Journal of Military Medicine
2018, Volume 20, Issue 1
Pages: 14-26

DNA Vaccines and Their Use in Biodefense- A Review Study

Pouria Mohammadi *

M.Sc. in Medical Biotechnology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received: 3 December 2017 **Accepted**: 11 March 2018

Abstract

Vaccines have long been used for a variety of pathogens. Advances in basic immunology and recombinant DNA technology have fundamentally transformed the process of formulating a concept, optimizing antigens, and selecting the most effective delivery approach for vaccines The development of vaccines used in the field of biodefense has increased progress in the production, immunological mechanisms and new vaccination approaches. DNA vaccines have emerged in the last decade as a completely novel strategy for vaccination to combat bioterrorism and biodefense. At first, their ability to induce antigen-specific T cell responses was considered as the main strength. Over time, however, it became clear that DNA vaccines are also effective in eliciting antibody responses. DNA vaccines incorporate a natural or modified gene from a pathogen, which encodes the protective antigen. DNA vaccines can be delivered directly in the form of plasmids. The vaccinated hosts will only generate immune responses against the biodefense antigen expressed by the DNA vaccines. Biodefense vaccines are critically important to protect populations against the emerging pathogens. With the increase of the outbreaks of viral diseases, multiple technologies are being used for the development of preventive countermeasures including DNA vaccines In this review article, we investigated the applications and mechanisms of the delivery of vaccines and the use of DNA vaccines in the field of biodefense.

Keywords: DNA vaccine, Third Generation Vaccine, Biodefense

*Corresponding author: **Pouria Mohammadi**, Email: pouria1987m@yahoo.com

مجله طب نظامی
دوره ۲۰، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۷
صفحات: ۲۶-۱۴

DNA واکسن ها و کاربرد آن در دفاع زیستی- مطالعه مروری

پوریا محمدی*

کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

چکیده

از مدت‌ها پیش واکسن‌ها برای انواع مختلف عوامل بیماریزا مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پیشرفت‌هایی که در ایمونولوژی پایه و تکنولوژی DNA نوترکیب بوجود آمده‌اند، اساسا فرآیند تولید واکسن، بهینه سازی آنتی‌ژن‌ها و انتخاب روش موثر برای تحویل واکسن ها را اصلاح کرده است. یکی از کاربردهای نوین واکسن استفاده از واکسن های DNA برای مقابله با بیوتروریسم و دفاع زیستی است. توسعه واکسن‌های مورد استفاده در زمینه‌ی دفاع زیستی پیشرفت قابل توجهی در حیطه تولید، مکانیسم‌های ایمنولوژیک و رویکردهای جدید واکسیناسیون داشته است. در دهه گذشته واکسن های DNA به عنوان یک استراتژی کاملا جدید برای واکسیناسیون ظهور کرده اند. در ابتدا، توانایی آنها برای ایجاد پاسخ های اختصاصی سلول T درمقابل آنتی ژن به عنوان قدرت اصلی مورد توجه قرار گرفت. با این حال، با گذشت زمان مشخص شد که واکسن های DNA نیز در ایجاد پاسخ های آنتی بادی موثر هستند. واکسن های DNA شامل یک ژن طبیعی یا اصلاح شده از پاتوژن هستند، که آنتی ژن محافظ را کد می کند. واکسن های DNA را می توان مستقیم به صورت پلاسمید تحویل داد. میزبان های واکسینه شده تنها پاسخ های ایمنی را نسبت به آنتی ژن بیان شده توسط واکسن های DNA دفاع زیستی تولید خواهند کرد. واکسن های دفاع بیولوژیک برای محافظت از جمعیت در مقابل پاتوژن های در حال ظهور بسیار مهم هستند. با افزایش شیوع بیماری های ویروسی، تکنولوژی های متعددی از جمله واکسن های DNA برای توسعه اقدامات پیشگیرانه مورد استفاده قرار می گیرند. در این مطالعه مروری، کاربردها، مکانیسم های عمکرد، روش های تحویل واکسن و استفاده از واکسن های DNA در زمینه دفاع زیستی را مورد بررسی قرار گرفته است.

کلیدواژه‌ها: واکسن DNA، واکسن‌های نسل سوم، دفاع زیستی، مطالعه مروری

*نویسنده مسئول: **پوریا محمدی**. پست الکترونیک: pouria1987m@yahoo.com
دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۹/۱۲ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

مقدمه

معرفی DNA واکسن‌ها: DNA واکسن‌ها معمولا از گستره‌های پلاسمید باکتریایی خالص‌سازی شده تهیه می‌شوند. اخیرا، DNA واکسن‌ها نه تنها برای اهداف پروفیلاکتیک بلکه برای مورد هدف قراردادن عوامل مسبب بیماری‌های غیرعفونی همچون سرطان و روماتیسم نیز توسعه یافته‌اند (۱, ۲).

پلاسمید باکتریایی بعنوان وسیله‌ای برای ارائه ژن به کار می‌رود و شامل یک یا چند توالی DNA است که آنتی‌ژنی پروتئینی یا پپتیدهایی بیان می‌کند که قابلیت القای پاسخ ایمنی را ایجاد می‌کنند (۳) و در مجاور یک پروموتر/ افزاینده‌ی یوکاریوتیک قرار دارند و یک توالی نسخه‌بردار/ پلی آدنیله‌شونده برای ارتقا بیان ژن در پذیرنده‌ی واکسن می‌باشند. بعضی از این پلاسمیدها شامل یک ژن مقاومت به آنتی بیوتیک نیز هستند که برای انتخاب در طی پروسه‌های تولید به کار می‌روند. پلاسمید در باکتری تکثیر می شود و سپس خالص‌سازی شده و قبل از اینکه بخواهیم آنرا به انسان یا حیوان تزریق کنیم در یک محلول حل می‌شود (برای مثال محلول نمک/PBS). روش‌های مختلفی برای تزریق واکسن وجود دارد: درون ماهیچه‌ای، زیرجلدی، و تزریق توسط ذرات. علاوه بر این تعدادی مطالعه آزمایشگاهی روی ارائه DNA واکسن از طریق دهان نیز وجود دارد. بعد از تزریق، پلاسمید معمولا توسط یک سلول (میوسیت) جذب می‌شود، و سپس این DNA رونویسی شده و mRNA توسط سلول میزبان به پروتئین ترجمه می‌شود. محصول بیان این ژن یک آنتی‌ژن است که پاسخ ایمنی را تحریک می‌کند و نتیجه‌ی آن ایمنی در مقابل بیماری است (۴). قبل از اینکه هر DNA واکسن بتواند برای درخواست تایید در آژانس‌های قانونی ثبت شود، مراحل زیر باید علاوه بر تست ایمنی و عملکرد آن انجام شود (۵):

- اثبات آزمایشگاهی برای صحت ایده
- طراحی و پایه‌گزاری روند تولید انبوه
- اثبات کیفیت کافی و ایمنی غیربالینی
- تاییدیه آزمایشگاه بالینی
- اثبات ایمنی و کارآیی بالینی
- درخواست مجوز تجاری

برخلاف واکسن‌های قراردادی بر پایه پروتئین، DNA واکسن‌ها براساس پلاسمیدهای باکتریایی هستند که آنتی ژن‌های واکسنی را که از پروموترهای یوکاریوتیک کارآمد مشتق شده‌اند را کد می‌کنند (۶). همانند واکسن‌های پروتئینی، DNA واکسن‌ها می‌توانند از طریق تنوعی از روش‌های مختلف ارائه داده شوند، از جمله درون ماهیچه‌ای، زیرپوستی، موکوسی، یا تحویل از طریق پوست. به هرحال، برخلاف آنتی ژنهای پروتئینی، DNA واکسن برای موثر بودن باید قابلیت ورود به سیتوپلاسم سلول‌های واقع در محل تزریق را علاوه بر القای بیان آنتی ژن در محیط زنده (*invivo*) و بنابراین قابلیت تظاهرآنتی ژن در مولکول‌های سازگاری بافتی اصلی (MHC) و تشخیص سلول T را داشته باشد. DNA واکسن‌ها در تنوعی از مدل‌های حیوانی در ممانعت یا هدفگیری بیماری‌های عفونی، سرطان، خودایمنی یا آلرژی موفقیت آمیز بوده است (۷). DNA واکسن‌ها مزیت‌های زیادی نسبت به واکسن‌های مرسوم دارند و معمولا تنها نیاز به کلونینگ یک مرحله‌ای درون وکتور پلاسمیدی دارند و از اینرو زمان و هزینه تولید کاهش می‌یابد. علاوه براین، بیان *invivo* یک ژن آنتی‌ژنی مشتق از یک پروموتر یوکاریوتیک و تغییرات پس از ترجمه‌ی درونی منجر به ساختار پروتئین اصلی می‌شود که پردازش مناسب و تظاهر ایمنی را تضمین می‌کند. از جنبه‌ی ایمنی، کلونینگ یا سنتز نوکلئیک اسیدها نسبت به تخلیص پروتئین‌ها از پاتوژن‌ها نیاز به استفاده از میکروارگانیسم‌های پاتوژنیک در تولید واکسن را برطرف می‌کند. تکنولوژی DNA نوترکیب تقریبا هر نوعی از دستکاری مولکولی روی DNA پلاسمیدی را موجب می‌شود از جمله جهش *invitro*، که موجب طراحی مجدد سریع آنتی‌ژن‌هایی برای پاتوژن‌هایی از قبیل آنفلونزا که رانش آنتی‌ژنیک فوری را نمایش می‌دهد، می‌شود. DNA پلاسمیدی ایمنی خوبی در انسان‌ها دارد و رایج‌ترین عارضه‌ی جانبی آن التهاب مختصری در محل تزریق است. DNA پلاسمیدی در دمای اتاق پایدار است و نیاز به محیط سرد جهت انتقال ندارد (۸).

DNA واکسن‌ها آنتی‌ژن‌های بیان شده را قادر به تظاهر توسط هر دو کلاس i و ii کمپلکس MHC می‌کند و از اینرو موجب تحریک هردو سلول CD4 T و CD8 می‌شود (۹). تاکنون، چندین واکسن DNA حیوانی جهت استفاده تایید شده اند از جمله در ماهی (ویروس نکروز هماتوپوئیتیک عفونی)، سگ (ملانوما)، خوک (هورمون آزاد کننده‌ی هورمون رشد) و اسب (ویروس West Nile) (۱۰). کاربرد این تکنولوژی بیشتر به دلیل ایمنوژنیسیته تحت بهینه آن هنگامیکه با واکسن‌های مرسوم مقایسه می‌شود، در انسان با تاخیر مواجه شده است. استراتژی های متفاوتی برای افزایش ایمنوژنیسیته DNA واکسن تست شده است از جمله بهبود در طراحی وکتور، بهینه سازی کدون آنتی ژنی، استفاده از طب سنتی و طب مولکولی، الکتروپوریشن، بیان همزمان یاری رسان‌های مولکولی و استراتژی‌های prime-boost (۸).

DNA واکسن اولین بار در اواخر دهه ۱۹۹۰ در ذهن دانشمندان نقش بست، در آن زمان گزارش شده بود که تحویل DNA پلاسمیدی به داخل پوست یا ماهیچه موجب القای پاسخ ایمنی علیه آنتی ژن‌های ویروسی و غیرویروسی می‌شود (۱۱-۱۴). اولین بار Tang و همکاران گزارش کرده بودند که تحویل یک میکروپروجکتیل طلایی پوشیده شده با DNA به درون پوست یک موش می‌تواند پاسخ‌های آنتی بادی علیه آنتی ژن تحویل داده شده را حذف کند (۱۱)، اما اولین بار Wang و همکاران پاسخ‌های ایمنی علیه یک عفونت ویروسی مزمن را نشان دادند (۱۳). بعد از آن‌ها، Liu و همکاران (۹) و Robinson و همکاران (۱۴) هردو بطور

مستقل گزارش کردند که تزریق درون ماهیچه‌ای DNA پلاسمیدی کد شده توسط نوکلئوپروتئین آنفلونزا A موجب پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال علیه آنتی‌ژن‌های ویروس آنفلونزا در موش می‌شود. علاوه براین، Weiner و هم‌دانشگاهیان در دانشگاه پنسیلوانیای آمریکا نشان دادند که DNA پلاسمیدهای حامل آنتی‌ژن‌های HIV باعث القای پاسخ ایمنی شده که ایمنوژنیسیتی آغاز شده توسط ویروس‌های زنده‌ی ضعیف شده را تقلید می‌کنند، و هردو پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را ایجاد می‌کند. سادگی و ظرافت DNA واکسن ها که موجب سفارش آسان از طریق استفاده از زیست شناسی مولکولی و مهندسی ژنتیک برای مهار قدرت سیستم ایمنی شده، هیجان زیادی را ایجاد کرده است. این یافته ها پتانسیل DNA را به عنوان یک پلتفرم ایمن سازی معرفی می کند. از آن به بعد، بررسی اثرات این رویکرد در تولید هر دو پاسخ ایمنی سلولی و هومورال علیه بسیاری از عفونت های مزمن ویروسی به تمرکز بسیاری از آزمایشگاه ها تبدیل شده است (۱۵).

DNA واکسیناسیون به عنوان یک استراتژی ایده آل درمانی با توجه به مزایای متعدد بر روی پلتفرم های رقابتی پیشنهاد شده است. به عنوان مثال، DNA واکسن ها غیر زنده و بدون تکثیر هستند و در نتیجه بر خلاف واکسن های زنده قادر به تبدیل شدن به نوع بیماریزا نیستند. علاوه بر این، DNA واکسن ها بسیار قابل تنظیم هستند و از این رو، آنتی‌ژن‌های چندگانه را می توان در یک پلاسمید DNA منفرد رمزگذاری کرد. این امر اجازه می دهد تا در پاسخ ایمنی میزبان، وسعت بسیار بیشتر و حفاظت بهتر صورت گیرد، زیرا اپیتوپ های مختلف در یک پاتوژن انواع مختلفی از پاسخ های ایمنی را به ارمغان می آورد. علاوه بر این، بهینه سازی وکتورهای واکسن و آنتی‌ژن‌های کد شده مانند بهینه سازی RNA / کدون و آنتی‌ژن قراردادی نیز بیان و واکنش متقابل سلولی/ هومورال را افزایش داده است. افرادی که واکسن دی ان ای دریافت می کنند، بعید به نظر می رسد که ایمنی وکتور آنتی پلاسمیدی را در برداشته باشند، همانطور که در وکتورهای آدنوویروسی دیده می شود. به همین علت واکسیناسیون درمانی DNA می تواند بدون ایجاد پاسخ ایمنی علیه پلاسمید DNA بارها و بارها انجام شود. در نهایت، DNA واکسن ها ساده و ارزان برای ساختن هستند، و به راحتی می توانند در مقادیر زیادی تولید شوند، پایدارتر از واکسن های معمولی هستند و می توانند به راحتی ذخیره و حمل شوند. این مزایا ممکن است به ارائه موفقیت آمیز و اداره واکسن های درمانی برای افراد آلوده در کشورهای در حال توسعه کمک کند (۱۰, ۱۶, ۱۷).

با ارائه DNA از راه های مختلف، DNA واکسن ها می توانند یک نوع خاص از پاسخ ایمنی- سلولی در مقابل هومورال تولید کنند. به عنوان مثال، تزریق سوزنی DNA یک پاسخ غالب Th1 را به وجود می آورد در حالی که تزریق بیولیستیک یک پلاسمید مشابه به طور عمده پاسخ Th2یا Th1/Th2 متعادل را بیان می کند (۱۸-۲۰). McCluskie و همکارانش نشان دادند که نوع پاسخ آنتی بادی (IgG، IgG1، IgG2a)، سطوح واکنش های آنتی بادی و فعالیت T سلول های سیتوتوکسی (CTL) بسیار به نوع مداخله در هم موش و هم پریمات های غیر انسانی (NHP) و همچنین برنامه ایمن سازی در NHPها بستگی دارد(۲۱). ایمنی اینترناسال در مقابل عضلانی با DNA واکسن - لیپید A مونوفسفریل در برابر ویروس HIV نوع ۱ پاسخ آنتی بادی موکوسی و ایمنی سیستمیک به واسطه سلول را در موش ها افزایش می‌دهد. با این حال، واکسن عضلانی برای حذف پاسخ های آنتی بادی بیشتر سودمند بوده است. سهولت دستکاری DNA واکسن ها اجازه می دهد تا محققان نوع واکنش ایمنی علیه عفونت ویروسی خاص را انتخاب کنند (۲۲).

موفقیت DNA واکسن ها در مطالعات پیشین به سرعت به آزمایشات بالینی منجر شد و ایده استفاده از DNA برای ایمن سازی مردم بلافاصله به طور گسترده به رسمیت شناخته شد. اولین آزمایش واکسن DNA در انسان تقریبا ۲۰ سال پیش انجام شد. اهداف مطالعات مختلف ارزیابی و نشان دادن امن بودن، تحمل پذیری و پتانسیل ایمنی DNA واکسن ها است. در آزمایش بالینی فاز اول، یک واکسن مبتنی بر DNA برای عفونت HIV-1 برای هر دو کاربرد درمانی و پیشگیری مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۳). به زودی آزمایش های دیگری از DNA واکسن انجام خواهد شد، از جمله آزمایشاتی که واکسن های مبتنی بر DNA را بر علیه سایرآنتی ژن های HIV، HBV و مالاریا آزمایش کردند (۲۴-۲۶). این مطالعات مقدماتی نشان داد که DNA واکسن ها در انسان قابل تحمل هستند و می توانند موجب افزایش تکثیر سلولی و فعالیت CTLها شوند، هرچند پاسخ های ایمنی ناشی از اطلاعات پیش از موعد ضعیف‌تر از حد انتظار است. در حالی که واکسن های DNA نسل اول نتوانستند در انسان‌ها سطح ایمنی ناشی از ایمنی مختص به واکسن نشان دهند، تحقیقات جامع ادامه یافته است تا تغییرات جدید و پیشرفت های تکنولوژی را برای افزایش کارایی DNA انجام دهد (۲۷-۲۹).

تا به امروز، تعداد زیادی از روشها برای بهبود یا تقویت ایمنی‌زایی ناشی از DNA واکسن ها انجام شده است. این تلاش ها عبارتند از: بهینه سازی وکتورهای واکسن (به عنوان مثال، بهینه سازی RNA / کدون) و آنتی ژنهای کدشده توسط پلاسمید ها (به عنوان مثال توالی های مورد توافق) برای افزایش بیان آنتی‌ژن و واکنش متقابل سلولی/هومورال وارد کردن امدادهای مولکولی برای تقویت، مدولاسیون و برهم خوردن پاسخ ایمنی؛ و الکتروپوریشن (EP) در شرایط زنده که یک روش تحویل امیدوار کننده است که بیان و ارائه آنتی ژن‌های بیان شونده توسط وکتورهای DNA را بهبود می‌بخشد. در نهایت، پروتکل جدید ایمن سازی اولیه هترولوگ به طور قابل توجهی موجب افزایش پتانسیل ایمنی

واکسیناسیون DNA می‌شود و در نتیجه باعث ایجاد هیجان و علاقه زیادی به پلت‌فرم‌های DNA برای بررسی روش های درمانی می شود. اگرچه ما درک کاملی از نحوه کارکرد DNA واکسن ها به طور کامل نداریم، اما مطالعات اخیر در این زمینه حقایقی را روشن ساخته است (۱۰, ۲۹, ۳۰).

دفاع زیستی (biodefence) و ارتباط آن با DNA واکسن‌ها

ما به طور سنتی واژه Biodefense را با برنامه های نظامی مرتبط می کنیم. با این حال، از اکتبر ۲۰۰۱ هنگامی که اسپورهای سیاه زخم از طریق سرویس پستی ایالات متحده در پاکت نامه ها ارسال می شد، درک ما در مورد دفاع زیستی، به میزان قابل توجهی تغییر کرده است. در حال حاضر، دفاع زیستی به عنوان فرآیندی حفاظتی از جمعیت غیرنظامی و نظامی دیده می شود. مشخص شده است که بسیاری از میکروارگانیسم‌های بسیار پاتوژن می توانند به عنوان عامل اصلی جنگ‌های زیستی یا تهدیدات بیماری های به طور طبیعی در حال ظهور در نظر گرفته شوند. علاوه بر این، بیوتروریسم را از نقاط مختلفی از جمله تهدیدات بهداشت عمومی، تهدیدات دامپزشکی و تهدیدات کشاورزی در نظر می گیریم. که در مجموع، می توان آنها را "تهدیدات زیستی" نامید. زمینه دفاع زیستی نشان دهنده یک چالش منحصر به فرد برای توسعه واکسن است؛ چرا که مدل های اقتصادی سنتی برای توسعه واکسن بر اساس جمعیت های بزرگ است که واکسن را برای محافظت در برابر بیماری های عفونی مشترک فراهم می کنند تا یک داروی واکسن بتواند سودمند باشد. وضعیت دفاع زیستی بسیار متفاوت است، در حالی که هدف ذخیره واکسن ها به امید اینکه هرگز استفاده نشود، می‌باشد. بازارهای نسبتا کوچک، همراه با مشکلات کار با بسیاری از این عوامل که بسیاری از آنها نیاز به امنیت زیستی آلودگی‌های سطح ۳ یا ۴ را دارند، به این معنی است که در حال حاضر هیچ واکسنی برای استفاده عمومی در ایالات متحده و اکثر کشورهای دیگر برای تقریبا تمام عوامل تهدیدات زیستی وجود ندارد. موانع عمده ای برای توسعه واکسن های دفاع زیستی وجود دارد. علاوه بر مسائل مرسوم شناسایی ایمونوژن‌های محافظ و پلت‌فرم‌هایی برای ارائه واکسن، مشکلات زیادی در انجام مطالعات اثربخشی وجود دارد، زیرا بسیاری از بیماری‌ها نادر هستند، به صورت پراکنده رخ می دهند یا طبیعی نیستند. بر این اساس تاکید بر مدل‌های حیوانی مناسب برای نشان دادن اثربخشی در حمایت از صدور مجوز است. با این حال، تا این زمان، هیچ واکسنی تنها بر اساس آزمایشات اثربخش حیوانی تأیید نشده است. با این وجود، مقدار قابل ملاحظه‌ای از داده‌ها در حال تکمیل شدن است که اساس مولکولی بیماری را توصیف می‌کند که پایه محکمی برای ادامه توسعه محصول را فراهم می‌کند (۳۱).

با ظهور قرن بیست و یکم، تجربه ما در زیست شناسی مولکولی بطور بالقوه افزایش یافته است. با افزایش بهای توالی یابی با بازده بالا، مفاهیمی همانند واکسن شناسی معکوس- با استفاده از توالی های ژنوم پاتوژن برای تولید پپتیدها و اسیدهای نوکلئیک برای آزمایش واکسن، بیشتر شده است. همانطور که درک ما از اساس مولکولی پاتوژنزیس همچنان رشد می کند، همراهی با تعداد زیادی از توالی های ژنومی برای پاتوژن های مختلف در دسترس شده است و ابزار های جدید بیوانفورماتیک تجزیه و تحلیل آنها را سهولت می‌بخشد، ما در حال حرکت به سمت موقعیتی هستیم که در آن واکسن ها می توانند بطور منطقی براساس دانش مولکولی ما طراحی شوند. که این شامل انتخاب یک ایمونوژن بهینه و سیستم تحویل مطلوب برای به حداکثر رساندن پاسخ ایمنی محافظ میزبان به جای روش های تجربی است که برای بسیاری ازموارد در قرن بیستم مورد استفاده قرار گرفت. نسل های باقی مانده از مجموعه داده هایی با کارایی بالا که ویژگی های دفاع زیستی بسیار مهم و پاتوژن های بهداشت عمومی را تشخیص می دهند و پاسخ های میزبان آنها در دوران پساژنومیک، نیازمند تکنیک های بیوانفورماتیک جدید است. این روش های محاسباتی به درک کامل‌تر عفونت و پاتوژنز منجر می شود و به طراحی واکسن های معقول و منطقی بسیار کمک می کند (۳۱-۳۳).

علاوه بر بلایای طبیعی و بیماری های عفونی جدید که به طور طبیعی اتفاق می افتد، هیچ چیز به طور بالقوه سلامت و ثبات در کشورها و سیستم های بهداشتی را تهدید نمی کند، به همان اندازه هم ویرانگری و ناشناختگی بیوتروریسم را تهدید می کند. به غیر از تلاش در راه حل های سیاسی و تلاش های موقت، تنها آنتی بیوتیک ها و واکسن ها ابزارهای ممکن برای حفاظت را ارائه می دهند. چون این واکسن ها سریع ترین و قطعی ترین راه حل های پیشگیرانه را ارائه می دهند، پیشنهاد شدند. با این حال، محدود کردن توسعه و استفاده از واکسن، ملاحظات اجتماعی، سیاسی، اخلاقی و اقتصادی دارد. در این مطالعه، بیوتروریسم به عنوان استفاده عمدی از میکروارگانیسم های طبیعی یا زیستی مهندسی شده به منظور ایجاد صدمه به مردم، حیوانات و گیاهان تعریف می شود (۳۴).

واکسن های دفاع زیستی برای مقابله با گروه های مختلف پاتوژن ایجاد شده است. این واکسن ها برای برخی از این پاتوژن ها از مدت ها پیش ساخته شده اند اما با چالش های جدیدی روبه رو هستند که فراتر از تکنولوژی های قدیمی تولیدی می‌باشند. واکسن های جدیدی که باید در برابر سایر بیماری ها ایجاد شوند، باید تعیین کنند که آیا باید راهکارهای واکسیناسیون مرسوم یا روش های جدیدی را دنبال کنند. پیشرفت هایی در ایمونولوژی اولیه و تکنولوژی DNA نوترکیب، اساسا فرآیند فرمول یک مفهوم واکسن، بهینه سازی آنتی ژن های محافظ و انتخاب روش موثر تحویل واکسن برای واکسن های دفاع زیستی منتخب را اصلاح کرده است (۳۵).

مکانیسم عملکرد DNA واکسن ها

در سال ۱۹۹۰، Wolff و همکارانش نشان دادند که تزریق DNA که ژنهای گزارشگر لاکتاز را کد میکند به عضله موش موجب بیان پروتئین پایدار شده است. Tangو همکاران متعاقبا نشان دادند که معرفی یک پلاسمید که هورمون رشد انسان (hGH) را کد میکند، به پوست موش، واکنش آنتی بادی را نسبت به پروتئین بیان شده موجب می‌شود و از اینرو مستقیما یک واکسن پروتئینی را تقلید می‌کند. اثبات نهایی این که آنتی ژن کدگذاری شده می تواند حفاظت واکسنی موثری را ارائه دهد، از تظاهراتی است که تزریق پلاسمیدی که پروتئین هسته ای آنفلوانزا را کد میکند به عضله موش، سلول های T سیتوتوکسیک (CTL) اختصاصی تولید می‌کند که سپس موش‌ها را از چالش بعدی آنفلوانزا محافظت می‌کند. در حالی که این مطالعات مفید بودن تئوری DNA واکسن ها را تأیید می‌کند، ملاحظات عملی همچنان باقی مانده است. به عنوان مثال، تکثیر DNA باعث بیان آنتی ژن در محدوده پایین پیکوگرم به محدوده نانوگرم می شود و بیشتر سلول های سوماتیک منتقل شده سلول های ارائه دهنده آنتی ژن های حرفه ای (APC) نیستند. اختلاف بالقوه این است که بیان پایین آنتی ژن پایدار با DNA تزریق شده ممکن است باعث پاسخ ایمنی اکتسابی اولیه‌ی بهتری در مقایسه با تزریق آنتی ژن‌های پروتئینی با نیمه عمر کوتاه شود (۱۱, ۱۲, ۳۶).

عناصر تحریک ایمنی DNA پلاسمید مانند موتیف های CpG غیرمتیله ممکن است در ایمنوژنیسیته DNA نقش داشته باشند. موتیف های دونوکلئوتیدی CpG دارای فراوانی پایینی هستند و عمدتا در ژنوم پستانداران متیله هستند. در مقابل، DNA باکتریایی حاوی بسیاری از موتیف های CpG غیرمتیله است که می تواند از طریق پستانداران به عنوان الگوی مولکولی مرتبط با پاتوژن (PAMP) شناخته شود. CpG غیرمتیله سلول های ایمنی ذاتی را از طریق اتصال به گیرنده های شبه تول-۹ (TLR-9) فعال می کند (۳۷, ۳۸). TLR9 برای اثربخشی یک واکسن دی ان ای در برابر ویروس کوریومننژیت لنفوسیتی (LCMV) در نخستین برخورد مهم است، و نه در یک زمینه افزایش یافته(۳۹). TLR9 در سلولهای دندریتیک (DC) برای کارآیی اولیه سلولهای CD8 T + در مواجهه با پلاسمید در in vitro و واکسیناسیون تک دوز in vivo مورد نیاز است. با این حال، موش های فاقد TLR9 نیز به DNA پاسخ می دهند، که نشان می دهد که موتیف CpG برای DNA واکسن ضروری نیست (۴۰, ۴۱). مطالعات دیگری نشان داد که کیناز ۱متصل به TBK1 (TANK)، یک IKB غیرکانیونی، اثر امدادی DNA واکسن ها را در موش ها واسطه‌گری می‌کند (۴۲). نشان داده شده است که TBK1 می تواند IRF3 و IRF7 را فسفریله کند تا ژن های اینترفرون نوع I فعال شود. علاوه بر این، DNA سیتوپلاسمی نیز می تواند AIM2 (عدم حضور در ملانوم ۲)، STING (محرک ژن های IFN)، وابسته به IRF3 و مسیرهای ایمنی بدن را فعال کند و بنابراین ممکن است به DNA واکسن نیز کمک کند (۴۳, ۴۴).

اولین اثبات مفهوم DNA واکسن در سال ۱۹۹۰ مورد آزمایش قرار گرفت و شامل تزریق وکتورهای RNA یا DNA بیان کننده کلرامفنیکول استیل ترانسفراز،لوسیفراز، و بتا-گالاکتوزیداز به عضله اسکلتی موش بود. بیان invivo ژن‌های گزارشگر به راحتی قابل شناسایی بود و دو ماه طول کشید. مطالعات تفصیلی ژنهای بعدی نشان داد که میکرو پرتابه های طلای پوشیده شده با DNA در هنگام مواجهه با پوست موش در القای پاسخ های آنتی بادی به آنتی‌ژن بیان شده بسیار موثر بودند. در نهایت نشان داده شد که تزریق پلاسمید بیانگر آنزیم نوکلئوپروتئین آنفلوآنزا به چهارگوشه موش BALB / c می تواند لنفوسیت های T سیتوتوکسیک را با موش های ایمن سازی شده از چالش با سویه های ویروس آنفلوآنزا A محافظت کند. مطالعات مشابه در جوجه ها نیز پس از دو بار DNA واکسن H7-HA محافظت در برابر ویروس H7N7 ویروس هپاتیت B را نشان می دهد. اگر چه این مطالعات اولیه توانایی استفاده از اسیدهای نوکلئیک به عنوان واکسن را تایید می کند، اما بسیاری از سوالات عملی هنوز باید مورد ارزیابی قرار گیرد. اولین سوال، ایمنی DNA پلاسمید و خطر ورود آن در کروموزوم می باشد که باعث فعال شدن آنکوژنها یا جهش ژنهای سرکوبگر تومور می‌شود یا باعث افزایش بی‌ثباتی کروموزوم می‌شود. مطالعات بعدی تایید کرده است که واکسن های DNA یک احتمال بسیار کم از یکپارچگی ژنوم انسان را در سطح پایین‌تر نسبت به جهش‌های خودبخودی دارند. سوال مهم دیگر این بود که چگونه DNA واکسن ها، با توجه به سطح بسیار پایین بیان، قادر به ایجاد پاسخ ایمنی هستند. در مقایسه با نیمه عمر آنتی ژن های پروتئینی تزریقی، DNA پلاسمید می تواند بیان بافتی سلول های آنتی ژن را در مدت زمان بسیار طولانی‌تر فراهم کند، در نتیجه بطور بالقوه آغاز فعالیت سیستم ایمنی بدن را بهتر می کند. با توجه به ارائه آنتی‌ژن، سه مکانیسم احتمالی پیشنهاد شده است (۱): DNA پلاسمید درونی شده و توسط سلول‌های سمی (مثلا میوسیت ها) بیان شده و توسط مجموعه‌های MHC کلاس I به سلول های CD8 ارائه داده می‌شود (۲)؛ سلول های ارائه دهنده آنتی ژن حرفه ای (APC)، به عنوان مثال سلولهای دندریتیک جذب شده به محل تزریق توسط DNA پلاسمید منتقل می شوند و آنتی ژن های بیان شده به سلول های T از طریق MHC کلاس های I و II ارائه می شوند (۳)؛ فاگوسیتوز سلول های سوماتیک ترانسفکت شده توسط APC حرفه ای منجر به پراکندگی متقابل و ارائه آنتی ژن به هر دو T سلول های CD4 و CD8 است. از آنجایی که سلول های عضله قادر به ارائه آنتی ژن از طریق MHC کلاس II نیستند و نیاز به القای سلول های T کمک کننده دارند، ارائه مستقیم یا غیرمستقیم توسط APC حرفه ای، مسیر محتمل تر است (۸, ۱۱, ۳۶, ۴۵).

عناصر درونی DNA پلاسمید نیز می توانند پاسخ های ایمنی ذاتی را فعال کنند، در نتیجه پاسخ های ایمنی سازگار را نسبت به آنتی ژن های بیان شده افزایش می دهند. سیستم ایمنی ذاتی از گیرنده های شناخت الگو (PRR) استفاده می کند تا حس تهاجم به پاتوژن ها را ایجاد کند و باعث تولید اینترفرون های نوع I و سیتوکین های پیش التهابی شود. در موش و انسان، گیرنده شبه تول –۹ (TLR9) یک PRR سیتوزولی است که به توالی های DNA حاوی موتیف سیتوزین گوانین (CpG) غیرمتیله متصل می شود که منجر به فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ وابسته به MyD88 می شود. موتیف های CpG در ژنوم های پستانداران نادر هستند، که در آنها معمولا متیله می شوند، در حالی که در باکتری ها موتیف های CpG غیرمتیله شایع است. گرچه موتیف CpG می تواند نقش مهمی در فعالیت واکسن ایفا کند، موش ناکوت TLR9 نشان داد که TLR9 برای کار DNA واکسن ها ضروری نیست، و پیشنهاد می کند که دیگر سنسورهای DNA سیتوزولی ممکن است در ایمنی‌زایی DNA واکسن نیز شرکت کنند. یکی از چنین PRR، cGAS (cGMP-AMPستناز حلقوی) است که پس از شناخت dsDNA، باعث ایجاد cGAMP برای فعال کردن ژنهای اینترفرون (STING) می شود. یکی دیگر از PRRهای DNA، DAI (DLM-1 / ZBP1) است که همچنین STING را فعال می کند و موجب بیان اینترفرون نوع I می شود. TBK1، در پایین دست از cGAS و DAI، برای افزایش عمل DNA واکسن مهم است. یکی دیگر از سنسورهای مهم سیتوزولی DNA، AIM2 است که باعث فعال شدن التهاب و تولید سیتوکین التهابی می شود. یک مطالعه اخیر نشان داد که هر دو واکنش های انحصاری هومورال و سلولی مختص آنتی ژن نسبت به DNA واکسن ها به طور معنی داری در موش های دارای نقص در AIM2 کاهش می یابد. پروتئین های هلیکاز، DHX29 و RIG-I حساس به اسیدهای نوکلئیک هستند و ممکن است به فعالیت DNA واکسن کمک کنند. دیگر سنسورهای DNA بالقوه شامل DDX41، IFI16، DNA-PK و MRE11 هستند. از این رو، این PRR و مسیرهای سیگنالینگ پایین دست ممکن است وسیله ای ارزشمند برای افزایش عمل DNA واکسن باشند (۸, ۳۸, ۳۹, ۴۶–۴۹).

روش های تحویل DNA واکسن

مسئله دیگر در کارآیی واکسن دی ان ای، حالت تحویل آن است. تزریق داخل عضلانی استاندارد DNA برهنه بسیار ناکارآمد است، و تنها بخش کوچکی از DNA تزریقی توسط سلول ها جذب شده و بیان می شود. یک روش جایگزین تزریق واکسن های دی ان ای در ریزذرات پوشیده با نانو است که پلاسمید ها را از تخریب محافظت می کند و جذب فاگوسیتیک توسط APC های حرفه ای را افزایش می دهد. DNA پلاسمیدی نیز می تواند بر روی ذرات طلا کلوئیدی پوشانده شود و توسط روش "تفنگ ژنی" تحویل داده شود. گرچه یکی از مزیت های "تفنگ ژنی" هدف قرار دادن آن بر سلول های لانگرهانس و دیگر APC های حرفه ای است، اما در ظرفیت دوز محدود شده است که به این معنی است که چندین شلیک در چندین سایت برای ایمن سازی موثر لازم است. با این حال، مهمترین پیشرفت در تحویل DNA واکسن ها، الکتروپورشن (EP) بوده است. EP بطور موثر سلول های سوماتیک را در in vivo ترانسفکشن می کند و القای التهاب موضعی آن نیز پاسخ ایمنی را افزایش می دهد. آزمایشات بالینی اثربخشی EP را تایید کرده است. به عنوان مثال، EP از DNA یک ویروس هپاتیت B (HBV)، موجب پاسخ قوی CTL در موش و خرگوش شد. EP به طور مشابه پاسخ های هومورال به DNA واکسن DHBVدر اردک ها را افزایش داده است. EP همچنین نشان داده که ایمنی زایی در موشهای حاوی ریز ذرات پوشش داده شده با DNA را افزایش می دهد. از این رو EP به عنوان روشی امیدوار کننده برای بهبود ایمنی زایی DNA واکسن ها باقی می ماند، اگر چه ضعف تحمل پذیریEP در تنظیم واکسن پروفیلاکتیک نگران کننده است (۴۴).

برای غلبه بر مسئله ایمنوژنیسیته پایین DNA واکسن، انتقال موثر به پلاسمید برای تحویل به بافت یا سلول های مورد نظر یک زمینه تحقیقاتی حیاتی است. همانطور که در مورد واکسن های پروتئینی معمولی، DNA واکسن ها می توانند توسط روش های مختلفی از جمله تزریق سوزنی معمولی، تفنگ ژنی، الکتروپوریشن، نانوذرات، میکروسرنگ ها و لیپوزوم ها ارائه شوند. بر اساس مطالعات حیوانی، EP همراه با یک استراتژی پیشبرد نخستین می‌تواند بالاترین میزان ایمنی را به ارمغان بیاورد. با این وجود، حتی اگر آزمایشهای بالینی EP با موفقیت انجام شود و اثرات مفید برای دوز نشان داده شود، EP برای افزایش ایمنوژنیسیته واکسن تضمین نمی شود و ممکن است برای بسیاری از واکسن های انسانی قابل اجرا نباشد. از این رو، برای تحویل DNA واکسن، روش های ساده تر، اما کارآمدتر نیاز است. کاندید بالقوه شامل تحویل به پوست بدون سوزن یا تحویل ریوی می باشد. سیستم های تحویل ژنی به پوست بدون سوزن از جریان های ریز با فشار بالا برای هدف گیری اعماق مختلف پوست استفاده می کنند. DNA منتقل شده سپس قادر به ترانسفکت سلول های لانگرهانس در پوست است. واحدهای تجاری مانند بیوجکتور یا فارماجت قادر به ارائه DNA واکسن ها در مدل های حیوانی و آزمایش های انسانی هستند. یک مطالعه اخیر با استفاده از یک مدل خرگوش نشان داد که یک DNA واکسن آنفلوانزا که توسط واکسیناتور IDAL بدون سوزن تحویل داده شد، یک واکنش مشابه آنتی بادی را به الکتروپوریشن داخل پوست، تحریک کرد. یک آزمایش بالینی دیگر از بیوجکتور برای تهیه یک DNA واکسن HIV-1 با تحمل خوب و آغازگر برای تولید IFN-γ سلول T-CD8 و پاسخ آنتی بادی پس از افزایش rAd5 استفاده کرد. با توجه به ایمنی آن، کم هزینه بودن و سهولت

استفاده و توانایی ارائه پلاسمید های پوشش داده شده خشک، دستگاه های تزریق بدون سوز وعده زیادی برای تحویل DNA واکسن نشان می‌دهد (۸).

تحویل درون ریوی و یا اینترانازال DNA واکسن ها، جایگزین اضافی است، هرچند تعداد مطالعات انسانی این روشها بسیار محدود است. در تئوری، واکسیناسیون ریه باید با DNA تحویل داده شده مواجه شود و آنتی ژن ها را به یک سطح بزرگ از سلول های اپیتلیال و ایمنی بیان کند، که از نیاز به تزریق سوزنی جلوگیری می‌کند. یک مطالعه اخیر نشان داد که DNA واکسن های پلاسمید HIV-1 کمپلکس شده با کاتیون به طور موضعی به موکوس های ریوی میگرنی اعمال شده است که هر دو مدل پاسخ ایمنی مخاطی و سیستمیک را القا میکند. علاوه بر این، هنگامی که با PEIکمپلکس شود، DNA واکسن موجب محافظت از آنفولانزا می شود. مطالعه دیگری نشان داد که ایمن سازی DNA ریه، ایمنی محافظتی ضد ویروسی را از طریق افزایش پاسخ های CD8 + T در مجاری هوایی، واسطه گری می کند. بزرگترین چالش برای تحویل ریوی نیاز به روش های تحویل تخصصی است. جت های معمولی یا نبولایزرهای اولتراسونیک قادر به ارائه زیست مولکول های بزرگ مانند پلاسمید DNA به ریه نیستند زیرا تنش های برشی بالا و استحکام کاویتاسیون در هنگام نبولایزاسیون رخ میدهد. با این حال، پیشرفت های اخیر در روش های تحویل ممکن است این را تغییر دهد، با آن که نبولایزاسیون امواج صوتی سطحی نشان داده شده که به طور موثر DNA واکسن پلاسمید آئروسل شده در موش و گوسفند را با القای پاسخ های آنتی بادی سیستمیک و مخاطی ارائه می دهند (۲۹).

استفاده از DNA واکسن ها برای دفاع زیستی

تاریخ نگرانی های منطقی را در مورد بیوتروریسم گزارش می کند. در حالی که این نگرانی ها یک بحث کاملا فراتر از محدوده و قصد این مطالعه است، واضح است که دولت ها، افراد و گروه های سیاسی / تروریستی به منظور دستیابی به انواع اهداف سیاسی، به دنبال استفاده از سلاح های زیستی هستند. علاوه بر این، حساسیت جمعیت گسترده به این عوامل وجود دارد، و در نتیجه قرار گرفتن در معرض پایداری جوامعی که در معرض خطر قرار دارند، رویداد گسترده بیوتروریسم رخ می دهد. در سال ۲۰۰۱، در ایالات متحده ۲۲ مورد از سیاه زخم استنشاقی ناشی از پودر سلاحی سیاه زخم که از طریق سیستم پستی ایالات متحده فرستاده شده بود گزارش شد که در نتیجه ۵ مورد مرگ و میر ناشی از آن به وقوع پیوست. این حملات منجر به اختلال در سیستم پستی، ساختمان مجلس سنا و سنا، شرکت های هواپیمایی و چندین نهاد دیگر مهم در اقتصاد ملی و زندگی سیاسی شد. به طور مشابه، شیوع آبله میمونی در ایالات متحده و نگرانی در مورد استفاده از آبله گاوی به عنوان یک سلاح باعث برنامه های واکسیناسیون در مقیاس وسیع علیه آبله گاوی در نیروهای نظامی ایالات متحده شد و تلاش برای اجرای یک برنامه مشابه در میان کارکنان بهداشتی غیرنظامی و اولین پاسخ دهنده ها شد. در ترکیب با افزایش بی ثباتی سیاسی جهانی و بنیادگرایی رادیکال، نگرانی های معتبر در مورد توانایی محافظت از جمعیت غیرنظامی علیه عوامل بیوتروریسم همچنان گسترده است. تشخیص این تهدید و روش هایی برای کاهش تهدید، در بالاترین سطوح و با مشاجره زیادی باقی می ماند (۳۴, ۵۰, ۵۱).

در حال حاضر تنها تعداد محدودی از واکسن های مجاز FDA در برابر عوامل بیوتروریسم در ایالات متحده وجود دارد. این ها واکسن های ضد آبله گاوی و سیاه زخم هستند. تعدادی از واکسن های دفاع زیستی در IND (دارو جدید تحقیقاتی) وجود دارند، اما فقط در شرایط بسیار محدود و ویژه ای مورد استفاده قرار می گیرند و برای استفاده گسترده در جمعیت غیرنظامی مناسب نیستند. علاوه بر این، ایمن سازی منفعل با استفاده از گلوبولین بیش از حد ایمنی برای آبله در دسترس است. بنابراین، برای اکثر تهدیدات بیوتروریسمی بیماری های عفونی، ما در واقع داروی واکسنی مفید نداریم. مراکز کنترل و پیشگیری از بیماری (CDC) بسیاری از عوامل عفونی نگران کننده (عوامل گروه A-C) را که می توانند بعنوان عاملان بیوتروریسم مورد استفاده قرار گیرند، را فهرست می کنند. این، البته، امکان استفاده از عوامل زیست مهندسی شده را شامل نمی شود. مسائل گوناگونی به دنبال استفاده از واکسن های مجاز در حال حاضر در میان مردم است که امکان پذیر نیست. در این میان، هزینه های موجود، محدودیت دسترسی به واکسن ها و واکنش های زیستی / عوارض جانبی ناگوار وجود دارد. واکسن آبله یک واکسن ویروسی زنده است و به همین ترتیب تعداد زیادی از موارد منع مصرف وجود دارد به طوری که حدود ۳۰–۵۰٪ از عموم مردم واجد شرایط دریافت واکسن در معرض خطر بالقوه قرار گرفتن در معرض واقعی نیستند. به عنوان مثال، واکسن آبله واکنش پذیر ترین واکسن واجد شرایط ایالات متحده است و می تواند منجر به مرگ (نادر) و واکنش های جانبی شدید یا تهدید کننده زندگی شود. نگرانی دیگر برای واکسن آبله عبارت است از انتقال انسان به انسان ویروس واکسن به دیگران. به عنوان مثال دیگر، در حال حاضر، واکسن سیاه زخم نیاز به یک سری از ۶ تزریق طی ۱۸ ماه دارد، که سالانه باید تکرار شود، که در میان جمعیت عمومی غیر عملی است. در حالی که برخی از اعضای ارتش ایالات متحده این واکسن را دریافت می کنند، دسترسی محدود به این واکسن یک مسئله است و واکسن به طور منظم برای شهروندان در دسترس نیست (۳۴, ۵۰).

توسعه واکسنها برای تهدیدات بالقوه بیولوژیکی یکی از مهمترین راهکارهای دفاع زیستی است. بسیاری از ویروس های مرتبط با دفاع زیستی، ویروس های RNA شامل (+) RNA alphavirus ها و flavivirus ها هستند. ویروس های بسیار بیماریزا می توانند به عنوان تهدیدات طبیعی و یا سلاح های بیولوژیکی بالقوه مورد توجه قرار گیرند که می تواند توسط

بیوتروریست ها به کار رود. فعالیت های دفاع زیستی متمرکز بر حفاظت از جمعیت غیرنظامی و نظامی از پاتوژن های دفاع زیستی می باشد که شامل تهدیدات بهداشت عمومی، دامپزشکی و کشاورزی می شود. هدف از واکسن های دفاع زیستی جلوگیری از شیوع بیماری است؛ و در صورتی که شیوع بیماری رخ دهد، به طور موثر آن را شامل می شود. یک واکسن دفاع زیستی ایده آل، برای واکنش سریع واکسن ها در واکنش به پاتوژن های نوظهور یا مهندسی امکان پذیر است (۵۷-۵۲).

چالش هایی که در توسعه واکسن های دفاع زیستی بوجود می آیند عبارتند از مشکلات کار با پاتوژن ها، که اغلب به عنوان عوامل انتخاب شده طبقه بندی می شوند و نیاز به بالاترین سطح مهار بیولوژیکی (ABSL / BSL-3 و / یا ABSL / BSL-4) و اقدامات احتیاطی امنیت زیستی مناسب دارند. علاوه بر این، در انجام مطالعات بالینی اثربخش، موانع زیادی وجود دارد، چرا که بیشتر بیماری های مرتبط با دفاع زیستی غیر قابل پیش بینی است و به صورت پراکنده رخ می دهد. مدل های حیوانی به عنوان روش جایگزین برای نشان دادن اثربخشی برای حمایت از مجوز واکسن در نظر گرفته می شوند. با این حال، به رغم معرفی FDA "قوانین حیوانی" ۱۵ سال پیش، تنها واکسن مجاز با استفاده از این مسیر تنظیم کننده BioThrax است که در پایان سال ۲۰۱۵تایید شده است. در نهایت، در مقایسه با تولید واکسن های تجاری هیچ مشوق برای صنعت داروسازی برای سرمایه گذاری در واکسن های دفاع زیستی وجود ندارد، که در اکثر موارد برای تولید سریع جهت پاسخ اورژانسی بهداشت عمومی یا برای ذخیره سازی واکسن که هرگز استفاده نمی شود، وجود دارند. در غیاب شیوع بیماری و یا تهدید، بازار معمولی واکسن های دفاع زیستی کوچک است و به طور عمده شامل پرسنل بیمارستان، پاسخ دهندگان اول، مسافران و پرسنل نظامی و غیرنظامی در مناطق اندمیک است که می توانند با ویروس های مرتبط با دفاع زیستی در تماس باشند. بنابراین، به دلایل مختلف علمی و اقتصادی، در حال حاضر هیچ واکسنی برای استفاده عمومی برای تقریبا تمام ویروس های مرتبط با دفاع زیستی مجاز نیست، و تنها موارد نادری مانند واکسن ویروس آبله وجود دارد (۵۸, ۵۹).

واکسن دفاع زیستی ترجیحا باید یک پاسخ ایمنی محافظ را در یک دوز منفرد ایجاد کند و به ایمنی قبل از مصرف به اجزای واکسن تأثیری نداشته باشد. رویکرد واکسن آغاز شده توسط iDNA به طور بالقوه می تواند یک راه حل ابتکاری برای استراتژی های واکسیناسیون دفاع زیستی به علت (i) ثبات ژنتیکی، (ii) ثبات دمایی، (iii) فعال سازی ایمنی ذاتی، و (iv) توانایی حفاظت با یک تک واکسیناسیون را مهیا کند. همانند هر پلاسمید تولید شده از باکتری، iDNA شامل نقاط CpG می باشد و انتظار می رود که ایمنی ذاتی را تحریک و ایمنی اکتسابی را تسریع کند. حضور DNA در سیتوپلاسم سلول های پستاندار به عنوان یک سیگنال هشدار توسط cGAS و دیگر حسگرهای وابسته به STING درک می شود. در واکنش، سیستم ایمنی بدن، رونویسی ژن های ضد ویروسی مانند اینترفرون های نوع I و تولید سیتوکین های التهابی مانند IL-1β را آغاز می کند. فعال سازی ایمنی ذاتی و القای پاسخ سیتوکین به عنوان آغازگر کارآمد برای واکنش های ایمنی مختص ویروس به کار می رود و در نتیجه بهبود واکنش های ایمنی مورد انتظار است (۵۹, ۶۰).

محدودیت‌های استفاده از DNA واکسن

از مهم ترین محدودیت های DNA واکسن این است که تنها برای عرضه آنتی ژن های پروتئینی قابل استفاده است و نمی تواند آنتی ژن های غیرپروتئینی را تولید کند .همچنین این واکسن ها می توانند روی ژن هایی که رشد سلول را کنترل می کنند تأثیر بگذارند. همچنین امکان ایجاد تحمل نسبت به آنتی ژن هایی که توسط DNA واکسن تولید می شود نیز وجود دارد، هرچند گفته می‌شود DNA واکسن (مانند آنتی بادی ضد DNA)، می‌تواند تومورزا باشد و به داخل ژنوم سلول میزبان الحاق شده و منجر به بروز پاسخ‌های خودایمنی گردد، اما در این موارد، به خصوص در مورد انسان و پریمات‌ها شواهد کمی وجود دارد. در مدل حیوانی، میزان الحاق به داخل ژنوم سلول، محاسبه و مورد مطالعه قرار گرفته است که این میزان بسیار کمتر از میزان جهش خودبه خودی در ژنوم پستانداران و سلول های یوکاریوتی است. مطالعه ای در ماهی نشان داد ایمن سازی با DNA واکسن منجر به تحریک پاسخ ایمنی می شود، بدون اینکه اتوآنتی بادی ضد DNA و الحاق به کروموزوم سلول میزبان رخ دهد. آزمایشها نشان داده است تزریق DNA واکسن ضد HIV-1 با شامپانزه های کودک، بالغ و باردار به طورکلی ایمن بوده و می تواند ایمنی مؤثر را از نوع هومورال و سلولی بر ضد HIV تولید کند .همچنین در اولین مطالعه بالینی DNA واکسن بر ضد HIV، هیچ گونه واکنش موضعی، سیستماتیک، بیماری خودایمنی و آنتی بادی ضد DNA مشاهده نگردید این یافته ها نشان داد تزریق DNA واکسن به بدن انسان و حیوان به طورکلی ایمن بوده و به منظور ایمن سازی بر ضد عوامل بیماری زا، بسیار مؤثر و کارآمد است. به تازگی دیگر مطالعه بالینی نشان داده است تزریق داخل جلدی DNA واکسن، منجر به ترانسفکت فیبروبلاست ها و کراتینوسیت های پوست شده، درحالی که تزریق داخل عضلانی باعث ترانسفکت سلول های میوسیت می شود. چنانچه DNA واکسن از طریق تفنگ ژنی وارد بدن گردد، به طور عمده بیشتر سلول های اپیدرمیس ترانسفکت شده و نیازمند مقدار کمتری DNA هستند. همچنین تعداد APCدر پوست نسبت به عضله بیشتر است، بنابراین مقدار کمتری DNA برای تحریک پاسخ ایمنی لازم است (۷۲-۶۱).

چشم انداز آینده

از سال ۲۰۰۱، توسعه واکسن دفاع زیستی پیشرفت قابل توجهی در زمینه تولید، مکانیسم های ایمنولوژیک و رویکردهای واکسیناسیون نوین داشته است. دیگر موارد منحصر به فردی وجود دارند که در این بررسی تکنولوژی دیده نمی شوند، اما برای توسعه واکسن دفاع زیستی مهم هستند. و شامل موارد زیر می شوند: ۱) "قانون حیوانات" که در مورد واکسن هایی که قادر به انجام آزمایش اثربخش در مقیاس وسیع برای فاز نهایی در انسان نیستند به کار میرود، چون وقوع طبیعی چنین عفونت هایی نادر است؛ ۲) تهدیدات مهندسی زیستی شده که یک تهدید بیوترویسم منحصر به فرد را تشکیل می دهند که به پاتوژن های مرسوم بستگی ندارد؛ و ۳) قوانین و فرآیندهای حاکم بر استفاده از واکسن های وضعیت IND (دارو جدید تحقیقاتی) که می تواند برای هدف مجوز استفاده اضطراری (EUA) که توسط قانون BioShield پروژه سال ۲۰۰۴ (قانون عمومی ۱۰۸–۲۷۶) ایجاد شده، توسعه داده شده و ذخیره شود. واکسن های موفق دفاع زیستی آینده نیاز به نوآوری برای رفع نیازهای مورد درخواست روزافزون به طور فزاینده ای در ایمنی و کارآیی می باشد. کمتر احتمال دارد که یک فرمت متناسب با هر واکسن دفاع زیستی مناسب باشد، اما واکسن های موفق آینده دفاع زیستی بدون شک بسیاری از نوآوری های تکنولوژیکی را شامل خواهد شد (۳۵).

نتیجه گیری

توسعه و استقرار واکسن ها در برابر تهدیدات بیوتروریسم دارای نگرانی های متعدد است که معمولا با توسعه واکسن در برابر تهدیدات استاندارد عفونی ارتباط ندارد. اینها شامل نگرانی های سیاسی، اخلاقی، اجتماعی و اقتصادی است که معمولا برای واکسن های استاندارد وجود ندارد. یک نگرانی عملی نیز وجود دارد، آن هم اساس نامناسب در نسل بعدی محققان و پزشکان متخصص در تشخیص و پیشگیری از بیماری های نگران کننده می باشد. برای بسیاری از این بیماری ها تردید است که پزشکان فعلی یا آینده در تشخیص و درمان این بیماری ها تخصص خواهند داشت. به همین ترتیب، کارشناسانی که در این آزمایشگاه با این عوامل کار کرده اند و می توانند واکسن ها و داروهای ضدویروسی را در برابر این بیماری ها توسعه دهند، تعدادشان کم است. در این مورد، این نگرانی ها موانع قابل ملاحظه ای برای توسعه واکسن و درمان است. در ایالات متحده، تنها دو واکسن دارای مجوزFDA، آبله و سیاه زخم، به عنوان اقدامات واکسن ضدتروریسم در دسترس هستند. بسیاری از واکسن های دیگر درمرحله توسعه پیش بالینی یا در مرحله IND هستند. این که آیا عوامل مورد بحث در بالا به موانع "عدم دسترسی" برای صدور گواهینامه، و به این ترتیب در دسترس بودن برای استفاده ثابت خواهند شد، یک سوال باز است. برنامه های جدید مانند BARDA باید، بخش خصوصی را در توسعه واکسن ها تسریع بخشند. با این وجود، در یک عصر جاری جهانی که منابع غیرقابل محدود و نامناسب است، هنوز مشخص نیست که چگونه هزینه های عظیم توسعه واکسن را در برابر خطرات نامطلوب بیوتروریسم توجیه کنیم. این محاسبات ممکن است در این نقطه در تاریخ بیش از حد نامشخص باشد، اما این وضعیتی است که نوآوری را در توسعه و استقرار واکسن ایجاد می کند. دستیابی به راه حل های این معضل نیازمند همکاری بین کشورها، صنایع، دانشگاه ها و ... است. این کار دشوار و تکراری است و بیشتر به گفتمان و آموزش عمومی نیاز دارد تا تصمیمات پایدار و آگاهانه. با این وجود، انجام هیچ کاری یا ادامه دادن به مسیر فعلی، برای نگرانی ها، نیازها و ترس از دولت ها و مردم، غیر قابل قبول و غیرقابل پاسخ است. ما معتقدیم که در حل این مسائل رایج و ایجاد هزینه های کم، روش های سریع توسعه، تست و استقرار واکسن ممکن است مفید باشد. در چارچوب یک انجمن چند رشته ای و چند ملیتی که به طور مشترک توسط کشورهای علاقه مند تامین می شود که ارزش های مربوط به توسعه و تولید واکسن مشترک را درک می کنند. این که آیا کشش برای چنین ایده ای می تواند قبل از یک رویداد مهم بیوتروریسم ایجاد شود، ناشناخته است، اما اراده سیاسی، منابع و هوش را خواهد گرفت.

تشکر و قدردانی: از تمامی افرادی که در تهیه این مطالعه همکاری داشته اند تشکر و قدردانی می شود.

تضاد منافع: بدینوسیله نویسنده تصریح می نمایند که هیچ گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Juan L, Xiao Z, Song Y, Zhijian Z, Jing J, Kun Y, et al. Safety and immunogenicity of a novel therapeutic DNA vaccine encoding chicken type II collagen for rheumatoid arthritis in normal rats. Human vaccines & immunotherapeutics. 2015;11 (12):2777-83.
2. Vacchelli E, Aranda F, Obrist F, Eggermont A, Galon J, Cremer I, et al. Trial watch: immunostimulatory cytokines in cancer therapy. Oncoimmunology. 2014;3(6):e29030.
3. Pereiro P, Dios S, Boltaña S, Coll J, Estepa A, Mackenzie S, et al. Transcriptome profiles associated to VHSV infection or DNA vaccination in turbot (Scophthalmus maximus). PloS one. 2014;9(8):e104509.
4. Ballesteros NA, Saint-Jean SSR, Perez-Prieto SI, Coll JM. Trout oral VP2 DNA vaccination mimics transcriptional responses occurring after infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Fish & shellfish immunology. 2012;33(6):1249-57.

5. Klug B, Reinhardt J, Robertson J. Current status of regulations for DNA vaccines. Gene Vaccines: Springer; 2012. p. 285-95.
6. Rajčáni J ,Moško T, Režuchová I. Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? Reviews in medical virology. 2005;15(5):303-25.
7. Abdulhaqq SA, Weiner DB. DNA vaccines: developing new strategies to enhance immune responses. Immunologic research. 2008;42(1-3):219.
8. Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. Expert review of vaccines. 2016;15(3):313-29.
9. Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. Immunological reviews. 2011; 239(1):62-84.
10. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? Nature Reviews Genetics. 2008;9(10):776-88.
11. Tang D-c, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature. 1992;356(63):65-152.
12. Ulmer JB, Donnelley JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki V, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science. 1993;259 (5102):1745-50.
13. Wang B, Ugen KE, Srikantan V, Agadjanyan MG, Dang K, Refaeli Y, et al. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993;90(9):4156-60.
14. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993;90(24):11478-82.
15. Wang B, Merva M, Dang K, Ugen K, Boyer J, Williams W, et al. DNA inoculation induces protective in vivo immune responses against cellular challenge with HIV-1 antigen-expressing cells. AIDS research and human retroviruses. 1994;10:S35-41.
16. Doria-Rose NA, Haigwood NL. DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. Methods. 2003;31(3):207-16.
17. von Gegerfelt AS, Rosati M, Alicea C, Valentin A, Roth P, Bear J, et al. Long-lasting decrease in viremia in macaques chronically infected with simian immunodeficiency virus SIVmac251 after therapeutic DNA immunization. Journal of virology. 2007;81(4):1972-9.
18. Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. The Journal of Immunology. 1997;158(5):2278-84.
19. Belperron AA, Feltquate D, Fox BA, Horii T, Bzik DJ. Immune responses induced by gene gun or intramuscular injection of DNA vaccines that express immunogenic regions of the serine repeat antigen from Plasmodium falciparum. Infection and immunity. 1999;67(10):5163-9.
20. Oliveira S, Rosinha G, De-Brito C, Fonseca C, Afonso R, Costa M, et al. Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes. Brazilian journal of medical and biological research. 1999;32(2.(
21. McCluskie MJ, Millan CB, Gramzinski RA, Robinson HL, Santoro JC, Fuller JT, et al. Route and method of delivery of DNA vaccine influence immune responses in mice and non-human primates. Molecular Medicine. 1999;5(5):287.
22. Sasaki S, Hamajima K, Fukushima J, Ihata A, Ishii N, Gorai I, et al. Comparison of intranasal and intramuscular immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a DNA-monophosphoryl lipid A adjuvant vaccine. Infection and immunity. 1998;66(2):823-6.
23. MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, et al. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. Journal of infectious diseases. 1998;178(1):92-100.
24. Kwissa M, von Kampen J, Zurbriggen R, Glück R, Reimann J, Schirmbeck R. Efficient vaccination by intradermal or intramuscular inoculation of plasmid DNA expressing hepatitis B surface antigen under desmin promoter/enhancer control. Vaccine. 2000;18(22):2337-44.
25. Boyer JD, Wang B ,Ugen KE, Agadjanyan M, Javadian A, Frost P, et al. In vivo protective anti-HIV immune responses in non-human primates through DNA immunization. Journal of medical primatology. 1996;25(3):242-50.
26. Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y, et al. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. Science. 1998;282(5388):476-80.
27. Catanzaro AT, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Enama ME, Moodie Z, et al. Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. The Journal of infectious diseases. 2006;194(12):1638-49.
28. Catanzaro AT, Roederer M, Koup RA, Bailer RT, Enama ME, Nason MC, et al. Phase I clinical evaluation of a six-plasmid multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. Vaccine. 2007;25(20):4085-92.
29. Villarreal DO, Talbott KT, Choo DK, Shedlock DJ, Weiner DB. Synthetic DNA vaccine strategies against persistent viral infections. Expert review of vaccines. 2013;12(5):537-54.
30. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. Annual review of immunology. 2000;18 (1):927-74.
31. Bowick GC, Barrett AD. Comparative pathogenesis and systems biology for biodefense

virus vaccine development. BioMed Research International. 2010;2010.
32. Bambini S, Rappuoli R. The use of genomics in microbial vaccine development. Drug discovery today. 2009;14(5):252-60.
33. Rappuoli R, Covacci A. Reverse vaccinology and genomics. Science. 2003;302(5645):602.-
34. Poland GA, Jacobson RM, Tilburt J, Nichol K. The social, political, ethical, and economic aspects of biodefense vaccines. Vaccine. 2009;27:D23-D7.
35. Lu S, Wang S. Technical transformation of biodefense vaccines. Vaccine. 2009;27:D8-D15.
36. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science. 1990;247(4949 Pt 1):1465-8.
37. Klinman DM, Yamshchikov G, Ishigatsubo Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. The Journal of Immunology. 1997;158(8):3635-9.
38. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000;408(6813):740-5.
39. Rottembourg D, Filippi CM, Bresson D, Ehrhardt K, Estes EA, Oldham JE, et al. Essential role for TLR9 in prime but not prime-boost plasmid DNA vaccination to activate dendritic cells and protect from lethal viral infection. The Journal of Immunology. 2010;184(12):7100-7.
40. Babiuk S, Mookherjee N, Pontarollo R, Griebel P, Hecker R, Babiuk L. TLR9−/− and TLR9+/+ mice display similar immune responses to a DNA vaccine. Immunology. 2004;113(1):114-20.
41. Tudor D, Dubuquoy C, Gaboriau V, Lefèvre F, Charley B, Riffault S. TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines. Vaccine. 2005;23(10):1258-64.
42. Ishii KJ, Kawagoe T, Koyama S, Matsui K, Kumar H, Kawai T, et al. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines .Nature. 2008;451(7179):725-9.
43. Sharma S, Grandvaux N, Zhou G-P, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. Science. 2003;300(5622):1148-51.
44. Li L, Saade F, Petrovsky N. The future of human DNA vaccines. Journal of biotechnology. 2012;162(2):171-82.
45. Faurez F, Dory D, Le Moigne V, Gravier R, Jestin A. Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. Vaccine. 2010;28(23):3888-9.٥
46. Gao P, Ascano M, Wu Y, Barchet W, Gaffney BL, Zillinger T, et al. Cyclic [G (2′, 5′) pA (3′, 5′) p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase. Cell. 2013; 153(5):1094-107.
47. Zhang Y, Yeruva L, Marinov A, Prantner D, Wyrick PB, Lupashin V, et al. The DNA sensor, cyclic GMP–AMP synthase, is essential for induction of IFN-β during Chlamydia trachomatis infection. The Journal of Immunology. 2014;193(5):2394-404.
48. Fernandes-Alnemri T, Yu J-W, Juliana C, Solorzano L, Kang S, Wu J, et al. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to Francisella tularensis. Nature immunology. 2010;11(5):385-93.
49. Zhang Z, Yuan B, Bao M, Lu N, Kim T, Liu Y-J. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. Nature immunology. 2011;12(10):959-65.
50. Wright JG, Quinn CP, Shadomy S, Messonnier N, Control CfD, Prevention. Use of anthrax vaccine in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2009. MMWR Recomm Rep. 2010;59(RR-6):1-30.
51. Lewin T. Debate in Philadelphia on forced vaccinations. NY Times. 1991:23.
52. Hashemian SM, Farzanegan B, Fathi M, Ardehali SH, Vahedian-Azimi A, Asghari-Jafarabadi M, Hajiesmaeili M. Stress among Iranian nurses in critical wards. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2015;17(6).
53. Vahedian-Azimi A, Ebadi A, Saadat S, Ahmadi F. Intelligence care: a nursing care strategy in respiratory intensive care unit. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2015;17(11).
54. Vahedian-Azimi A, Ebadi A, Ahmadi F, Saadat S. Delirium in prolonged hospitalized patients in the intensive care unit. Trauma monthly. 2015;20(2).
55. Vahedian-Azimi A, Hajiesmaeili M, Kangasniemi M, Fornés-Vives J, Hunsucker RL, Rahimibashar F, et al. Effects of Stress on Critical Care Nurses: A National Cross-Sectional Study. Journal of intensive care medicine. 2017: 0885066617696853.
56. Barrett AD, Beasley DW. Development pathway for biodefense vaccines. Vaccine. 2009;27:D2-D7.
57. Weaver SC, Barrett AD. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. Nature Reviews Microbiology. 2004;2(10): 789-801.
58. Walsh SR, Dolin R. Vaccinia viruses: vaccines against smallpox and vectors against infectious diseases and tumors. Expert review of vaccines. 2011; 10(8):1221-40.
59. Pushko P, Lukashevich IS, Weaver SC, Tretyakova I. DNA-launched live-attenuated vaccines for biodefense applications. Expert review of vaccines. 2016;15(9):1223-34.
60. Coban C, Kobiyama K, Jounai N, Tozuka M, Ishii KJ. DNA vaccines: a simple DNA sensing matter? Human vaccines & immunotherapeutics. 2013;9(10):2216-21.
61. Kennedy RB, Ovsyannikova I, Poland GA. Smallpox vaccines for biodefense. Vaccine. 2009; 27:D73-9.
62. Dean HJ, Haynes J, Schmaljohn C. The role of particle-mediated DNA vaccines in biodefense preparedness. Advanced drug delivery reviews. 2005; 57(9):1315-42.

63. Artenstein AW, Grabenstein JD. Smallpox vaccines for biodefense: need and feasibility. Expert review of vaccines. 2008;7(8):1225-37.
64. Javad H, Seyed-Mostafa HZ, Farhad O, Mehdi M, Ebrahim AO, Nader RG, et al. Hepatoprotective effects of hydroalcoholic extract of Allium hirtifolium (Persian shallot) in diabetic rats. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2012; 23(2):83-7.
65. Tavakol HS, Farzad K, Fariba M, Abdolkarim C, Hassan G, Seyed-Mostafa HZ, et al. Hepatoprotective effect of Matricaria chamomilla. L in paraquat induced rat liver injury. Drug Res (Stuttg). 2015;65(2):61-4.
66. Lu S, Wang S, Grimes-Serrano JM. Current progress of DNA vaccine studies in humans. Expert review of vaccines. 2008;7(2):175-91.
67. Dupuy LC, Schmaljohn CS. DNA vaccines for biodefense. Expert review of vaccines. 2009;8(12): 1739-54.
68. Martin JE, Sullivan NJ, Enama ME, Gordon IJ, Roederer M, Koup RA, Bailer RT, Chakrabarti BK, Bailey MA, Gomez PL, Andrews CA. A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial. Clinical and vaccine immunology. 2006;13(11):1267-77.
69. Lu S, Wang S, Grimes-Serrano JM. Current progress of DNA vaccine studies in humans. Expert review of vaccines. 2008;7(2):175-91.
70. Hermanson G, Whitlow V, Parker S, Tonsky K, Rusalov D, Ferrari M, Lalor P, Komai M, Mere R, Bell M, Brenneman K. A cationic lipid-formulated plasmid DNA vaccine confers sustained antibody-mediated protection against aerosolized anthrax spores. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004;101(37):13601-6.
71. Dupuy LC, Richards MJ, Reed DS, Schmaljohn CS. Immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine against Venezuelan equine encephalitis virus aerosol challenge in nonhuman primates. Vaccine. 2010;28(46):7345-50.
72. Teimourpour R, Meshkat Z, Arzanlou M, Peeridogaheh H. DNA vaccine: The third generation vaccine. 2016.