Original Article

Application of Archaeosome Nanoparticles as a DNA Vaccine Delivery System and Evaluation of its Effect in a C57BL/6 Tumor Model

Hesam Karimi[1], Hoorieh Soleimanjahi[2*], Asghar Abdoli[3], Masoumeh Shirmohammadi[1]

1- M.Sc. Student, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: soleim_h@modares.ac.ir

Received: 13/Mar/2017, Accepted: 09/May/2017

Abstract

Objective: More than 99% of cervical cancers contain human papillomavirus (HPV), particularly the high-risk HPV type 16 (HPV-16). Among therapeutic HPV vaccines, DNA vaccines have emerged as a potentially promising approach. The main problem with DNA vaccination is the efficient delivery of the genes. A different delivery system has been used to bypass this problem. Archaeosomes have shown high stability during oxidative stress. In this study, we prepared the archaeosome Halobacterium salinarum polar lipid and used it as a delivery system and adjuvants for formulation with the E6/E7/L1 chimeric plasmid as an HPV vaccine candidate.

Methods: The recombinant pIRES2-plasmid that contained an E6/E7/L1 chimeric gene of HPV were purified after extraction. Halobacterium salinarum total polar lipids were prepared according to a method by Bligh and Dyer. The archaeosome-pDNA complex was prepared by the addition of plasmid DNA to an archaeal lipid solution and the mixture kept at room temperature to allow for complex formation. Particle sizes and zeta potential of the samples were measured using dynamic light scattering. We measured the relative tumor volume after administration of TC-1 cells to C57BL/6 mice.

Results: Zeta potential of the anionic archaeosomes was -6.84mV while archaeosome-pDNA complexes were -29 mV. The highly negative zeta potential of archaeosome-pDNA complexes demonstrated excellent loading of the plasmid on the nanoparticle surface and electrostatic stability. The results showed that the archaeosome-containing E6/E7/L1 chimeric gene significantly inhibited the rate of tumor growth in comparison with the control groups.

Conclusion: Archaeosomes are easy and cost-economic to prepare and highly stable. They may hold tremendous promise as vaccine delivery vehicles.

Keywords: DNA vaccines, Archaeosomes, Human papillomavirus (HPV), Cervical cancer

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.4, Pages: 71-85

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

مقاله اصیل

استفاده از نانو ذرات آرکئوزوم به‌عنوان حامل DNA واکسن و بررسی اثر آن در مدل توموری پاپیلوما ویروس در موش C57BL/6

حسام کریمی[1]، حوریه سلیمان جاهی[2*]، اصغر عبدلی[3]، معصومه شیرمحمدی[1]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس شناسی
Email: soleim_h@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۲۲ پذیرش مقاله: ۹۶/۰۲/۱۹

چکیده

هدف: بیش از ۹۹ درصد سرطان گردن رحم واجد ویروس پاپیلومای انسانی پر خطر ۱۶ و ۱۸ است. واکسن‌های DNA از جمله واکسن های نویدبخش هستند که برای رفع مشکل رهایش آن از آرکئوزوم استفاده شد که در شرایط اکسیداتیو پایدار هستند. آرکئوزوم خاصیت ادجوانت ذاتی دارد و برای ارایه واکسن به سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن مهم است. در این مطالعه نانوذرات آرکئوزوم از لیپیدهای قطبی هالوباکتریوم سالیناروم تهیه شد و با پلاسمید کایمریک E6/E7/L1 به‌عنوان کاندید DNA واکسن پاپیلوماویروس فرموله و استفاده شد.

مواد و روش‌ها: DNAی پلاسمیدی pIRES2-E6/E7/L1 در باکتری اشریشیا کولی سویه DH5α تکثیر و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید مگاپرپ استخراج و تخلیص شد. برای تهیه آرکئوزوم، هالوباکتریوم سالیناروم کشت داده شده و مجموعه لیپیدهای آن با استفاده از روش Dyer & Bligh استخراج شد. فرمولاسیون DNAی پلاسمیدی و آرکئوزوم با افزودن پلاسمید و انکوباسیون چند ساعته انجام گرفت. پتانسیل زتا و اندازه نانو ذرات آرکئوزوم با استفاده از دستگاه زتاسایزر تعیین شد. در نهایت با تزریق زیر پوستی سلول‌های TC1 در موش C57BL/6 و ایجاد مدل توموری پاپیلوماویروس، کارآیی واکسن با تغییر اندازه تومور بررسی شد.

نتایج: پتانسیل زتای سطح آرکئوزوم بدون پلاسمید ٦/٨٤- میلی‌ولت و برای آرکئوزوم فرموله‌شده با پلاسمید ۲۹- میلی‌ولت است. تغییر پتانسیل زتای آرکئوزوم پس از فرمولاسیون از مقدار ٦/٨٤- میلی‌ولت به ۲۹- میلی‌ولت نشان‌دهنده جذب موفقیت‌آمیز پلاسمید روی ذرات و افزایش پایداری آن‌ها است. نتایج حاصل از بررسی اندازه‌گیری حجم تومور نشان داد که در گروه‌های واکسینه‌شده حجم تومور در مقایسه با گروه‌های کنترل کمتر است.

نتیجه‌گیری: نانو ذرات آرکئوزوم، به‌عنوان یک سیستم رهایشی مناسب و کارآمد با فرآیند آماده‌سازی آسان و مقرون به صرفه و پایداری زیاد می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب برای تحویل DNA واکسن باشد.

کلید واژگان: DNA واکسن، نانو ذرات آرکئوزوم، پاپیلوما ویروس، سرطان گردن رحم

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵، صفحات: ۷۱-۸۵

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

مقدمه

سرطان گردن رحم (Cervical cancer) بعد از سرطان سینه، دومین سرطان شایع و از عوامل مهم مرگ و میر در زنان سراسر جهان است. سالانه حدود نیم میلیون نفر در سراسر جهان به این سرطان مبتلا می‌شوند که از این تعداد حدود ۸۰ درصد آن در کشورهای در حال توسعه روی می‌دهد. میزان مرگ و میر ناشی از ابتلا به این سرطان سالانه حدود ۲۵۰۰۰۰ نفر در جهان است [۱]. بیش از ۹۹ درصد سرطان‌های گردن رحم واجد عفونت پاپیلوما ویروس انسانی (HPV: Human Papilloma Virus) است [۲].

HPV به شکل نوکلئوکپسیدهایی با تقارن بیست وجهی و قطر ۵۲-۵۵ نانومتر، فاقد پوشش و با ژنومی واجد DNA حلقوی دو رشته‌ای به طول تقریباً ۷-۸ کیلوجفت باز است [۳]. این ویروس‌ها به بافت اپیتلیوم گرایش دارند و از تکثیر و تمایز سلول‌های اپیتلیوم برای تکمیل چرخه همانندسازی خود استفاده می‌کنند [٤]. بیش از ۱۰۰ تیپ مختلف HPV بر اساس تحلیل توالی DNA شناسایی شده‌اند که هر یک بافت‌های اپیتلیوم ویژه‌ای را اغلب در دستگاه تناسلی و پوست آلوده می‌کنند [٥]. HPVها بر طبق ارتباط اپیدمیولوژی آن‌ها با سرطان گردن رحم به انواع کم خطر، با خطر متوسط و پر خطر دسته‌بندی شده‌اند. انواع کم خطر (مانند تیپ‌های ۱۱ و ٦) باعث ایجاد زگیل‌های تناسلی، غده خوش خیم یا تغییرات سلولی خفیف در گردن رحم و پاپیلومای تنفسی می‌شوند [٦]. در حالی‌که انواع پرخطر (مانند تیپ‌های، ١٦، ١٨، ٣١، ٣٣) به‌عنوان سرطان‌زا (Carcinogen) در ایجاد سرطان گردن رحم و سایر سرطان‌های آنوژنیتال (Anogenital cancers) عمل می‌کنند [٧]. در میان انواع پر خطر، HPV16 شایع‌ترین HPV در همه جمعیت‌هاست و مسئول تقریباً ۵۰ درصد از سرطان‌های گردن رحم است [٨، ٩].

بیشترین سن ابتلا به عفونت بین ۱۸-۳۰ سالگی است و بعد از سن ۳۰ سالگی میزان ابتلا به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد. سرطان گردن رحم در زنان بالای ۳۵ سال شایع‌تر است که این مسئله به علت ابتلا به عفونت در سنین جوانی و سیر آرام پیشرفت بیماری است [۱۰]. پاسخ‌های ایمنی هومورال به تنهایی برای از بین بردن عفونت کافی نیست و وجود پاسخ‌های ایمنی سلولی نیز لازم است. در واقع ایمنی هومورال مسئول غیر فعال کردن ذرات HPV است و از انتشار ویروس جلوگیری می‌کند، در حالی‌که برای تخریب سلول‌های آلوده به HPV اغلب به پاسخ‌های ایمنی سلولی نیاز است [۱۱].

مطالعات متعددی برای تولید واکسن‌هایی علیه عفونت HPV به‌ویژه تیپ ١٦ (به‌خاطر نقش مؤثر آن در ایجاد سرطان) با هدف پیشگیری و درمان تاکنون انجام شده و همچنان ادامه دارد.

اگر چه واکسن‌های پیشگیری‌کنندهٔ عرضه‌شده از مزمن شدن عفونت به نحو مؤثری جلوگیری می‌کند، علی‌رغم وجود اپی‌توپ‌های القاکننده پاسخ‌های ایمنی سلولی، تاکنون هیچ شواهدی مبنی بر نقش درمانی آن‌ها در لژیون‌های (Lesion) جنسی ناشی از ویروس‌های پاپیلومای انسانی تایپ ١٦ و ١٨ مطرح نشده است.

امروزه واکسن‌های مبتنی بر DNA یکی از بهترین روش‌ها برای القای پاسخ سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن است [۱۲].

مطالعات نشان داده است که ایمنی‌زایی با DNA حاوی ایمنی‌زاها (Immunogens) می‌تواند در ایجاد پاسخ ایمنی مناسب و طولانی مدت مؤثر باشد به‌خصوص زمانی که با حامل‌های زیستی مثل آرکئوزوم (Archaeosome) عرضه شوند که از این نظر به‌عنوان واکسن‌های کم خطر، مؤثر، پایدار از نظر آنتی‌ژنتیک، مؤثر در ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال، با فرآیند تولید، حمل و نقل و ذخیره‌سازی آسان، مقاوم در برابر گرما و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه بودن مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این واکسن‌ها با استفاده از عوامل متعددی مثل ادجوانت‌ها (Adjuvants)، سایتوکاین‌ها (Cytokines) یا توالی‌های نوکلئوتیدی خاص (محرک لنفوسیت) می‌توان ابراز آنتی‌ژن در بدن را تقویت نمود.

در طراحی واکسن‌های DNA همواره استفاده از واکسن یا

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

ادجوانتی که بیشترین گرایش پاسخ سایتوکاینی را در جهت پاسخ‌های نوع یک (Th1) ایجاد کند، مورد توجه بوده است. برای محافظت از این نوع واکسن‌ها در برابر آنزیم‌های داخل سلولی و همچنین افزایش ایمنی‌زا این واکسن‌ها به تازگی از حامل‌ها و ادجوانت‌های مختلفی استفاده می‌شود.

از حامل‌های مورد استفاده می‌توان به حامل‌های ویروسی و غیرویروسی اشاره کرد. حامل‌های غیرویروسی از ایمنی زیستی خیلی بالایی برخوردار هستند، همچنین از مزایای دیگر این حامل‌ها می‌توان به سهولت آماده‌سازی، هدفمند شدن و پایداری بالا اشاره کرد [۱۳]. از جمله این حامل‌ها می‌توان به پلیمرهای کاتیونیک (Cationic polymers) مثل لیپوزوم (Liposome)، PLGA (Poly Lactic-co-Glycolic Acid)، کیتوزان (Chitosan) و ... اشاره کرد.

توانایی لیپوزوم‌ها در القای پاسخ ایمنی به آنتی‌ژن ادغام شده یا همراهشان، اولین بار توسط گرگوریادیس (Gregoriadis) و آلیسون (Allison) در سال‌های ۱۹۷٤ و ۱۹۷٦ گزارش شد. از آن زمان، لیپوزوم و نانو وزیکول‌های مشتق از لیپوزوم مانند آرکئوزوم‌ها و وایروزوم‌ها (Virosome) به سیستم‌های حامل مهمی تبدیل شدند و علاقه‌مندی برای تولید واکسن‌های مبتنی بر لیپوزوم به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. لیپوزوم‌ها و به‌ویژه آرکئوزوم‌ها و وایروزوم‌ها به‌عنوان سیستم‌های حامل بسیار ارزشمند برای واکسن معرفی شده‌اند که علاوه بر بهبود ثبات آنتی‌ژن و ارایه مناسب آن به سلول‌های دستگاه ایمنی توانایی غلبه بر موانع زیستی، مانند پوست و مخاط و نیز آزادسازی کنترل‌شده و آهسته آنتی‌ژن را دارند. علاوه بر توانایی القای پاسخ ایمنی قوی توسط خاصیت ادجوانتی، واکسن‌های مبتنی بر لیپوزوم ویژگی‌هایی دارد که اساسی برای توسعه فرمولاسیون واکسن مدرن فراهم می‌کند [۱٤].

اصطلاح آرکئوزوم توسط آلکوئرس (Alqueres) و همکاران معرفی شد. فناوری آرکئوزوم نشان‌دهنده یک سیستم تحویل جدید با خاصیت ادجوانتی ذاتی (self-adjuvanting) است که توانایی رساندن آنتی‌ژن به مسیر پردازش با MHC (Major histocompatibility complex) کلاس I و تحریک کافی سیستم ایمنی ذاتی برای القای ایمنی قوی و طولانی مدت در برابر زیر واحدهای همراه آنتی‌ژن را دارد [۱۵].

در واقع آرکئوزوم‌ها نسل جدیدی از لیپوزوم‌ها است که از اتر لیپیدهای قطبی استخراج‌شده از آرکی باکتری‌ها ساخته شده‌است. یکی از ویژگی‌های منحصربه فرد آرکی باکتری‌ها (Archaebacteria) که بقای آن‌ها را محیط‌هایی با شرایط سخت (افراطی) تسهیل می‌کند، ساختار و ترکیب لیپیدی غشای سیتوپلاسمی آن‌هاست. لیپوزوم ساخته شده از اتر لیپیدهای آرکی باکتری‌ها در مقایسه با لیپوزوم‌های معمولی ثبات بالاتری در محیط‌های اسیدی یا قلیایی، نمک‌های صفراوی، درجه حرارت بالا و در برابر فسفولیپاز، اکسیداسیون و هیدرولیز آنزیمی دارد. پیوندهای اتری در آرکئوزوم‌ها با ثبات‌تر از پیوندهای استری در سایر لیپوزوم‌ها است. توانایی آرکی باکتری‌ها برای انطباق ترکیب غشای لیپیدی خود با محیط‌های خشن منجر شده است که لیپیدهای آرکی‌ها برای توسعه سیستم‌های تحویل نانو دارو در نظر گرفته شود که این سیستم‌ها قادرند بر موانع بیوفیزیکی، زیستی و زیست پزشکی که بدن در مقابل ژن، دارو و واکسن درمانی نشان می‌دهد غلبه کند. آرکئوزوم‌ها از انواع مختلف آرکی‌ها تهیه می‌شود که فعالیت ادجوانتی بالایی را نشان می‌دهد و می‌توانند پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را القا کند. مطالعات In-vitro و In vivo نشان می‌دهد که آرکئوزوم‌ها ایمن بوده و می‌تواند کاربردهای بیوتکنولوژیکی مانند تحویل دارو، ژن و واکسن داشته باشد [۱٦].

آرکئوزوم‌ها به‌عنوان سیستم‌های دارورسانی چندین مزایا از جمله زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری، عدم سمیت، پایداری در طول ذخیره‌سازی، قابلیت تحریک هر دو پاسخ Th1 و Th2 با خاطره طولانی و خواص ادجوانتی دارد. همچنین، لیپیدهای مصنوعی ساخته شده از آرکی‌ها قادرند ثبات سیستم‌های دارورسانی را به‌طور قابل توجهی افزایش دهد [۱٦].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

با توجه به این موضوع در بررسی حاضر از آرکئوزوم به‌عنوان حامل زیستی برای انتقال ژن نوترکیب uE6/uE7/uL1 و همچنین به‌عنوان ادجوانت و تحریک‌کنندهٔ ایمنی استفاده شد و اثر ضد توموری آن در مدل موش‌های توموری C57BL/6 بررسی شد. این کلون (uE6/uE7/uL1) یک ناقل بیانی است که و در سال ۲۰۱٤ طی پژوهشی توسط دکتر فاضلی و همکاران در دانشگاه تربیت مدرس برای ساخت نانولیپوپلکس حاوی این پلاسمید به‌عنوان واکسن درمانی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری هالوباکتریوم سالیناروم

تهیه محیط کشت به‌منظور رشد هالوباکتریوم سالیناروم

در ابتدا هالوباکتریوم سالیناروم (*Halobacterium salinarum*) که یک هالوآرکی (*Haloarchaea*) میله‌ای شکل، گرم منفی و هوازی اجباری است و معمولاً در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۲ و غلظت بالای نمک اشباع رشد می‌کند، تهیه می‌شود که در این مطالعه از سویه هالوباکتریوم سالیناروم با IBRC-M No: 10715 خریداری‌شده از مرکز ذخایر ژنتیک استفاده شد. بعد از آماده کردن محیط کشت مایع و تنظیم pH، برای استریل شدن محیط کشت آن را اتوکلاو کرده، سپس باکتری هالوباکتریوم سالیناروم در زیر هود کشت داده شد و به‌منظور هوادهی مناسب، در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۷۰ دور بر دقیقه قرار داده شد و در مدت ۱۰ روز جذب نوری آن را با دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین شد. مواد مورد نیاز برای تهیه محیط کشت هالوباکتریوم سالیناروم در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱ مواد مورد نیاز برای تهیه محیط کشت آرکی باکتری هالوباکتریوم سالیناروم

مواد مورد نیاز	مقدار (گرم/لیتر)
کازآمینو اسیدها (Casamino acids)	۵
$FeSO_4*7H_5O$	۰/۰۲
KCl	۲
$MgSO_4*7H_2O$	۲۰
$MnCl_2*4H_2O$	۰/۰۲٦
NaCl	۲۵۰
Tri-Na-citrate	۳
عصاره مخمر (Yeast extract)	۵

استخراج مجموعه لیپیدهای قطبی از غشا هالوباکتریوم سالیناروم

مجموعه لیپیدهای قطبی (Total polar lipid :TPL) آرکی باکتری هالوباکتریوم سالیناروم با کمی تغییرات در روشBlight & Dyer استخراج شد [۱۷].

روش استخراج TPL

به ازای هر ۳۰ گرم از وزن خشک رسوب سلولی باکتری، ٤۲۰ میلی‌لیتر آب اضافه شده و به‌منظور لیز و از هم پاشیدن کامل باکتری به‌مدت چند ساعت روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. حلال مجزا با نسبت‌های ۰/۸، ۱، ۲ به‌ترتیب از آب، کلروفورم، متانول تهیه شد.

حجم ٤۲۰ میلی‌لیتری از محلول مرحله یک با استفاده از حلال تهیه‌شده در مرحله دوم به حجم ۲ لیتر رسانده و به‌مدت ۱٦ ساعت در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. سپس سوسپانسیون تهیه‌شده در مرحله قبل در دور ٤۰۸۰ دور بر دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٦ درجه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و محلول رویی آن جمع‌آوری شد. در این مرحله با استفاده از قیف جدا کننده (Decanter) و دوباره با اضافه کردن کلروفورم و ایجاد فاز جداسازی که قابل مشاهده باشد فاز کلروفورم زیری خارج و دوباره با اضافه کردن کلروفورم فاز متانول وآب رویی شستشو شد و این کار برای استخراج مجموعه کل لیپید مورد نظرمان پنج بار تکرار شد. فاز کلروفورم جمع‌آوری‌شده در مراحل قبل به‌منظور خشک شدن و تخلیه کلروفورم در دستگاه تبخیرکننده دوار در دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد و سرعت ١٢٠ دور بر دقیقه قرارداده شد و بعد از تبخیر کلروفروم لایه نازکی از لیپید در کف بالن ایجاد شد که این لیپیدها در واقع همان لیپیدهای حل‌شده در کلروفورم هستند. لایه نازک لیپید کف بالن را با مقدار بسیار کمی از متانول شسته و با اضافه کردن ٢٠ حجم استون سرد لیپیدهای قطبی رسوب داده شد. محلول حاوی لیپیدهای حل‌شده در متانول برای چند ساعت در دمای ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری‌شد و سپس رسوب سفیدی که همان لیپیدهای حل‌شده در متانول است توسط سانتریفوژ جمع‌آوری شد. عصاره‌های لیپید حل‌شده در کلروفورم به‌طور نامحدود پایدار است بنابراین رسوب حاصل در مقداری کلروفرم حل‌شد و تا زمان استفاده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته شد.

در زمان استفاده برای سنتز آرکئوزوم، کلروفرم با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی حذف‌شد و پودر باقی‌مانده که همان لیپیدهای حل‌شده در کلروفرم است برای ساخت نانو ذرات آزکئوزوم استفاده شد.

تکثیر و تخلیص DNA پلاسمیدی

تکثیر DNAی پلاسمیدی pIRES2-E6/E7/L1 و ناقل pIRES2 در باکتری اشریشیا کولی سویه DH5α

ناقل مورد تأیید برای ژن نوترکیب، pIRES2-EGFP انتخاب شد. این پلاسمید حاوی IRES (Internal Ribosome Entry Site) تایپ یک و دو مربوط به ویروس انسفالومیوکاردیتیس (ECMV: Encephalomyocarditis virus) است. این ناقل حاوی چندین سایت چندگانهٔ کلونینگ (MCS: Multiple Cloning Site) است که بعضی از آن‌ها بی‌نظیر هستند. IRESها بین MCS و پروتئین افزایش‌یافته فلورسانت سبز (EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein) قرار گرفته است، که به بیان همزمان هر دو ژن (ژنی که در جایگاه MCS کلون شده است) و EGFP از یک mRNA دو سیسترونی (Bicistronic mRNA) در سلول‌های پستانداران کمک می‌کند. این ناقل دارای کدون آغاز (ATG) و origin SV40 در ابتدای MCS و نیز پروموتر CMV (Cytomegalovirus) است. این ناقل حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین (Kanamycin) است [١٨].

ابتدا یک کلونی از باکتری‌هایی که توسط پلاسمیدهای نوترکیب مورد نظر ترانسفورم شده بودند، در ٥ میلی‌لیتر محیط کشت LB (Lysogeny broth) حاوی آنتی‌بیوتیک (کانامایسین ١٠٠ میکروگرم/میلی‌لیتر) کشت و به‌مدت یک شب (Over night) در انکوباتور ٣٧ درجهٔ سانتی‌گراد و حرکت ١٨٠ دور بر دقیقه قرار داده شدند.

استخراج پلاسمید در مقیاس کم

در این پروژه، برای استخراج پلاسمید در مقیاس کم، از کیت تجاری شرکت Geneall (کره) استفاده شد. DNA پلاسمیدی اسخراج شده به‌طور کمی و کیفی با استفاده از دستگاه نانو دراپ و همچنین الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی شد.

استخراج پلاسمید در مقیاس انبوه

برای به‌دست آوردن حجم مورد نیاز از DNAهای پلاسمیدی به‌منظور فرمولاسیون با نانو ذرات آرکئوزوم و تزریق به موش، پلاسمیدها در باکتری اشریشیا کولی سویه DH5α تکثیر و با استفاده از کیت تجاری مگاپرب شرکت Qiagen (امریکا) استخراج و تخلیص شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

فرمولاسیون نانوذرات آرکئوزوم با DNA پلاسمیدی

به‌منظور تشکیل نانو ذرات آرکئوزوم می‌بایست لیپیدهای قطبی استخراج‌شده آب‌دهی شوند و برای فرمولاسیون پلاسمید با نانو ذرات و قرارگیری در سطح لیپوزوم می‌بایست DNA پلاسمیدی پس از تشکیل نانو ذرات به آن‌ها اضافه شود.

به علت منفی بودن بار سطحی ذرات آرکئوزوم و همچنین منفی بودن بار DNA پلاسمیدی، برای اتصال این دو به هم از مولکول‌های کمکی می‌توان استفاده کرد که در اینجا از $CaCl_2$ استفاده شد و با نیروهای الکترواستاتیک ایجادشده پلاسمید به نانو ذرات آرکئوزومی متصل شد [۱۹]. بنابرین ابتدا لیپیدهای قطبی استخراج‌شده آب‌دهی‌شده و به‌مدت چند ساعت در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا لیپوزوم‌ها تشکیل شود. سپس مقدار ۵۰ میکروگرم از DNA پلاسمیدی استخراج‌شده در بافر فسفات آماده‌شده و به یک میلی‌گرم از آرکئوزوم اضافه‌شد و به‌مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. همزمان با آن آب‌دهی و تشکیل ذرات فاقد پلاسمید هم انجام شد.

کاهش اندازه آرکئوزوم‌ها و تولید نانو آرکئوزوم

به‌منظور همگن کردن وزیکول‌ها و کاهش اندازه ذرات آرکئوزوم، محلول‌ها به‌مدت ۵ دقیقه درون دستگاه سونیکیتور (Sonicator) حمام‌دار (Bandelin Sonorex Digitec) قرار داده شد تا وزیکول‌ها همگن و هم اندازه شوند. سپس سانتریفوژ با دور ۲۵۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱ ساعت انجام شد تا پلاسمیدهایی که با آرکئوزوم فرموله نشده‌اند حذف شوند. رسوب حاصل در PBS (Phosphate buffered saline) استریل حل شد.

پتانسیل زتا و پراکندگی اندازه برای نانو ذرات آرکئوزوم توسط زتا سایزر Nano ZS (Malvern Instruments، انگلستان) اندازه‌گیری شد.

کشت سلول‌های TC-1

برای ایجاد تومور در مدل حیوانی، از ردهٔ سلولی TC-1 استفاده شد. این ردهٔ سلولی، سلول‌های اپی تلیال اولیه ریهٔ موش C57BL/6 همراه با ناقل رتروویروسی (Retroviral vector) بیان‌کنندهٔ E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱٦ است که با c-Ha-ras فعال شده است و پروتئین‌های فوق الذکر را بیان می‌کند. این سلول اولین بار توسط تی سی وو (T-C Wu) از دانشگاه جان هاپکینز در سال ۱۹۹٦ طراحی و تولید شد. پس از تزریق زیرپوستی، این سلول‌ها باعث تشکیل تومور جامد در موش‌های C57BL/6 می‌شوند [۲۰].

سلول‌های TC-1 از انستیتو پاستور تهیه شد و در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی با ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین (Streptomycin)، ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Penicillin)، ۳ گرم/لیتر بیکربنات سدیم، اِل-گلوتامین ۲میلی مولار، پیروات ۱ میلی‌مولار، عامل رشد، انسولین، ۰/۱ میلی‌مولار مواد معدنی ضروری محیط کشت و اسیدهای آمینهٔ غیرضروری در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO_2 به‌مدت یک هفته کشت داده شد.

ایجاد مدل توموری در موش C57BL/6

در این پژوهش، از موش‌های C57BL/6 ماده ٦-۵ هفته که از انستیتو پاستور تهیه شده، استفاده شد. این موش‌ها قبل از اینکه مورد تزریق ردهٔ سلولی TC-1 قرار بگیرند، یک هفته در حیوانخانه نگهداری شدند تا از نظر زیستی، با شرایط محیطی هماهنگ شوند، سپس با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تربیت مدرس به شماره شناسه IR.TMU.REC.1394.193 مربوط به کمیته اخلاق پزشکی،

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

تعداد 1×10^{6} سلول TC-1 شمارش و در ۱۰۰ میکرولیتر PBS به‌صورت زیرپوستی به پهلوی راست موش‌ها تلقیح شد.

موش‌ها در ۳ گروه ۷ تایی تقسیم شدند.

گروه‌ها شامل: ۱) PBS ۲) DNA واکسن ۳) DNA واکسن فرموله‌شده با آرکئوزوم.

یک هفته بعد از تزریق سلول TC-1 و اطمینان از ایجاد تومور، واکسیناسیون به روش زیر پوستی، در سه نوبت و با فواصل ۷ روزه، انجام شد. در هر دوز واکسن، DNA پلاسمیدی با غلظت ۵۰ میکروگرم و آرکئوزوم با غلظت یک میلی‌گرم برای هر موش در نظر گرفته شد. حیوانات واکسینه‌شده تحت مراقبت‌های بهداشتی قرار گرفتند و در طول این دوره هر سه روز یک‌بار تغییر اندازه تومور با استفاده از خط‌کش دیجیتالی کولیس اندازه‌گیری شد.

محاسبه حجم تومور

برای محاسبه حجم تومور، قطر کوچک و بزرگ تومور به‌وسیله خط‌کش کولیس به دقت و مطابق با قوانین اخلاقی حفظ حقوق حیوانات، اندازه‌گیری‌شد، سپس حجم هر تومور طبق فرمول کالسون (Carlson) محاسبه می‌شود:

$$V= (a2b)/2$$

در این فرمول a قطر کوچک و b قطر بزرگ است.

نتایج

استخراج لیپیدهای قطبی، تهیه و ارزیابی آرکئوزوم

همان‌طور که گفته شد لیپیدهای قطبی از توده سلولی نوعی آرکی باکتری نمک‌دوست موسوم به هالو باکتریوم سالیناروم با استفاده از روش Blight & Dyer استخراج شد که در این روش استخراج لیپید با ترکیب متانول، کلروفرم و آب و سپس رسوب‌دهی با استن سرد انجام شد و در نهایت از هر ۱۰ گرم توده سلولی باکتری حدود ۵۰ میلی‌گرم لیپید قطبی به‌دست آمد.

نتایج حاصل از تکثیر پلاسمید بیان‌کننده پلی‌ژن E6/E7/L1

پس از مستعد کردن باکتری برای دریافت پلاسمید، ترانسفورماسیون پلاسمید درون باکتری انجام شده و باکتری‌های ترانسفورم‌شده در محیط LB آگار واجد کانامایسین، کشت داده شدند و کلونی‌های حاصل در محیط LB مایع واجد کانامایسین کشت داده‌شد و استخراج پلاسمید در مقیاس کم برای تأیید آن‌ها انجام شد و محصولات حاصل روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورزشده و غلظت آن با دستگاه نانودراپ تعیین شد (شکل ۱).

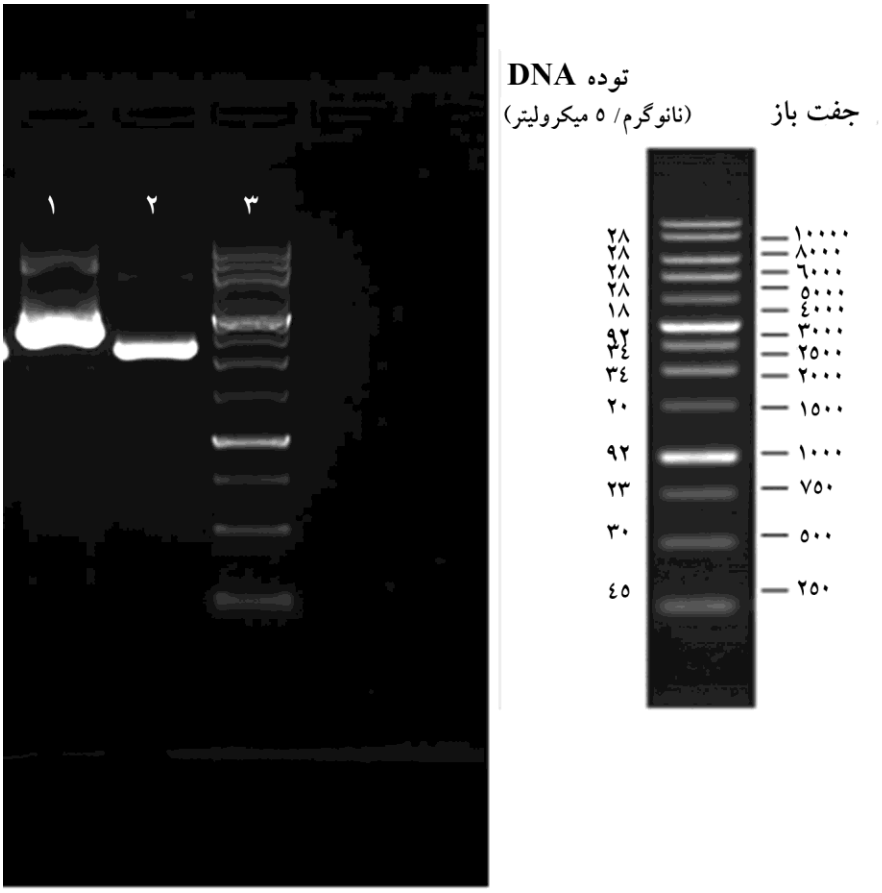
محاسبهٔ اندازه و بار سطحی ترکیبات با استفاده از روش DLS

پتانسیل زتا و پراکندگی اندازه برای نانو ذرات آرکئوزوم اندازه‌گیری شد، برای ذرات آرکئوزوم فاقد پلاسمید Zetasier Average برابر با ۱۸۵ نانومتر با PDI (Polydispersity index) برابر با ۰/۲۵۶ محاسبه شد. همچنین پتانسیل زتای به‌دست آمده برای آن ٦/٨٤- میلی‌ولت بود، در حالی که پتانسیل زتا برای آرکئوزوم حاوی پلاسمید ۲۹- میلی‌ولت با Zetasier Average برابر با ۲۷۹ نانومتر محاسبه شد. نتایج نشان دهنده افزایش در پتانسیل زتا و سایز نانو ذرات بعد از فرمولاسیون پلاسمید با ذرات آرکئوزومی بود.

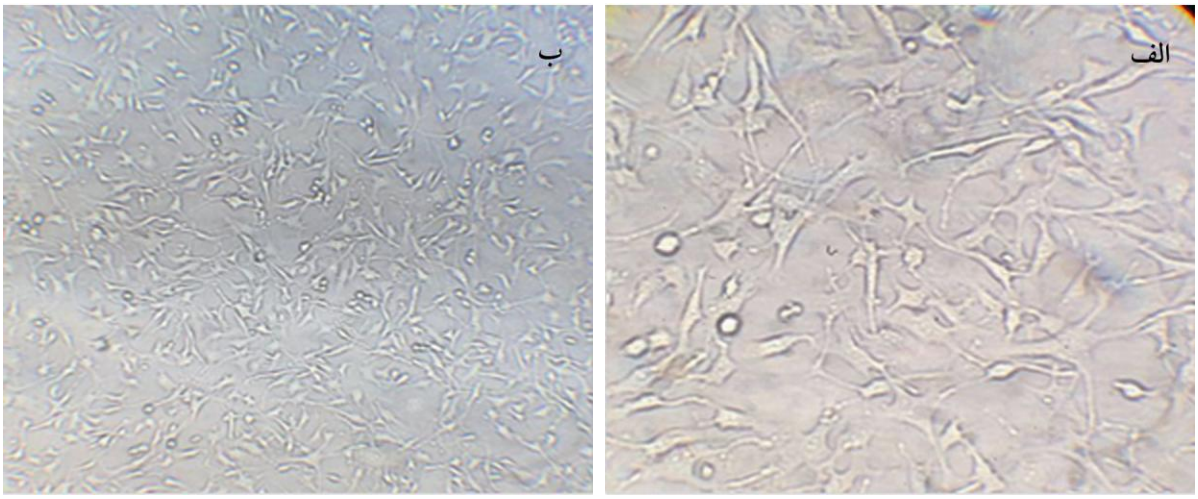
کشت سلول‌های TC-1

سلول‌های TC-1 در محیط DMEM همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پنی سیلین (Penicillin) و ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (Streptomycin) به‌مدت یک هفته کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد رطوبت قرار داده شدند (شکل ۲).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]



شکل ۱ الکتروفورز پلاسمید استخراج‌شده ، ستون ۱)ناقل pIRES2-EGFP، ستون ۲)ناقل pIRES2-EGFP-E6/E7/L1، ستون ۳)نشان‌گر DNA ۱ کیلوبازی



شکل ۲ نمایی از سلول‌های TC-1 (الف با بزرگنمایی ٤۰×، ب با بزرگنمایی۱۰×)

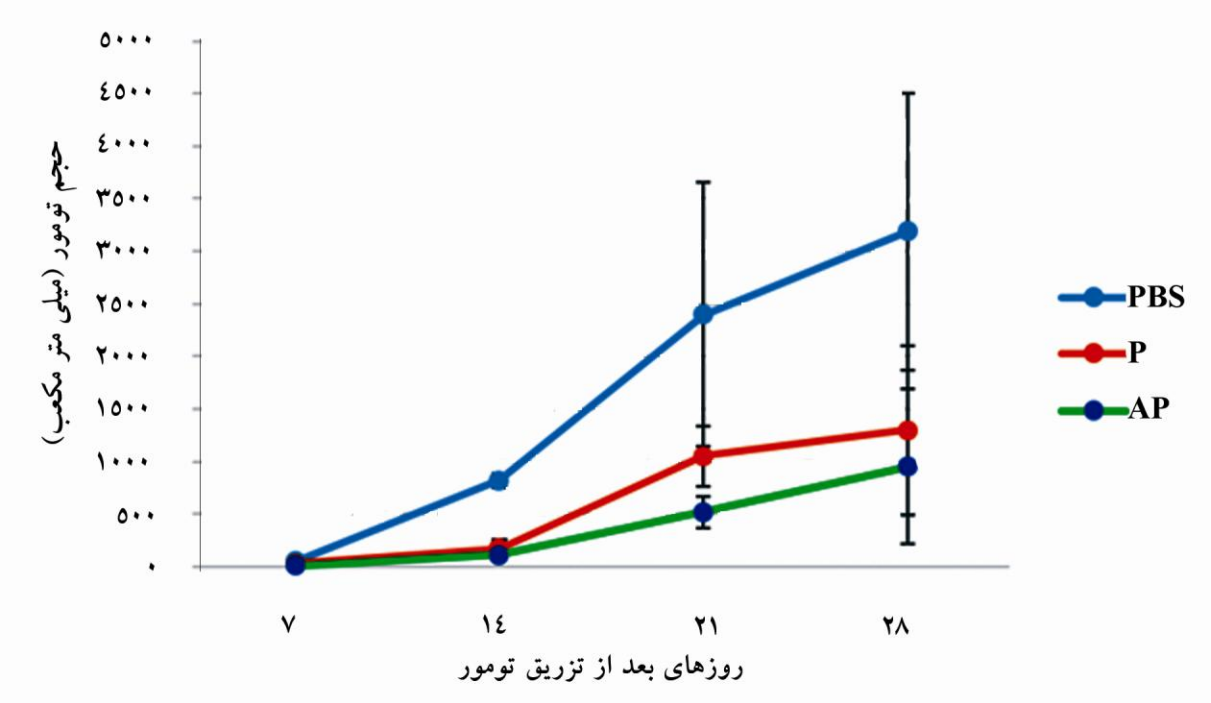
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

ایجاد مدل توموری در موش C57BL/6

برای ایجاد تومـور در مـوش‌هـای C57BL/6 مـاده ۵-۶ هفته‌ای، میـزان $۱×۱۰^{۶}$ سـلول TC-1 در ۱۰۰ میکرولیتـر PBS استریل به‌صورت زیر جلدی به پهلوی راست موش‌ها تزریق شد. تقریباً ده روز پس از تزریق سلول‌ها تومور ایجاد شد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری حجم تومور

تقریباً یک هفته پس از تزریق سلول‌هـای TC-1، تومـور در موش‌هـای C57BL/6 مشـاهده شـد. انـدازه‌گیـری انـدازه تومور بـا اسـتفاده از خـط‌کـش کـولیس در ٤ مقطـع زمـانی مختلف در طول برنامه واکسیناسیون انجام شد. نتایج حاصـل از بررسـی انـدازه‌گیـری حجـم تومـور نشـان داد کـه در گروه‌های واکسینه‌شده حجم تومور در مقایسه بـا گـروه‌هـای کنترل کمتر است. همان‌طورکه در نمـودار مشـاهده مـی‌شـود در دو گروه دریافت‌کننده واکسن در مقایسه بـا گـروه کنتـرل میزان رشد تومور به‌طـور معنـی‌داری کمتـر اسـت ($P<۰/۰۵$) (شکل ۳).



شکل ۳ حجم تومردر موش‌های دریافت‌کننده DNA واکسن و آرکئوزوم فرموله‌شده با DNA واکسن در مقایسه با گروه کنترل PBS؛ PBS: گـروه کنتـرل، P: گـروه DNA vaccine فرموله نشده و AP:گروه DNA Vaccine فرموله‌شده با آرکئوزوم

بحث

از تعداد ۱۰ میلیون سرطانی که هر سـاله در سراسـر دنیـا به‌وجود می‌آیند حدوداً بیش از ۱۵ درصد آن‌ها با عوامل عفونی مرتبط بوده است و عفونت به‌وسیله پاپیلوماویروس تقریبـاً ۳۰ درصد این نوع از سرطان‌ها را تشکیل می‌دهد و شامل ۵ درصد همه سرطان‌ها نیز هست.

به‌طور کلی با وجـود اینکـه امـروزه واکسـن‌هـایی بـرای پاپیلوماویروس‌ها ساخته شده است و در حال عرضه به بـازار هستند، به‌نظر می‌رسد که هنوز واکسن ایده‌آلی که بتوانـد هـم به‌عنوان درمان و هم به‌عنوان پیشگیری‌کننده از آن استفاده شود

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

تهیه نشده است؛ بنابراین لازم است مطالعات همچنان برای بهینه کردن ساختار واکسن‌ها برای تولید ایمنی با پتانسیل بالا ادامه یابد. واکسیناسیون با DNA که پروتئین‌های خاصی را کد می‌کند به‌ویژه زمانی که از طریق سیستم‌های انتقالی بهینه مانند آرکئوزوم عرضه شوند، توانایی بالقوه‌ای نسبت به واکسن‌های زنده نوترکیب و واکسن‌های ساب‌یونیت (Subunit vaccine) عرضه می‌کنند [۲۱].

در مورد پاپیلوماویروس، تحقیقات گسترده‌ای برای طراحی و تولید DNA واکسن‌های پیشگیری‌کننده و درمانی انجام شده که در طراحی آن‌ها از ژن‌های مختلف این ویروس مانند E6، E7 و L1 استفاده شده است.

انکوپروتئین E7 ویروس HPV یک کاندیدای مناسب برای تولید واکسن‌های ضدتوموری است که می‌تواند در موش هم تولید IgG ضد E7 کند و هم فعالیت سلول‌های T سایتوتوکسیک (Cytotoxic T Cells :CTL) را القا نماید. پس می‌توان گفت واکسن حاصل از آن هم خاصیت پیشگیری‌کننده و هم درمانی دارد [۲۲]. در مطالعات جدید از استراتژی تجویز همزمان (Coadministration) آنتی‌ژن E7 با IL-12 (Interleukin 12) یا دیگر سایتوکاین‌ها برای ساخت واکسنی که اثر درمانی بیشتری داشته باشد، استفاده نمودند و مشاهده کردند که E7 باعث القای ایمنی سلولی از نوع CTL می‌شود [۲۳]. اما ایمنی‌زایی ژن E7 ویروس پاپیلومای انسانی فقط در سطح متوسط قادر به تحریک سیستم ایمنی است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ توسط لیو (Liu) و همکاران انجام گرفت نشان داده شد که ایمنی‌زایی واکسن پلی‌نوکلئوتیدی زمانی که E7 به‌صورت بهینه‌شده استفاده می‌شود، افزایش می‌یابد [۲۳] و نشان دادند که در مورد HPV16 E7، نواحی انتهای N و نیز انتهای C در افراد کنترل سالم، ایمنی زا هستند [۲٤].در همان سال مایکل (Michel) و همکارانش در گزارشی نشان دادند که با استفاده از فیوژن پروتئین‌های HPV16 E7 در واکسیناسیون DNA می‌توان ایمنی‌زایی آن را افزایش داد [۲۵].

پروتئین E6 پاپیلوماویروس تقریباً از ۱۵۰ اسیدآمینه تشکیل‌شده که بسیاری از آن‌ها سیستئین است. وزن تقریبی آن ۱۹ کیلو دالتون بوده و یک پروتئین هسته‌ای است، بدین معنی که پس از ساخت در سیتوپلاسم توسط توالی‌های NLS (Nuclear Localization Signal) به درون هسته می‌رود. مطالعات اخیر نشان داده‌است که با وجود نقش در تومورزایی، واکسن‌هایی که بر پایهٔ آنتی‌ژن HPV16 E6 طراحی شده‌اند روش مؤثری برای جلوگیری و کنترل بیان ژن E6 در تومور به‌شمار می‌آیند. در مطالعاتی که لین (Lin) و همکارانش در سال ۲۰۰٦ در دانشگاه جان هاپکینز انجام دادند، نشان دادند که واکسن DNA حاوی ژن انسانی شده E6 دارای توانایی بالاتری برای بیان پروتئین در مدل‌های کشت سلولی بوده و قابلیت القای پاسخ‌های CTL را به‌طور مؤثرتری دارد [۲٦]. میرشهابی و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که پروتئین E6 ویروس پاپیلومای انسانی تایپ ۱٦ که با آنتی‌بادی اختصاصی آن واکنش می‌دهد قادر به القای پاسخ‌های سلول T سلول‌کش در مدل کشت سلولی است [۲۷].

از آنجایی که پروتئین‌های E6 و E7 به‌طور مداوم در همه مراحل سرطان گردن رحم بیان می‌شوند، بنابراین می‌توان از آن‌ها به‌عنوان اهداف ایده‌آلی برای تولید واکسن‌های درمانی و ایجاد شیوه‌های ایمنی درمانی علیه تومورهای پاپیلوما استفاده کرد.

مطالعات نشان داده که واکسن‌های درمانی با تحریک پاسخ‌های ایمنی اندوژن (Endogenous immune response)، می‌تواند برای درمان استفاده شود.

در سال ۲۰۰۲ کدیش (Kadish) و همکارانش پاسخ‌های ایمنی سلولی به پپتیدهای E7 و E6 پاپیلوماویروس تیپ ۱٦ را ارزیابی کردند و نشان دادند که پاسخ‌های ایمنی سلولی به پپتید E7 ارتباط معنی‌داری با بهبود بیماری دارد [۲۸]. در مطالعه‌ای که توسط دکتر فاضلی و همکاران در سال ۲۰۰۹ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد به خوبی خاصیت افزایش ایمنی سلولی ژن L1 و قابلیت آن در کاهش اندازهٔ تومور در مدل موشی مشاهده شد. در سال ۲۰۰٦، اولسالاگر (Oehlschlager) و همکاران با

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

طراحی DNA واکسنی بر پایه ژن E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱٦ و پس از تزریق داخل عضلانی به موش، افزایش سطح ایمنی و پسرفت بافت سرطانی را در مقایسه با موش‌هایی که واکسن را دریافت نکرده بودند مشاهده کردند [۲۹]. مشکات و همکاران در سال ۲۰۰۸، DNA واکسنی برای درمان سرطان گردن رحم طراحی کردند که در آن از ژن E7 تیپ ۱٦ ویروس استفاده شد و با تزریق به موش نشان دادند که این واکسن باعث از بین بردن عفونت و سلول‌های توموری در مقایسه با کنترل منفی دارد [۳۰]. در تحقیقی که در سال ۲۰۰٤ توسط پنگ (Peng) و همکارانش انجام شد از انکوپروتئین E6 به‌عنوان هدفی برای تولید واکسن به‌منظور کنترل بدخیمی‌های ناشی از HPV استفاده شد، در این مطالعه نشان دادند که ناحیهٔ اسیدآمینه ٤۸ تا ۵۷ از ژن E6 محتوی اپی‌توپ‌های ایمنودومینانت (Immunodominant) است و می‌تواند در کنترل عفونت HPV و جراحات مرتبط با این ویروس مفید باشد [۳۱]. در سال ۲۰۰۱، کافمن (Kaufmann) و همکارانش نشان دادند که ذرات شبه ویروسی کایمریک حاوی ژن L1 و E7 پاسخ‌های اختصاصی سلول‌های T محدود به HLA (Human leukocyte antigen) را القا نموده که خود نشان‌گر این واقعیت بود که این ذرات می‌تواند به‌عنوان یک واکسن درمانی در بیماران مبتلا به ضایعات نئوپلازی (Neoplasia) درون اپی‌تلیالی گردن رحم وابسته به HPV تایپ ۱٦ مورد توجه قرار بگیرند [۳۲].

واکسن بیان‌کنندهٔ پروتئین‌های L1 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی تایپ ۱٦ باعث برانگیختن پاسخ‌های آنتی‌بادی و ایمنی سلولی در موش‌ها و خوکچه هندی می‌شود. بلونه (Bellone) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که لنفوسیت‌های CD8+T و CD4+ اختصاصی L1 دارای آثار درمانی در بیماران مبتلا به سرطان دهانهٔ رحم هستند [۲۲].

موفقیت لیپوزوم‌ها به‌عنوان حامل دارو باعث ایجاد فرمولاسیون تجاری تعدادی از لیپوزوم‌ها شد که امروزه در دسترس بوده یا در حال حاضر تحت آزمایش‌های بالینی است. تا به امروز، تقریباً تمام داروهای سنتی ضد سرطان با استفاده از فناوری‌های مختلف در لیپوزوم‌ها کپسوله شده است و بسیاری از آن‌ها در آزمایش‌های بالینی به‌عنوان عوامل تصویربرداری سرطان یا داروهای ضد سرطان استفاده می‌شود. چندین فرمولاسیون لیپوزومی به تازگی وارد مراحل مختلف آزمایش‌های بالینی شده‌است [۳۳].

با وجود مزایا مانند زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری، افزایش نفوذ و کاهش آزادسازی دارو، انتشار طولانی عوامل دارویی فعال، عدم سمیت، محدودیت عمده برای استفاده از لیپوزوم‌های معمولی، کوتاه بودن نیمه عمر، بی ثباتی و هزینه‌های بالای تولید، به‌ویژه در مقیاس‌های بزرگ است [۱٦].

در مطالعه‌ای که توسط فاضلی و همکاران در سال ۲۰۱٤ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد با طراحی و ساخت نانولیپوپلکس (Nano-lipoplex) حاوی پلاسمید کایمریک uE6/uE7/uL1 به‌عنوان واکسن درمانی، از قسمت‌های ایمونوژنیک ژن‌های E6 و E7 برای ساخت DNA واکسن استفاده شده و همچنین از نواحی تحریک‌کنندهٔ L1 برای تحریک سلول‌های T سلول‌کش به‌منظور تولید سازه‌ای مؤثر و ایمنی‌زا با کمترین طول و بالاترین قدرت و به‌صورت بهینه‌شده برای مدل آزمایشگاهی استفاده شد [۳۱].

کریشنان (Krishnan) و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد که آرکئوزوم‌های متشکل از لیپیدهای استخراج شده از آرکی باکتری Methanobrevibacter smithii ادجوانت قوی برای فراخوانی یک پاسخ CD8+ سلول T است. آن‌ها نشان دادند که این سیستم را می‌توان برای فرمولاسیون واکسن‌های سرطان استفاده نمود [۳٤]. رتور (Rethore) و همکاران در سال ۲۰۰۹، آرکئوزوم‌های ساخته شده بر اساس لیپیدهای تترا اتر (Tetraether lipids) مصنوعی را به‌عنوان یک سیستم انتقال جدید ژن برای DNA پلاسمید بررسی کردند و نتایج نشان داد که این آرکئوزوم‌ها می‌توانند برای انتقال ژن در in vitro استفاده شود [۳۵].

مطالعه حاضر نشان داد که آنتی‌ژن بارگذاری شده بر سطح

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

آرکئوزوم پتانسیلی قوی به‌عنوان سیستم‌های تحویل با خاصیت ادجوانتی ذاتی (self-adjuvante) برای استخراج سریع و طولانی مدت ایمنی اختصاصی در برابر بیماری‌زای داخل سلولی دارد. بنابراین آرکئوزوم‌ها به‌دلیل ثبات بالاتر می‌توانند حامل مناسبی برای پروتئین، پپتید و ژن در نظر گرفته شود. واکسن تهیه‌شده با لیپیدهای آرکی باکتری‌ها (آرکئوزوم‌ها) نشان‌دهنده یک جایگزین جدید جالب و امیدوارکننده برای لیپوزوم و وایروزوم‌های (Virosomes) کلاسیک است. نانو ذرات آرکئوزوم، به‌عنوان یک سیستم رهایشی مناسب و کارآمد با فرآیند آماده‌سازی آسان و مقرون به صرفه و پایداری زیاد می‌تواند به‌عنوان یک روش پیشنهادی مناسب برای تحویل DNA واکسن در سطح in vivo به‌کار برده شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه جزئی از پایان نامه کارشناسی ارشد و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

[1] Syrjänen KJ, Syrjänen SM. Papillomavirus infections in human pathology. Wiley, 2000; p: 21-31.

[2] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 1999; 189(1): 12-9.

[3] Doorbar J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. Dis Markers 2007; 23(4): 297-313.

[4] Chow LT, Broker TR. Human papillomavirus transcription. In: The papillomaviruses. Edited by Garcea RL, DiMaio D. Springer, 2007; 109-44.

[5] Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer 2007; 7(1): 11-22.

[6] WHO. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 64, Human papillomaviruses. IARC, Lyon, France, 1995. Available from: http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol64/index.php

[7] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003; 348(6): 518-27.

[8] Patel T, Morrison LK, Rady P, Tyring S. Epidermodysplasia verruciformis and susceptibility to HPV. Dis Markers 2010; 29(3-4): 199-206.

[9] Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. Gynecol Oncol 2008; 110(3 Suppl 2): S4-7.

[10] Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev 2003; 16(1): 1-17.

[11] Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. Gynecol Oncol 2008; 109(2 Suppl): S15-21.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

[12] Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? Nat Rev Genet 2008; 9(10): 776-88.

[13] Garnett MC. Gene-delivery systems using cationic polymers. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1999; 16(2): 147-207.

[14] Schwendener RA. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. Ther Adv Vaccines 2014; 2(6): 159-82.

[15] Singh M. Vaccine Adjuvants and Delivery Systems. John Wiley & Sons; 2007; p: 263-89.

[16] Moghimipour E, Kargar M, Handali S. Archaeosomes as means of nano-drug delivery. Reviews in Medical Microbiology 2014; 25(2): 40-5.

[17] Sündermann A, Eggers LF, Schwudke D. Liquid Extraction: Bligh and Dyer. In: Encyclopedia of Lipidomics. Edited by Wenk MR. Springer Netherlands, 2016; p: 1-4.

[18] Anderson RP, Voziyanova E, Voziyanov Y. Flp and Cre expressed from Flp–2A–Cre and Flp–IRES–Cre transcription units mediate the highest level of dual recombinase-mediated cassette exchange. Nucleic Acids Res 2012; 40(8): e62.

[19] Attar A, Ogan A, Yucel S, Turan K. The potential of archaeosomes as carriers of pDNA into mammalian cells. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2016; 44(2): 710-6.

[20] Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. Cancer Res 1996; 56(1): 21-6.

[21] Cui Z, Han SJ, Huang L. Coating of mannan on LPD particles containing HPV E7 peptide significantly enhances immunity against HPV-positive tumor. Pharm Res 2004; 21(6): 1018-25.

[22] Bellone S, El-Sahwi K, Cocco E, Casagrande F, Cargnelutti M, Palmieri M, Bignotti E, Romani C, Silasi DA, Azodi M, Schwartz PE, Rutherford TJ, Pecorelli S, Santin AD. Human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particle L1-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes (CTLs) are equally effective as E7-specific CD8+ CTLs in killing autologous HPV-16-positive tumor cells in cervical cancer patients: implications for L1 dendritic cell-based therapeutic vaccines. J Virol 2009; 83(13): 6779-89.

[23] Massa S, Franconi R, Brandi R, Muller A, Mett V, Yusibov V, Venuti A. Anti-cancer activity of plant-produced HPV16 E7 vaccine. Vaccine 2007; 25(16): 3018-21.

[24] Liu W, Gao F, Zhao KN, Zhao W, Fernando GJ, Thomas R, Frazer IH. Codon modified human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and anti-tumour activity. Virology 2002; 301(1): 43-52.

[25] Michel N, Osen W, Gissmann L, Schumacher TN, Zentgraf H, Müller M. Enhanced immunogenicity of HPV 16 E7 fusion proteins in DNA vaccination. Virology 2002; 294(1): 47-59.

[26] Lin CT, Tsai YC, He L, Calizo R, Chou HH, Chang TC, Soong YK, Hung CF, Lai CH. A DNA vaccine encoding a codon-optimized

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]

human papillomavirus type 16 E6 gene enhances CTL response and anti-tumor activity. J Biomed Sci 2006; 13(4): 481-8.

[27] Mirshahabi H, Soleimanjahi H, Pourpak Z, Meshkat Z, Hassan ZM. Production of human papilloma virus type 16 e6 oncoprotein as a recombinant protein in eukaryotic cells. Iran J Cancer Prev 2012; 5(1): 16-20.

[28] Kadish AS, Timmins P, Wang Y, Ho GY, Burk RD, Ketz J, He W, Romney SL, Johnson A, Angeletti R, Abadi M; Albert Einstein Cervix Dysplasia Clinical Consortium. Regression of cervical intraepithelial neoplasia and loss of human papillomavirus (HPV) infection is associated with cell-mediated immune responses to an HPV type 16 E7 peptide. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002; 11(5): 483-8.

[29] Ohlschläger P, Pes M, Osen W, Dürst M, Schneider A, Gissmann L, Kaufmann AM. An improved rearranged Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA vaccine candidate (HPV-16 E7SH) induces an E7 wildtype-specific T cell response. Vaccine 2006; 24(15): 2880-93.

[30] Meshkat Z, Soleimanjahi H, Mahmoudi M, Hassan ZM, Mirshahabi H, Meshkat M, Kheirandish M. CTL responses to a DNA vaccine encoding E7 gene of human papillomavirus type 16 from an Iranian isolate. Iran J Immunol 2008; 5(2): 82-91.

[31] Peng S, Hung CF, Trimble C, He L, Yeatermeyer J, Wu TC. Development of a DNA vaccine targeting HPV-16 oncoprotein E6. Cancer Research 2004; 64(7 Supplement): 326.

[32] Kaufmann AM, Nieland J, Schinz M, Nonn M, Gabelsberger J, Meissner H, Müller RT, Jochmus I, Gissmann L, Schneider A, Dürst M. HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles induce specific HLA-restricted T cells in humans after in vitro vaccination. Int J Cancer 2001; 92(2): 285-93.

[33] Minko T, Pakunlu RI, Wang Y, Khandare JJ, Saad M. New generation of liposomal drugs for cancer. Anticancer Agents Med Chem 2006; 6(6): 537-52.

[34] Krishnan L, Sprott GD. Archaesome vaccine adjuvants for cross-priming CD8+ T cell immunity. In: Vaccine adjuvants and delivery systems. Edited by Singh M. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007; p: 263-94

[35] Rethore G, Montier T, Le Gall T, Delepine P, Gammas-Marion S, Lemiegre L, Lehn P, Benvegnu T. Archaesomes based on synthetic tetraether-like lipids as novel versatile gene delivery systems. Chem Commun (Camb) 2007; 20: 2054-6.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-17]