دکتر علیرضا ترنگ، متخصص ژنتیک پزشکی،
عضو هیات علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه شمال کشور

واکسن های نسل جدید- بخش ۲

قسمت نخست این مقاله درمجله شماره ۱۱۶ (شهریور۹۴)به چاپ رسید.
ادامه مطلب را دراین شماره میخوانیم.

فرآیند تولید واکسن نوترکیب

فرآیند تولید واکسن های نوترکیب بسیار طولانی وپیچیده است. ابتدا باید ایمونوژن ترین جز میکروارگانیسم را که معمولا پروتئین ها یا گلیکوپروتئین های غشایی هستند طبق فرایند های طولانی و پیچیده شناسایی کرد. پس از آن با شناسایی محل و توالی ژن در ژنوم میکروارگانیسم اقدام به تکثیرآن بخش کرده، قطعات تکثیر شده را درون پلاسمید های ویژه کلون کرد . سپس اقدام به انتقال پلاسمیدهای نوترکیب به سلول میزبان مناسب برای تولید آن پروتئین نمود.در صورت موفقیت در تولید اقتصادی پروتئین کاندید شده برای واکسن یک بانک سلولی و یک بانک پلاسمید از سلول های نوترکیب ایجاد شده که برای مراحل بعد مورد استفاده قرار می گیرند(۳ و ۹).

مزایا و معایب واکسن های نوترکیب

از جمله مزایای این نوع واکسن های نوترکیب این است که آنتی ژن هایی که مصونیت لازم را ایجاد نمی کنند و یا پاسخ ایمنی غیر متعارف را سبب می شوند از واکسن حذف می شوند. از طرف دیگر ناقل های تهیه شده برای این منظور نه تنها امن و بی خطر هستند بلکه می توان آنها به راحتی تکثیر کرد و به آسانی ذخیره سازی کرد. قطعا استفاده از این دسته از واکسن ها به مقدار قابل توجهی از ایجاد عوارض جانبی در افراد جلوگیری می نماید. از معایب این نوع واکسن ها می توان به موارد زیر اشاره کرد:

- فرآیند ساخت و تولید ناقل های جدید که ژن های مورد نظر در آنها جایگذاری شده و به خوبی بیان شود بسیار پیچیده بوده هزینه های تولید و ایجاد این ناقل ها نیز گران تمام می شود.
- در افراد دچار ضعف سیستم یمنی استفاده از واکسن های ویروسی مهندسی شده باید با احتیاط لازم صورت گیرد(۸ و ۹).

واکسن های ژنی (DNA Vaccine)

یکی از روش های ارزشمندی که از ابتدای دهه ۱۹۹۰ به شدت مورد توجه متخصصان ایمنی شناسی قرار گرفته است قدرت ایمنی زایی تجویز پلاسمید حاوی ژن رمز کننده آنتی ژن ها موسوم به واکسن های ژنی است که نسل سوم واکسن ها را شامل می شود. نام های مختلفی مانندGenetic Vaccine،RNA Vaccine DNA Vaccine، واکسن های پلاسمیدی، Naked DNA و واکسن های پلی نوکلئوتیدی برای این نوع از واکسن ها ذکر شده است. ولی کمیته تخصصی واکسن های سازمان جهانی بهداشت در سال ۱۹۹۶ نام Nucleic Acid Vaccines را که هردو گروه واکسن های DNA و RNA را شامل می شود برای آن برگزیده است و اصطلاحات ایمن سازی ژنتیکیGenetic Immunization و DNA Immunization برای این نوع ایمن سازی به کار می رود.

واکسن های ژنی عبارت از تزریق مستقیم پلاسمید خاص حاوی ژن رمزکننده پادگن (آنتی ژن) مورد نظر است که بدلیل داشتن پروموتر خاص جدا شده از ویروس های انسانی (مانند سایتومگال) سبب القا ژن در داخل سلول ها و ارائه آن به سیستم ایمنی می شود (شکل ۱). بنابراین پروتئین نوترکیبی که برای تحریک سیستم ایمنی لازم است بجای آنکه در خارج از بدن تهیه وتجویز شود (مانند واکسن هپاتیت ب)، در داخل بدن تولید می شود. پروتئین القا شده که کاملا شکل طبیعی خود را دارد با طی مراحل مختلف سبب تحریک سیستم ایمنی هومورال و سلولی می شود. البته نقش سلول های دندرتیک در ارائه پادگن به سلول های ایمنی بسیار اساسی است. دو ویژگی اساسی واکسن های ژنی سبب توجه شدید محققان ایمنی شناسی، مراکز تحقیقاتی و صنایع واکسن سازی به

واکسن های ژنی و کاربردهای گسترده آن در عرصه های مختلف پیشگیری و درمان در پزشکی و دامپزشکی شده است :

- واکسن ژنی قدرت ایمنی زایی و حفاظت در مقابل عفونت را دارد و در عین حال عفونی نیست.
- واکسن های ژنی سبب تحریک هرسه سیستم ایمنی هومورال، سلولی و مخاطی می شود.

در واقع واکسن ژنی مشابه واکسن های ویروسی ضعیف شده که بهترین نوع واکسن های موجود هستند عمل می کند در عین حال فاقد کاستی های این واکسن ها است. این واقعیت که تجویز مقادیر اندک واکسن ژنی(در حد نانوگرم) می تواند سبب القا واکنش ایمنی بسیار قوی و پایدار شود بسیار ارزشمند است. در حالی که در مقایسه با واکسن های نوترکیب پروتئینی مقادیری در حدو ده ها میکروگرم با چند بار تزریق جهت القا چنین واکنشی مورد نیاز است.

جهت تهیه واکسن ژنی مرحله اول شناسایی آنتی ژن ایمونوژن است که در واقع در این مرحله نیز فناوری واکسن ژنی در تعیین قدرت ایمنی بخشی انواع آنتی ژن های یک عامل بیماریزا کمک می کند که به روش بررسی کتابخانه ژنی یا Genetic Library Immunistion موسوم است. پس از شناسایی، ژن مناسب به وکتور مخصوصی کلون شده و سپس مورد ارزیابی در کشت سلولی و حیوانات آزمایشگاهی از نظر تولید آنتی ژن و القا سیستم ایمنی هومورال وتولید آنتی بادی و ایمنی سلولی می شود.

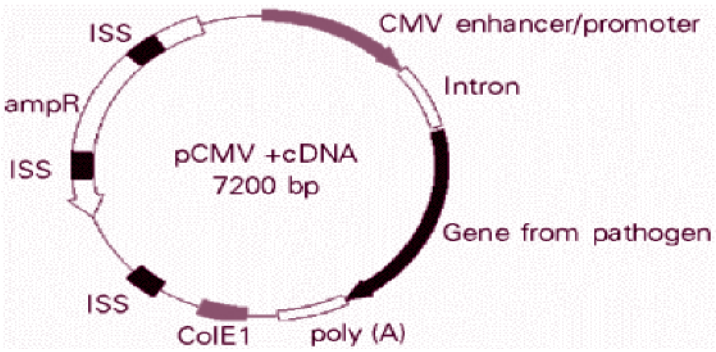
واکسن های ژنی را می توان به روش های مختلف داخل عضلانی، جلدی، زیر جلدی، خوراکی، تنفسی، مخاطی و با روش های غیر تزریقی مانند تفنگ ژنی (پرتاب ذرات ریز پوشیده با واکسن ژنی بدرون جلد) تجویز نمود که بررسی های بسیاری مزیت روش تفنگ ژنی را بر سایر روش ها نشان داده است. برای افزایش قدرت ایمنی زایی واکسن ها از انواع یاورها (ادجوانت) ومواد افزاینده ایمنی مانند اینترلوکین ها، سایتوکاین ها و یاورهای ملکولی مانند ردیف های CpG به همراه ژن مورد نظر استفاده می شود.

انواع روش های افزاینده انتقال پلاسمید به داخل سلول ها مانند لیپوزوم و پلیمر های مختلف نیز بررسی شده است. زیرا با تزریق پلاسمید خالص مقادیر بسیار اندکی وارد سلول ها می شود در حالیکه می توان با استفاده از پلیمرهای خاصی این میزان را افزایش داد(۵، ۸، ۹ و ۱۳).

توانایی ها و مزایای ویژه واکسن های ژنی:

- ✓ فاقد محدودیت های واکسن های متداول، نوترکیب پروتئینی و پپتیدی است.
- ✓ توان ایمن سازی علیه چندین سویه مختلف واجد تنوع پادگنی Antigenic Variation را دارد .
- ✓ تولید پادگن در شکل کاملا طبیعی و ارائه مناسب پادگن به سیستم ایمنی.
- ✓ تحریک ایمنی هومورال ، سلولی و مخاطی است.
- ✓ ایمنی پایدار.
- ✓ نیاز به مقدار بسیار کمتر واکسن در مقایسه با سایر واکسن ها (۱۰۰ تا ۱۰۰۰ بار کمتر).
- ✓ عدم واکنش سیستم ایمنی به وکتور تزریقی و عدم تولید پادتن علیه سلول های گیرنده وکتور، رفع مشکل پاسخ ایمنی علیه حامل زنده (واکسن های باکتریال، ویروسی زنده ویا وکتورهای ویروسی).
- ✓ فقدان مشکل امکان فعال شدن واکسن های ضعیف شده و خطر ایجاد عفونت.
- ✓ امکان تولید واکسن های چندگانه.
- ✓ سهولت و سرعت تولید انبوه ومشابه بودن مراحل تولید واکسن های مختلف(Generic)
- ✓ سهولت مراحل کنترل کیفی (GMP)
- ✓ پایداری در دماهای مختلف و عدم نیاز به زنجیره سرد جهت نگهداری.

علاوه بر کارایی این فناوری در تهیه واکسن ضد عوامل عفونی مطالعات بسیاری



شکل ۱) ساختار عمومی پلاسمید مورد استفاده در واکسن های ژنی. واحد ترجمه پلاسمید ژنی حاوی پیش برنده (پروموتر) ، اینترون، ژن رمز کننده پروتئین مربوطه و سکانس پلی آدنیله مربوط به آن (poly-adenylation (A. و سکانس های ساختمانی پلاسمید مانند منشاء تقسیم پروکاریوتی و مارکر آنتی بیوتیکی است.

جهت کاربردهای دیگر آن صورت گرفته و نتایج مطلوبی نیز کسب شده است. کاربردهای دیگر واکسن های ژنی که مورد بررسی قرار گرفته اند عبارتند از:

- پیشگیری و درمان انواع بیماری ها بخصوص انواع سرطان ها (ادنوکرسینوم، ملانوما، سرطان پروستات و سرطان روده بزرگ. درمان آلرژی و سایر بیماریهای خود ایمنی.
- درمان عفونت های ویروسی مزمن مانند HBV, HCV, HSV, HIV, HPV
- ژن درمانی
- تولید مواد اساسی سیستم ایمنی مانند پادتن های تک دودمانی (مونوکلونال)، فاکتورهای رشد و انتقال آرام داروهایی که ژن های آن ها شناسایی شده اند.
- شناسایی سریع ژن های ایمنی زا به روش Genetic Library Immunistion
- بررسی ایمنی زایی و ساختار و فعالیت پروتئین ها و پپتیدها.

واکسن های ژنی مختلفی وارد مرحله آزمایشات انسانی شده اند. واکسن ژنی ایدز با استفاده از ژن هایGag-Pol rev , Env ، فاز اول واکسن ژنی هپاتیت B، واکسن مالاریا که در نیروهای نظامی امریکا آزمایش شده است، واکسن آنفلوانزا، واکسن ضد عفونت روتا ویروسی، واکسن لمفوم سلول های T و واکسن ضد سرطان پروستات از جمله این واکسن ها است. آزمایش واکسن ژنی ضد ویروس تب برفکی، واکسن ژنی انگل تایلریا، واکسن ژنی هاری و چندین واکسن ژنی دامی نتایج بسیار موفقیت آمیزی داشته است . عوامل عفونی دیگری که واکسن ژنی برای آن ها طراحی و تحقیق شده است شامل هپاتیت C، ویروس پاپیلوما که عامل اصلی سرطان های رحمی است، ویروس هرپس، باکتری عامل سل، جذام، تیفوئید، بورلیا بورگدورفری (عامل بیماری لایم)، انگل شیستوزوما ژاپونیکوم، لیشمانیا، پلاسمودیوم یولی و مایکوپلاسما و ده ها عامل دیگر را می توان نام برد.

جنبه های عملی بررسی ایمنی زایی واکسن های ژنی

تحقیقات در عرصه واکسن های ژنی نیازمند مقدمات زیر است:

- انتخاب آنتی ژن مناسب جهت استفاده در واکسن ژنی

در صورتی که آنتی ژن مورد نظر شناخته شده و ردیف DNA یا RNA آن شناسایی شده باشد می توان با روش های مختلف اقدام به استخراج ژنوم وتهیه ژن مورد نظرکرد. در صورتی که تحقیق جهت شناسایی پادگن مناسب صورت می گیرد از روش ایمن سازی با کتابخانه ژنی GLI استفاده می شود.

- **انتخاب پلاسمید مناسب جهت پیوند ژن مورد نظر :**

انواع پلاسمیدهای القاء کننده آنتی ژن در سلول های حیوانی و انسانی موجود است . بر اساس هدف تحقیق انتخاب پلاسمید مناسب واجد پیش برنده مناسب ، مارکر آنتی بیوتیکی یا انواع مارکر های لوسیفراز، بتا گالاکتوزیداز و پروتئین های فلورسنت مانند GFP و و سایر بخش های مورد نیاز واکسن ژنی را می توان انتخاب کرد.

- **سلول مناسب جهت تولید واکسن ژنی :**

پس از تهیه پلاسمید واکسن ژنی جهت انتقال و تولید آن از سلول های مختلف E. coli مانند DH5 الفا و یا JM109 و یا سایر رده های سلولی می توان استفاده کرد.

- **تهیه مقادیر لازم از پلاسمید واکسن ژنی :**

از روش های مختلفی جهت تولید پلاسمید خالص واکسن ژنی می توان استفاده کرد. ولی به دلیل نقش آلودگی ها در کاهش میزان ترانسفکشن و تحریک سیستم ایمنی لازم است پلاسمیدی خالص عاری از پروتئین ها، اندوتوکسین ، RNA و مواد دیگر تهیه شود.

اخیرا امکان استفاده از یک DNA خالص سازی شده شامل ژن پروتئین های قادر به القای پاسخ ایمنی مناسب مطالعه شد. این غلظت های خالص سازی شده از DNA به یک پلاسمید وارد شد که به عنوان وکتور عمل می کند.سلول ها این پلاسمید ها را دریافت می کنند (فرایند دقیق آن هنوز شناخته نشده است) و سپس آن ها را به هسته وارد می کنند، که امکان بیان ژن های خارجی و تولید پروتئین را به آن ها می دهد. این پروتئین به فضای خارج سلولی آزاد می شود، جایی که سیستم ایمنی آن را به شکل عادی در هنگام ایجاد یک عفونت زمینه ای

می شناسد. بنا بر این پاسخ ایمنی بسیار موثری القا خواهد شد.

سر انجام واکسن های جدیدی به نام واکسن های anti-idiotype وجود دارند که در حال حاظر در سطح آزمایشگاهی ساخته شده اند. اساس کار این واکسن ها جایگاه شناسایی آنتی ژن آنتی بادی است. وقتی که یک آنتی ژن را وارد بدن می کنیم پاسخ هومورال به وجود می آید.

آنتی‌بادی‌های anti-idiotype قادرند هم‌آنتی‌بادی‌های‌مونوکلونال و هم پلی کلونال باشند. و می توان از آن ها به عنوان واکسن استفاده کرد. مخصوصا زمانی که به دست آوردن یا کد کردن پروتئین های ایمونوژنیک‌بسیارپیچیده‌باشد(۵، ۸، ۹ و ۱۰).

واکسن های نسل جدید چگونه عمل می کنند؟

این واکسن ها همانند واکسن های متداول عمل می کنند اما مزیت های مهمی نیز نسبت به آن ها دارند. واکسن های نسل جدید بسته به نوعشان از راه های مختلفی در مقابل سیستم ایمنی عمل می کنند. واکسن زیرواحد یا واکسن های با اساس پروتئین سنتتیک (پروتئین غیر فعال) عملکردی مشابه با واکسن های غیر فعال دارند. در حالی که معمولا به آنتی ژن های بیشتری برای القای پاسخی همسان با آن ها نیاز دارند. زیرا خاصیت آنتی ژنیک آن ها کمتر است. برترین مزیت این واکسن ها فقدان ساختار کامل عفونی است. این مشخصه در واکسن های زنده از ژنوم حذف شده یا واکسن های نوترکیبی بسیار مهم تر است. زیرا زنده هستند و با بیان آنتی ژن هایی با ویژگی های مشابه ویروس های تخفیف حدت یافته متداول ، نسبت به پروتئین های غیر فعال پاسخ ایمنی بهتری را القا می کنند(۳ و ۸).

منابع

1. Ada G. Overview of vaccines and vaccination. Molecular biotechnology. 2005;29(3):255-272.

2. Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 25th ed. New York: Mcgraw-hill; 2010.

3. Clark TG, Cassidy-Hanley D. Recombinant subunit vaccines: potentials and constraints. Developments in biologicals. 2005;121:153-163.

4. Detmer A, Glenting J. Live bacterial vaccines-a review and identification of potential hazards. Microbial cell factories. 2006;5:23.

5.Draper SJ, Heeney JL. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. Nature reviews. Microbiology. 2010;8(1):62-73.

6. Hansson M, Nygren PA, Stahl S. Design and production of recombinant subunit vaccines. Biotechnology and applied biochemistry. 2000;32 (Pt 2):95-107.

7. Kindt TJ, Kuby J. Kuby immunology. Macmillan; 2007

8. Lemaire D, Barbosa T, Rihet P. Coping with genetic diversity: the contribution of pathogen and human genomics to modern vaccinology. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica. 2012;45(5):376-385.

9.Nascimento IP, Leite LC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica. 2012;45(12):1102-1111.

10.Pincha M, Sundarasetty BS, Stripecke R. Lentiviral vectors for immunization: an inflammatory field. Expert review of vaccines. 2010;9(3):309-321.

11. Plotkin SA. Immunologic correlates of protection induced by vaccination. The Pediatric infectious disease journal. 2001;20(1):63-75.

12. Roland KL, Tinge SA, Killeen KP, Kochi SK. Recent advances in the development of live, attenuated bacterial vectors. Current opinion in molecular therapeutics. 2005;7(1):62-72.

13. Shata MT, Stevceva L, Agwale S, Lewis GK, Hone DM. Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. Molecular medicine today. 2000;6(2):66-71.