] Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Daley J, Gray G, Nadler LM. Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that costimulate T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(23): 11059-63.