

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

Hesam Karimi¹, Hoorieh Soleimanjahi^{2*}, Asghar Abdoli³, Masoumeh Shirmohammadi¹

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

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

حسام کریمی^۱، حوریه سلیمان جاهی^{۲*}، اصغر عبدلی^۳، معصومه شیرمحمدی^۱

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 هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس شناسی

Email: soleim_h@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۲/۱۹

دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۲۲

چکیده

هدف: بیش از ۹۹ درصد سرطان گردن رحم واجد ویروس پاپیلوما ی انسانی پر خطر ۱۶ و ۱۸ است. واکسن های DNA از جمله واکسن های نویدبخش هستند که برای رفع مشکل رهایش آن از آرکتوزوم استفاده شد که در شرایط اکسیداتیو پایدار هستند. آرکتوزوم خاصیت ادجوانت ذاتی دارد و برای ارایه واکسن به سلول های عرضه کننده آنتی ژن مهم است. در این مطالعه نانو ذرات آرکتوزوم از لیپیدهای قطبی هالوباکتریوم سالیاروم تهیه شد و با پلاسمید کایمریک E6/E7/L1 به عنوان کاندید DNA واکسن پاپیلوما ویروس فرموله و استفاده شد.

مواد و روش ها: DNA پلاسمیدی pIRES2-E6/E7/L1 در باکتری اشریشیا کولی سویه DH5 α تکثیر و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید مگا پرپ استخراج و تخلیص شد. برای تهیه آرکتوزوم، هالوباکتریوم سالیاروم کشت داده شده و مجموعه لیپیدهای آن با استفاده از روش Dyer & Bligh استخراج شد. فرمولاسیون DNA پلاسمیدی و آرکتوزوم با افزودن پلاسمید و انکوباسیون چند ساعته انجام گرفت. پتانسیل زتا و اندازه نانو ذرات آرکتوزوم با استفاده از دستگاه زتاسایزر تعیین شد. در نهایت با تزریق زیر پوستی سلول های TC1 در موش C57BL/6 و ایجاد مدل توموری پاپیلوما ویروس، کارایی واکسن با تغییر اندازه تومور بررسی شد.

نتایج: پتانسیل زتای سطح آرکتوزوم بدون پلاسمید ۶/۸۴- میلی ولت و برای آرکتوزوم فرموله شده با پلاسمید ۲۹- میلی ولت است. تغییر پتانسیل زتای آرکتوزوم پس از فرمولاسیون از مقدار ۶/۸۴- میلی ولت به ۲۹- میلی ولت نشان دهنده جذب موفقیت آمیز پلاسمید روی ذرات و افزایش پایداری آن ها است. نتایج حاصل از بررسی اندازه گیری حجم تومور نشان داد که در گروه های واکسینه شده حجم تومور در مقایسه با گروه های کنترل کمتر است. **نتیجه گیری:** نانو ذرات آرکتوزوم، به عنوان یک سیستم رهایشی مناسب و کارآمد با فرآیند آماده سازی آسان و مقرون به صرفه و پایداری زیاد می تواند به عنوان یک روش مناسب برای تحویل DNA واکسن باشد.

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

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

است که این مسئله به علت ابتلا به عفونت در سنین جوانی و سیر آرام پیشرفت بیماری است [۱۰]. پاسخ‌های ایمنی هم‌مورال به تنهایی برای از بین بردن عفونت کافی نیست و وجود پاسخ‌های ایمنی سلولی نیز لازم است. در واقع ایمنی هم‌مورال مسئول غیر فعال کردن ذرات HPV است و از انتشار ویروس جلوگیری می‌کند، در حالی که برای تخریب سلول‌های آلوده به HPV اغلب به پاسخ‌های ایمنی سلولی نیاز است [۱۱].

مطالعات متعددی برای تولید واکسن‌هایی علیه عفونت HPV به‌ویژه تیپ ۱۶ (به‌خاطر نقش مؤثر آن در ایجاد سرطان) با هدف پیشگیری و درمان تاکنون انجام شده و همچنان ادامه دارد.

اگر چه واکسن‌های پیشگیری‌کننده 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 ۱۶ و ۱۸ 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 کم‌خطر، مؤثر، پایدار از نظر آنتی‌ژنتیک، مؤثر در ایجاد پاسخ‌های ایمنی سلولی و هم‌مورال، 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

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 نوکلئوکسیدهای با تقارن بیست وجهی و قطر ۵۲-۵۵ نانومتر، فاقد پوشش و با ژنومی واجد DNA حلقوی دو رشته‌ای به طول تقریباً ۷-۸ کیلوگفت باز است [۳]. این ویروس‌ها به بافت اپیتلیوم گرایش دارند و از تکثیر و تمایز سلول‌های اپیتلیوم برای تکمیل چرخه همانندسازی خود استفاده می‌کنند [۴]. 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 [۵]. HPVها بر طبق ارتباط اپیدمیولوژی آن‌ها با سرطان گردن رحم به انواع کم‌خطر، با خطر متوسط و پرخطر دسته‌بندی شده‌اند. انواع کم‌خطر (مانند تیپ‌های ۱۱ و ۱۶) باعث ایجاد زگیل‌های تناسلی، غده خوش خیم یا تغییرات سلولی خفیف در گردن رحم و پاپیلوما‌ی تنفسی می‌شوند [۶]. در حالی که انواع پرخطر (مانند تیپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳) به‌عنوان سرطان‌زا (Carcinogen) در ایجاد سرطان گردن رحم و سایر سرطان‌های آنژنیثال (Anogenital cancers) عمل می‌کنند [۷]. در میان انواع پرخطر، HPV16 شایع‌ترین HPV در همه جمعیت‌هاست و مسئول تقریباً ۵۰ درصد از سرطان‌های گردن رحم است [۸، ۹].

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

ادجوانتی که بیشترین گرایش پاسخ سایتوکاینی را در جهت پاسخ های نوع یک (Th1) ایجاد کند، مورد توجه بوده است. برای محافظت از این نوع واکنش ها در برابر آنزیم های داخل سلولی و همچنین افزایش ایمنی از این واکنش ها به تازگی از حامل ها و ادجوانت های مختلفی استفاده می شود.

از حامل های مورد استفاده می توان به حامل های ویروسی و غیرویروسی اشاره کرد. حامل های غیرویروسی از ایمنی زیستی خیلی بالایی برخوردار هستند، همچنین از مزایای دیگر این حامل ها می توان به سهولت آماده سازی، هضم شدن و پایداری بالا اشاره کرد [۱۳]. از جمله این حامل ها می توان به پلیمرهای کاتیونیک (Cationic polymers) مثل لیپوزوم (Liposome)، (Poly Lactic-co-Glycolic Acid) PLGA، کیتوزان (Chitosan) و ... اشاره کرد.

توانایی لیپوزوم ها در القای پاسخ ایمنی به آنتی ژن ادغام شده یا همراهشان، اولین بار توسط گرگوریادیس (Gregoriadis) و آلسون (Allison) در سال های ۱۹۷۴ و ۱۹۷۸ گزارش شد. از آن زمان، لیپوزوم و نانو وزیکول های مشتق از لیپوزوم مانند آرکتوزوم ها و وایروزوم ها (Virosome) به سیستم های حامل مهمی تبدیل شدند و علاقه مندی برای تولید واکنش های مبتنی بر لیپوزوم به طور قابل توجهی افزایش یافت. لیپوزوم ها و به ویژه آرکتوزوم ها و وایروزوم ها به عنوان سیستم های حامل بسیار ارزشمند برای واکنش معرفی شده اند که علاوه بر بهبود ثبات آنتی ژن و ارایه مناسب آن به سلول های دستگاه ایمنی توانایی غلبه بر موانع زیستی، مانند پوست و مخاط و نیز آزادسازی کنترل شده و آهسته آنتی ژن را دارند. علاوه بر توانایی القای پاسخ ایمنی قوی توسط خاصیت ادجوانتی، واکنش های مبتنی بر لیپوزوم ویژگی هایی دارد که اساسی برای توسعه فرمولاسیون واکنش مدرن فراهم می کند [۱۴].

اصطلاح آرکتوزوم توسط آلکوئرس (Alquieres) و همکاران معرفی شد. فناوری آرکتوزوم نشان دهنده یک سیستم تحویل جدید با خاصیت ادجوانتی ذاتی (self-adjuvanting)

است که توانایی رساندن آنتی ژن 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 آنتی ژن را دارد [۱۵].

در واقع آرکتوزوم ها نسل جدیدی از لیپوزوم ها است که از اتر لیپیدهای قطبی استخراج شده از آرکی باکتری ها ساخته شده است. یکی از ویژگی های منحصر به فرد آرکی باکتری ها (Archaeobacteria) که بقای آن ها را محیط هایی با شرایط سخت (افراطی) تسهیل می کند، ساختار و ترکیب لیپیدی غشای سیتوپلاسمی آن ها است. لیپوزوم ساخته شده از اتر لیپیدهای آرکی باکتری ها در مقایسه با لیپوزوم های معمولی ثبات بالاتری در محیط های اسیدی یا قلیایی، نمک های صفرای، درجه حرارت بالا و در برابر فسفولیپاز، اکسیداسیون و هیدرولیز آنزیمی دارد. پیوندهای اتری در آرکتوزوم ها با ثبات تر از پیوندهای استری در سایر لیپوزوم ها است. توانایی آرکی باکتری ها برای انطباق ترکیب غشای لیپیدی خود با محیط های خشن منجر شده است که لیپیدهای آرکی ها برای توسعه سیستم های تحویل نانو دارو در نظر گرفته شود که این سیستم ها قادرند بر موانع بیوفیزیکی، زیستی و زیست پزشکی که بدن در مقابل ژن، دارو و واکنش درمانی نشان می دهد غلبه کند. آرکتوزوم ها از انواع مختلف آرکی ها تهیه می شود که فعالیت ادجوانتی بالایی را نشان می دهد و می توانند پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را القا کنند. مطالعات In-vitro و In-vivo نشان می دهد که آرکتوزوم ها ایمن بوده و می تواند کاربردهای بیوتکنولوژیکی مانند تحویل دارو، ژن و واکنش داشته باشد [۱۶].

آرکتوزوم ها به عنوان سیستم های دارورسانی چندین مزایا از جمله زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری، عدم سمیت، پایداری در طول ذخیره سازی، قابلیت تحریک هر دو پاسخ Th1 و Th2 با خاطره طولانی و خواص ادجوانتی دارد. همچنین، لیپیدهای مصنوعی ساخته شده از آرکی ها قادرند ثبات سیستم های دارورسانی را به طور قابل توجهی افزایش دهد [۱۶].

نانوذرات آرکئوزوم حاوی واکسن‌های DNA

salinarum) که یک هالوآرکی (*Haloarchaea*) میله‌ای شکل، گرم منفی و هوازی اجباری است و معمولاً در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و $\text{pH}=7/2$ و غلظت بالای نمک اشباع رشد می‌کند، تهیه می‌شود که در این مطالعه از سویه هالوباکتریوم سالیناروم با IBRC-M No: 10715 خریداری شده 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 به منظور 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.

با توجه به این موضوع در بررسی حاضر از آرکئوزوم به عنوان حامل زیستی برای انتقال ژن نو ترکیب uE6/uE7/uL1 و همچنین به عنوان ادجوانت و تحریک کننده 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 ۲۰۱۴ طی پژوهشی توسط دکتر فاضلی و همکاران در دانشگاه تربیت مدرس برای ساخت نانولیپوپلکس حاوی این پلاسمید به عنوان واکسن درمانی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری هالوباکتریوم سالیناروم

تهیه محیط کشت به منظور رشد هالوباکتریوم سالیناروم در ابتدا هالوباکتریوم سالیناروم (*Halobacterium*)

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

مواد مورد نیاز	مقدار (گرم/لیتر)
کاز آمینو اسیدها (Casamino acids)	۵
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۲
KCl	۲
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۲۰
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	۰/۰۲۶
NaCl	۲۵۰
Tri-Na-citrate	۳
عصاره مخمر (Yeast extract)	۵

۴۲۰ میلی لیتر آب اضافه شده و به منظور لیز و از هم پاشیدن کامل باکتری به مدت چند ساعت روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. حلال مجزا با نسبت‌های ۰/۸، ۱، ۲ به ترتیب از آب، کلروفرم، متانول تهیه شد.

حجم ۴۲۰ میلی لیتری از محلول مرحله یک با استفاده از حلال تهیه شده در مرحله دوم به حجم ۲ لیتر رسانده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. سپس سوسپانسیون تهیه شده در مرحله قبل در دور ۴۰۸۰ دور بر دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶ درجه

استخراج مجموعه لیپیدهای قطبی از غشا

هالوباکتریوم سالیناروم

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

روش استخراج TPL

به ازای هر ۳۰ گرم از وزن خشک رسوب سلولی باکتری،

سانتی گراد سانتریفوژ شد و محلول رویی آن جمع آوری 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 و آب رویی شستشو شد و این کار برای استخراج مجموعه کل لیپید مورد نظرمان پنج بار تکرار شد. فاز کلروفورم جمع آوری شده در مراحل قبل به منظور خشک شدن و تخلیه کلروفورم در دستگاه تبخیرکننده دوار در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه قرار داده شد و بعد از تبخیر کلروفورم لایه نازکی از لیپید در کف بالن ایجاد شد که این لیپیدها در واقع همان لیپیدهای حل شده در کلروفورم هستند. لایه نازک لیپید کف بالن را با مقدار بسیار کمی از متانول شسته و با اضافه کردن ۲۰ حجم استون سرد لیپیدهای قطبی رسوب داده شد. محلول حاوی لیپیدهای حل شده در متانول برای چند ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد و سپس رسوب سفیدی که همان لیپیدهای حل شده در متانول است توسط سانتریفوژ جمع آوری شد. عصاره های لیپید حل شده در کلروفورم به طور نامحدود پایدار است بنابراین رسوب حاصل در مقداری کلروفورم حل شد و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفته شد.

در زمان استفاده برای سنتز آرکئوزوم، کلروفورم با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی حذف شد و پودر باقی مانده که همان لیپیدهای حل شده در کلروفورم است برای ساخت نانو ذرات آرکئوزوم استفاده شد.

تکثیر و تخلیص DNA پلاسمیدی

تکثیر DNA 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 چندگانه کلونینگ (MCS: Multiple Cloning Site) است که بعضی از آنها بی نظیر هستند. IRES ها بین MCS و پروتئین افزایش یافته 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 سیستمی (Bicistronic mRNA) در سلولهای پستانداران کمک می کند. این ناقل دارای کدون آغاز (ATG) و origin SV40 در ابتدای MCS و نیز پروموتور CMV (Cytomegalovirus) است. این ناقل حاوی ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین (Kanamycin) است [۱۸].

ابتدا یک کلونی از باکتری هایی که توسط پلاسمیدهای نوترکیب مورد نظر ترانسفورم شده بودند، در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB (Lysogeny broth) حاوی آنتی بیوتیک (کانامایسین ۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر) کشت و به مدت یک شب (Over night) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و حرکت ۱۸۰ 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 استخراج شده به طور کمی و کیفی با استفاده از دستگاه نانو دراپ و همچنین الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی شد.

استخراج پلاسمید در مقیاس انبوه

برای به دست آوردن حجم مورد نیاز از DNA های پلاسمیدی به منظور 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.

توسط زتا سائزر (Nano ZS Malvern Instruments) انگلستان) اندازه‌گیری شد.

کشت سلول‌های TC-1

برای ایجاد تومور در مدل حیوانی، از رده سلولی TC-1 استفاده شد. این رده سلولی، سلول‌های اپی تلیال اولیه ریه موش C57BL/6 همراه با ناقل رتروویروسی (Retroviral vector) بیان‌کننده E6 و E7 و ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ 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 ۱۹۹۶ 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 بیکرینات سدیم، ال-گلوتامین ۲ میلی‌مولار، پیرووات ۱ میلی‌مولار، عامل رشد، انسولین، ۰/۱ میلی‌مولار مواد معدنی ضروری محیط کشت و اسیدهای آمینه غیرضروری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO₂ به مدت یک هفته کشت داده شد.

ایجاد مدل توموری در موش C57BL/6

در این پژوهش، از موش‌های C57BL/6 ماده ۶-۵ هفته که از انستیتو پاستور تهیه شده، استفاده شد. این موش‌ها قبل از اینکه مورد تزریق رده 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،

فرمولاسیون نانوذرات آرکتوزوم با DNA

پلاسمیدی

به منظور تشکیل نانو ذرات آرکتوزوم می‌بایست لیپیدهای قطبی استخراج شده 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 آرکتوزوم و همچنین منفی بودن بار DNA پلاسمیدی، برای اتصال این دو به هم از مولکول‌های کمکی می‌توان استفاده کرد که در اینجا از CaCl₂ استفاده شد و با نیروهای الکترواستاتیک ایجاد شده پلاسمید به نانو ذرات آرکتوزومی متصل شد [۱۹]. بنابراین ابتدا لیپیدهای قطبی استخراج شده آب‌دهی شده و به مدت چند ساعت در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا لیپوزوم‌ها تشکیل شود. سپس مقدار ۵۰ میکروگرم از DNA پلاسمیدی استخراج شده در بافر فسفات آماده شده و به یک میلی‌گرم از آرکتوزوم اضافه شد و به مدت ۲۴ 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 آرکتوزوم‌ها و تولید نانو آرکتوزوم

به منظور همگن کردن وزیکول‌ها و کاهش اندازه ذرات آرکتوزوم، محلول‌ها به مدت 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 به مدت ۱ ساعت انجام شد تا پلاسمیدهایی که با آرکتوزوم فرموله نشده‌اند حذف شوند. رسوب حاصل در PBS (Phosphate buffered saline) استریل حل شد. پتانسیل زتا و پراکندگی اندازه برای نانو ذرات آرکتوزوم

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 ترانسفورم شده در محیط LB آگار واجد کانامایسین، کشت داده شدند و کلونی‌های حاصل در محیط LB مایع واجد کانامایسین کشت داده شد و استخراج پلاسمید در مقیاس کم برای تأیید آن‌ها انجام شد و محصولات حاصل روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شده و غلظت آن با دستگاه نانودراپ تعیین شد (شکل ۱).

محاسبه اندازه و بار سطحی ترکیبات با استفاده

از روش DLS

پتانسیل زتا و پراکندگی اندازه برای نانو ذرات آرکتوزوم اندازه‌گیری شد، برای ذرات آرکتوزوم فاقد پلاسمید Zetasier Average برابر با ۱۸۵ نانومتر با PDI (Polydispersity index) برابر با ۰/۲۵۶ محاسبه شد. همچنین پتانسیل زتای به دست آمده برای آن ۶/۸۴- میلی‌ولت بود، در حالی که پتانسیل زتا برای آرکتوزوم حاوی پلاسمید ۲۹- میلی‌ولت با Zetasier Average برابر با ۲۷۹ نانومتر محاسبه شد. نتایج نشان‌دهنده افزایش در پتانسیل زتا و سایز نانو ذرات بعد از فرمولاسیون پلاسمید با ذرات آرکتوزومی 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) به مدت یک هفته کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت قرار داده شدند (شکل ۲).

تعداد ۱×۱۰^۶ سلول TC-1 شمارش و در ۱۰۰ میکرولیتر PBS به صورت 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 فرموله شده با آرکتوزوم.

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 آرکتوزوم با غلظت یک میلی‌گرم برای هر موش در نظر گرفته شد. حیوانات واکسینه شده 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 به وسیله خط‌کش کولیس به دقت و مطابق با قوانین اخلاقی حفظ حقوق حیوانات، اندازه‌گیری شد، سپس حجم هر تومور طبق فرمول کالسون (Carlson) محاسبه می‌شود:

$$V = (a^2b)/2$$

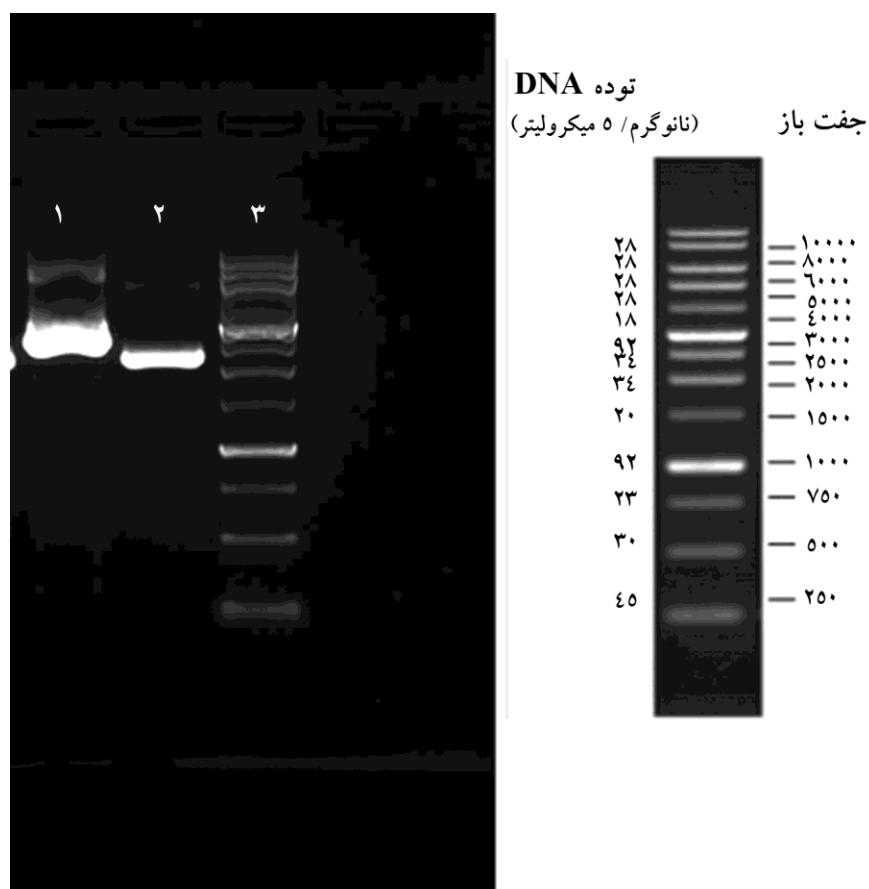
در این فرمول a قطر کوچک و b قطر بزرگ است.

نتایج

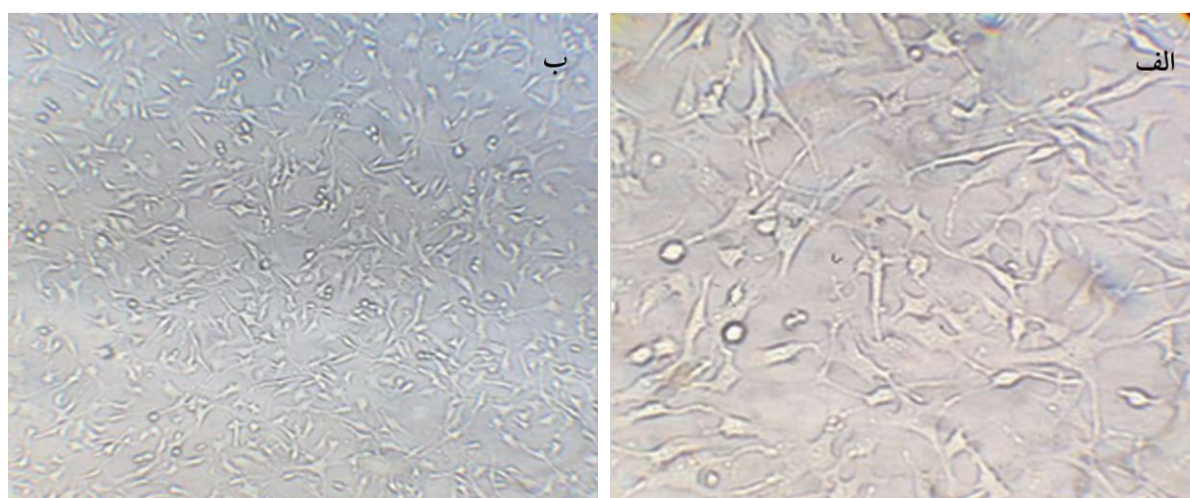
استخراج لیپدهای قطبی، تهیه و ارزیابی آرکتوزوم

همان‌طور که گفته شد لیپدهای 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 به دست آمد.

نانوذرات آرکئوزوم حاوی واکسن‌های DNA



شکل ۱ الکتروفورز پلاسمید استخراج شده، 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 ۴۰x، ب با بزرگنمایی ۱۰x)

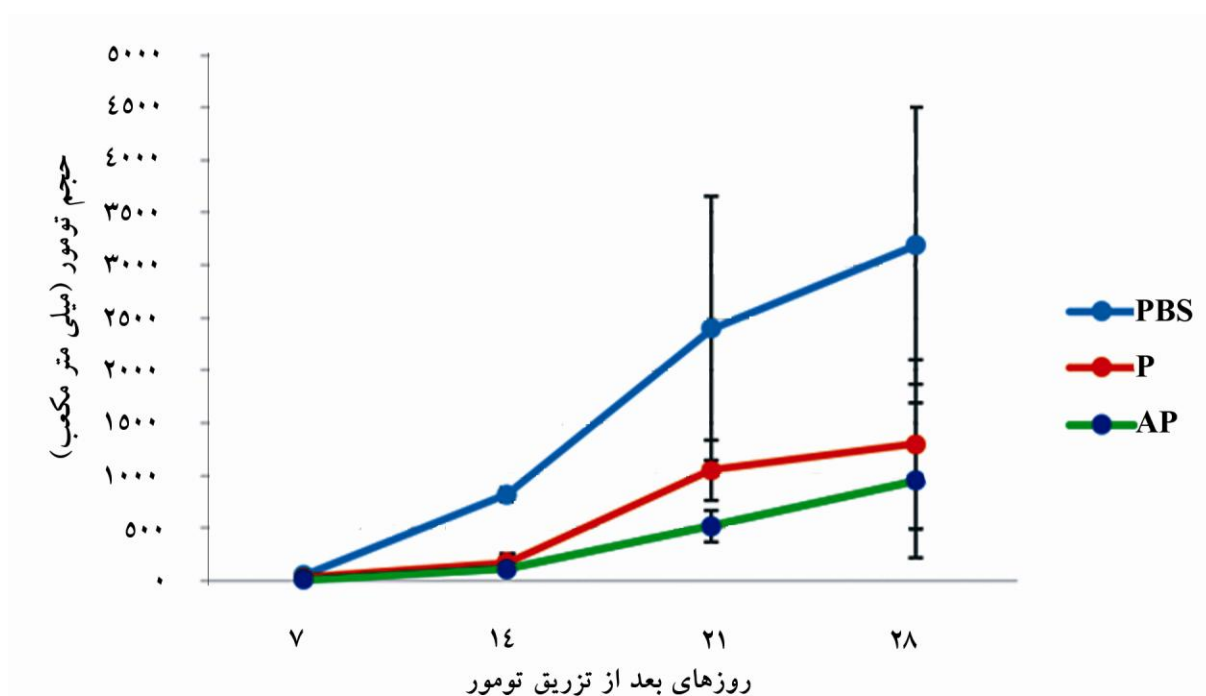
ایجاد مدل توموری در موش C57BL/6

برای ایجاد تومور در موش های C57BL/6 ماده ۶-۵ هفته ای، میزان 1×10^6 سلول TC-1 در ۱۰۰ میکرولیتر PBS استریل به صورت زیر جلدی به پهلوی راست موش ها تزریق شد. تقریباً ده روز پس از تزریق سلول ها تومور ایجاد شد.

نتایج حاصل از اندازه گیری حجم تومور

تقریباً یک هفته پس از تزریق سلول های TC-1، تومور

در موش های C57BL/6 مشاهده شد. اندازه گیری اندازه تومور با استفاده از خط کش کولیس در ۴ مقطع زمانی مختلف در طول برنامه واکسیناسیون انجام شد. نتایج حاصل از بررسی اندازه گیری حجم تومور نشان داد که در گروه های واکسینه شده حجم تومور در مقایسه با گروه های کنترل کمتر است. همان طور که در نمودار مشاهده می شود در دو گروه دریافت کننده واکسن در مقایسه با گروه کنترل میزان رشد تومور به طور معنی داری کمتر است ($P < 0.05$) (شکل ۳).



شکل ۳ حجم تومور در موش های دریافت کننده DNA واکسن و آرکتوزوم فرموله شده با DNA واکسن در مقایسه با گروه کنترل PBS: PBS: گروه کنترل، P: گروه DNA vaccine فرموله نشده و AP: گروه DNA Vaccine فرموله شده با آرکتوزوم

بحث

از تعداد ۱۰ میلیون سرطانی که هر ساله در سراسر دنیا به وجود می آیند حدوداً بیش از ۱۵ درصد آن ها با عوامل عفونی مرتبط بوده است و عفونت به وسیله پاپیلوماویروس تقریباً ۳۰ درصد این نوع از سرطان ها را تشکیل می دهد و شامل ۵ درصد

همه سرطان ها نیز هست.

به طور کلی با وجود اینکه امروزه واکسن هایی برای پاپیلوماویروس ها ساخته شده است و در حال عرضه به بازار هستند، به نظر می رسد که هنوز واکسن ایده آلی که بتواند هم به عنوان درمان و هم به عنوان پیشگیری کننده از آن استفاده شود

نانوذرات آرکتوزوم حاوی واکسن‌های DNA

تشکیل شده 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 پایه آنتی ژن 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 ۲۰۰۶ 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 [۲۶]. میرشهابی و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که پروتئین E6 ویروس پاپیلوما‌ی انسانی تایپ ۱۶ که با آنتی‌بادی اختصاصی آن واکنش می‌دهد قادر به القای پاسخ‌های سلول T سلول‌کشی 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 ۱۶ 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 اندازه تومور در مدل موشی مشاهده شد. در سال ۲۰۰۶، اولسالاگر (Oehlschlager) و همکاران با

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 آرکتوزوم 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 ضد توموری 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) آنتی ژن 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 را هستند [۲۴]. در همان سال مایکل (Michel) و همکارانش در گزارشی نشان دادند که با استفاده از فیوژن پروتئین‌های HPV16 E7 واکسیناسیون DNA می‌توان ایمنی‌زایی آن را افزایش داد [۲۵]. پروتئین E6 پاپیلوما‌ویروس تقریباً از ۱۵۰ اسید آمینه

طراحی DNA واکسنی بر پایه ژن E7 ویروس پاپیلوما ی انسانی تیپ ۱۶ و پس از تزریق داخل عضلانی به موش، افزایش سطح ایمنی و پسرقت بافت سرطانی را در مقایسه با موش‌هایی که واکسن را دریافت نکرده بودند مشاهده کردند [۲۹]. مشکلات و همکاران در سال ۲۰۰۸، DNA واکسنی برای درمان سرطان گردن رحم طراحی کردند که در آن از ژن E7 تیپ ۱۶ 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 ۲۰۰۴ 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 ناحیه اسیدآمین ۴۸ 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 ۱۶ مورد توجه قرار بگیرند [۳۲].

واکسن بیان‌کننده پروتئین‌های L1 و E7 ویروس پاپیلوما ی انسانی تایپ ۱۶ باعث برانگیختن پاسخ‌های آنتی‌بادی و ایمنی سلولی در موش‌ها و خوکچه هندی می‌شود. بلونه (Bellone) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که لئوسیت‌های CD8+ و CD4+ اختصاصی L1 دارای آثار درمانی در بیماران مبتلا به سرطان دهانه 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 سستی 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 [۱۶].

در مطالعه‌ای که توسط فاضلی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد با طراحی و ساخت نانولیپوپلکس (Nano-lipoplex) حاوی پلاسמיד کایمریک uE6/uE7/uL1 به‌عنوان واکسن درمانی، از قسمت‌های ایمونوژنیک ژن‌های E6 و E7 برای ساخت DNA واکسن استفاده شده و همچنین از نواحی تحریک‌کننده L1 برای تحریک سلول‌های T سلول‌کش به‌منظور تولید سازه‌های 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 آرکتوزوم‌های 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 [۳۴]. رتور (Rethore) و همکاران در سال ۲۰۰۹، آرکتوزوم‌های ساخته شده بر اساس لیپیدهای تترا اتر (Tetraether lipids) مصنوعی را به‌عنوان یک سیستم انتقال جدید ژن برای DNA پلاسמיד بررسی کردند و نتایج نشان داد که این آرکتوزوم‌ها می‌توانند برای انتقال ژن در *in vitro* استفاده شود [۳۵].

مطالعه حاضر نشان داد که آنتی‌ژن بارگذاری شده بر سطح

نانوذرات آرکتوزوم حاوی واکسن‌های DNA

با فرآیند آماده‌سازی آسان و مقرون به صرفه و پایداری زیاد می‌تواند به عنوان یک روش پیشنهادی مناسب برای تحویل DNA واکسن در سطح *in vivo* به کار 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.

آرکتوزوم پتانسیلی قوی به عنوان سیستم‌های تحویل با خاصیت ادجوانتی ذاتی (self-adjuvante) برای استخراج سریع و طولانی مدت ایمنی اختصاصی در برابر بیماری‌زای داخل سلولی دارد. بنابراین آرکتوزوم‌ها به دلیل ثبات بالاتر می‌توانند حامل مناسبی برای پروتئین، پپتید و ژن در نظر گرفته شود. واکسن تهیه شده با لیپیدهای آرکی باکتری‌ها (آرکتوزوم‌ها) نشان‌دهنده یک جایگزین جدید جالب و امیدوارکننده برای لیپوزوم و وایروم‌های (Virosomes) کلاسیک است. نانوذرات آرکتوزوم، به عنوان یک سیستم رهایشی مناسب و کارآمد

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.

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

- human papillomavirus type 16 E6 gene enhances CTL response and anti-tumor activity. *J Biomed Sci* 2006; 13(4): 481-8.
- [27] Mirshahabi H, Soleimanzahi 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, Soleimanzahi 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, Benvegna T. Archaesomes based on synthetic tetraether-like lipids as novel versatile gene delivery systems. *Chem Commun (Camb)* 2007; 20: 2054-6.