واکسن‌های نوکلئیک اسیدی برای ویروس پاپیلومای انسان؛ پیشگیری یا درمان

دکتر سولماز منیری جوادحصاری[1*]، سپهر پورسیف[2]، کیوان خاکپور[2]

۱. استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۰ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۰۷/۰۷

خلاصه

مقدمه: سرطان رحم، چهارمین سرطان رایج در زنان می‌باشد. تقریباً در تمامی موارد این سرطان، ابتلاء به انواع ویروس پاپیلومای انسانی با خطر بالا به‌خصوص تیپ‌های ۱۶ و ۱۸ مشاهده می‌شود. این ویروس عامل ایجاد سرطان‌های دیگری نظیر اوروفارنکس، آنورکتال و همچنین پوست نیز می‌باشد. مطالعه مروری حاضر با هدف بررسی واکسن‌های موجود و در حال توسعه برای پیشگیری یا درمان HPV انجام شد.

روش‌کار: در این پژوهش مروری، کلمات کلیدی HPV، سرطان سرویکس، DNA واکسن، RNA واکسن، پیشگیری و درمان آلودگی با HPV در پایگاه‌های PubMed، Science direct، Scopus و Google Scholar در بازه زمانی سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۸ مورد جستجو قرار گرفتند. مقالات انگلیسی به‌روز و چاپ شده در مجلات چارک اول، در اولویت قرار گرفتند و مقالات دارای اطلاعات ناقص و نامرتبط از مطالعه حذف شدند.

یافته‌ها: با وجود واکسن‌هایی برای پیشگیری از ابتلاء به HPV، تحقیقات بر روی ارائه واکسن بهتر بر علیه این ویروس ادامه دارد، زیرا واکسن‌های موجود از تمامی تیپ‌های پرخطر ویروس پیشگیری نمی‌کنند. همچنین بر روی افراد مبتلا و دارای ناهنجاری‌های حاصل از ویروس و یا سرطان تأثیری ندارند. از راهکارهای امیدبخش، واکسن‌هایی بر اساس نوکلئیک‌اسیدها (DNA یا RNA) می‌باشند.

نتیجه‌گیری: نوکلئیک‌اسید واکسن‌ها دارای نتایج امیدوارکننده‌ای به دلیل امن بودن، پایداری، راحتی در تولید و توانایی ایجاد ایمنی اختصاصی می‌باشند. در حال حاضر واکسن‌های GX-188E، VGX-3100، ZNF–603 و ZNF -758 بر علیه ژن‌های E6 و E7 ویروس در فاز کلینیکی موفق عمل کرده‌اند و امیدهایی برای یک واکسن درمانی برای افراد آلوده به ویروس یا مبتلا به سرطان ایجاد کرده اند.

کلمات کلیدی: سرطان دهانه رحم، واکسن‌های درمانی، واکسن‌های DNA، واکسن‌های RNA، ویروس پاپیلومای انسانی

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر سولماز منیری جوادحصاری؛ دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. **تلفن:** ۰۴۱-۳۷۲۳۶۴۹۳؛ **پست الکترونیک:** solmazmoniri@gmail.com

مقدمه

سرطان گردن رحم، هفتیمن سرطان رایج دنیا و چهارمین سرطان رایج در بین زنان سراسر جهان است (۱) که سالیانه ۵۲۸۰۰۰ فرد به آن مبتلا شده و جان ۲۲۶۰۰۰ نفر را در دنیا می‌گیرد. ارتباط ویروس پاپیلومای انسانی (HPV)[1] با ابتلاء به این سرطان به‌خوبی شناخته شده است (۲). این ویروس معمولاً بافت‌های مخاطی و پوستی ناحیه تناسلی را درگیر کرده و منجر به ایجاد زخم یا زگیل در این بافت‌ها می‌شود که بر توانایی HPV در ایجاد تمایز سلولی در میزبان خود دلالت می‌کند (۳). آلودگی به این ویروس اغلب توسط سیستم ایمنی بدن در طول ۲-۱ سال از بین می‌رود، ولی در ۲۰-۱۰٪ موارد که فرد به انواع مقاوم و با خطر بالای[2] ویروس مبتلا می‌شود، می‌تواند به سرطان‌های گردنه رحم، مقعدی و تناسلی[3] یا سر و گردن[4] منتهی شود (۴، ۵).

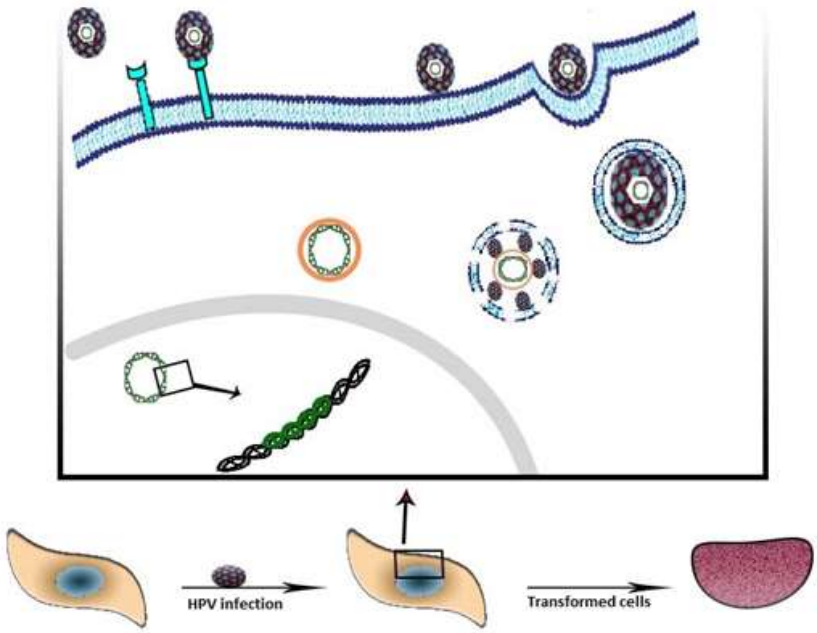
این ویروس‌ها به خانواده پاپیلوما[5] تعلق داشته و دارای اندازه کوچک (۵۵-۵۲ نانومتر)، DNA دورشته‌ای (dsDNA) با ۸۰۰۰ جفت باز، بدون پوشش، دارای کپسید ۲۰ وجهی[6] و اپیتلیوتروپیک هستند که بیشتر بافت‌های مخاطی و پوستی را در ناحیه تناسلی مهره‌داران درگیر می‌کنند (۳). بیش از ۲۰۰ ژنوتیپ از HPV شناخته شده است که از نظر کشندگی و سرطان‌زا بودن به دو دسته با خطر پایین[7] و خطر بالا تقسیم‌بندی می‌شوند. از تیپ‌های با خطر پایین می‌توان به ۶، ۱۱، ۴۰، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۵۴، ۶۱ و ۷۲ اشاره کرد که مسئول ایجاد زگیل در نواحی مختلف بدن هستند. همچنین تیپ‌های ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۹ در گروه پرخطر این ویروس قرار دارند که به سرطان‌های مربوطه به‌خصوص در ناحیه گردنه رحم زنان منجر می‌شوند. تیپ‌های پرخطر ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی، عامل ایجاد ۷۰٪ سرطان‌های گردنه رحم بوده و از اهمیت بالایی برخوردارند. تیپ ۱۶ ویروس نسبت به تیپ ۱۸ تهاجمی‌تر بوده و شیوع بیشتری در سطح جهانی دارد (۲، ۶، ۷). ژنوم تمامی ویروس‌های پاپیلوما تقریباً دارای ۸ چارچوب خواندن باز[8] (ORF) است که در سه ناحیه قابل دسته‌بندی است: ناحیه اولیه[9] شامل پروتئین‌های E1، E2، E4، E5، E6 و E7 می‌باشد که برای رونویسی ویروس ضروری هستند. در این میان، پروتئین‌های E5، E6 و E7 تومورژنیک بوده و بسیاری از مطالعات به منظور تهیه واکسن درمانی بر روی آنها متمرکز است. ناحیه تأخیری[10] شامل پروتئین‌های فاز نهایی L1 و L2 است که پروتئین‌های ساختاری ویروس می‌باشند و واکسن‌های موجود برای پیشگیری از آلودگی به HPV در حال حاضر از قطعه‌ای از این بخش تهیه شده‌اند. بخش سوم ژنوم شامل یک توالی غیرکد شونده به نام ناحیه‌ی کنترلی بلند[11] (LCR) است که به نظر می‌رسد در رونویسی نقش دارد (۳، ۸).

ابتلاء به ویروس پاپیلومای انسانی معمولاً در ناحیه اپی‌تلیالی خراش‌دیده رخ می‌دهد و ناحیه گردنه رحم بسیار مستعد ابتلاء به انواع با خطر بالای ویروس پاپیلومای انسانی می‌باشد. عفونت به‌صورت منطقه‌ای در حد آلودگی چند سلول اطراف ناحیه زخم یا سایش رخ می‌دهد و تا مدتی بدون نشانه در همانجا باقی می‌ماند. در مرحله ابتدایی، ویروس توسط پروتئین L1 به هپارین سولفات پروتئوگلیکان‌های غشاء سلول اپی‌تلیوم میزبان در ناحیه خراش یا سایش متصل می‌شود. این اتصال باعث ایجاد تغییر ساختاری در کپسید ویروس و نمایان شدن انتهای آمینوی L2 ویروس می‌شود که توسط فورین خارج سلولی برش می‌خورد که این عمل پیش‌نیاز پذیرش ویروس است. پذیرش ویروس به درون سلول میزبان توسط ویزیکول اندوزومی صورت گرفته و توسط L1 میانجی‌گری می‌شود. هنگام ورود ویروس به سلول، L2 برای آلودگی ضروری می‌باشد. با هضم L1 درون اندوزوم، L2 فرار ژنوم ویروس را به همراه خود

[1] Human PapillomaVirus
[2] High risk
[3] Anogenital
[4] Head and Neck
[5] Papillomaviridae
[6] Icosahedral
[7] Lowrisk

[8] Open Reading Frame
[9] Early region
[10] Late region
[11] Long Control Region

در قالب یک کمپلکس به شبکه ترنس گلژی میانجی-گری می‌کند. ورود کمپلکس L2 به همراه ژنوم ویروس به درون هسته به چرخه سلولی بستگی داشته و در زمان میتوز که غشای هسته از هم باز می‌شود، رخ می-دهد (شکل ۱).



شکل ۱- آلودگی سلول اپی‌تلیال توسط ویروس پاپیلومای انسانی و وارد شدن ژنوم HPV به درون ژنوم میزبان

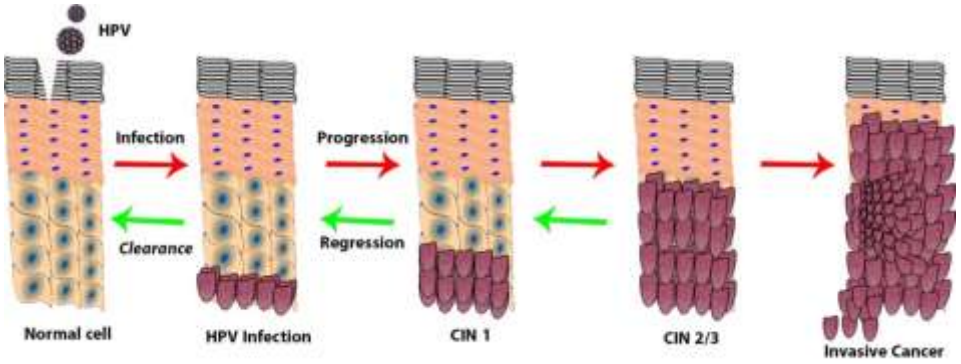
پس از ورورد به درون هسته، پروتئین‌های اولیه E1 و E2 به کمک ماشین رونویسی DNA میزبان رونویسی می‌شوند. پروتئین E2 ویروس با اتصال به توالی‌های مجاور منشأ همانندسازی منجر به همانندسازی DNA ویروسی می‌شوند. این پروتئین همچنین در فعال‌سازی یا مهار بیان LCR ویروسی و به عنوان فاکتور تفکیک[1] تفکیک[1] ویروس نقش ایفا می‌کند که با اتصال همزمان همزمان به DNA ویروسی و کروماتین میزبان در تقسیم میتوز، حضور DNA ویروسی در هسته سلول دختری را ممکن می‌سازد. پروتئین E2 در تنظیم رونویسی از ژن‌های E6 و E7 نیز نقش دارد که پروتئین‌های حاصل با تجزیه عوامل سرکوب کننده توموری مانند p58 و p21، باعث تکثیر بیش از حد سلول‌ها می‌شوند. در فاز تولیدی چرخه زندگی، ویروس به منظور دسترسی به فاکتورهای رونویسی میزبان کراتینوسیت‌های میزبان را وارد فاز S چرخه سلولی می‌نماید. به این منظور، ویروس از سه آنکوپروتئین E5، E6 و E7 کمک می‌گیرد. بیان E5 باعث افزایش سیگنال‌های فاکتور رشد برای گیرنده‌های خاص فاکتور رشد اپیدرمی برای خروج از مراحل G0-G1 تمایز سلولی می‌شود. E6 با اتصال و فعال کردن هضم پروتئازومی P53 و فاکتورهای پروآپوپتوتیک دیگر و همچنین پروتئین E7 نیز با اتصال به چندین پروتئین سرکوب کننده دیگر مانند p21، منجر به جلوگیری از فعال شدن مسیر آپوپتوز می‌شوند (۴، ۹-۱۱). حاصل آلودگی مداوم به این ویروس در صورتی که سیستم ایمنی توان مقابله با آن را نداشته باشد، نشانگان بافتی است که به آن نئوپلازی بافت پوششی سنگفرشی (SIL)[2] اتلاق می‌شود و در ناحیه گردنه رحم به آن نئوپلازی بافت پوششی سرویکس (CIN)[3] می‌گویند.

[1]Segregation factor

[2]Squamous intraepithelial neoplasia

[3] Cervical Intraepithelial Neoplasia

CIN دارای سه سطح CIN1، CIN2 و CIN3 می‌باشد که مقدمه‌ای بر سرطان است. تنها در موارد معدودی CIN1 به CIN2-3 پیشرفت می‌کند که روش معمول در این صورت، برداشتن بافت توسط جراحی است (۴، ۱۱) (شکل ۲). در این مطالعه مرور کوتاهی به واکسیناسیون پیشگیری کننده ویروس پاپیلومای انسانی داشته و سپس به اسیدنوکلئیک واکسن‌ها خواهیم پرداخت که به عنوان گروهی از واکسن‌ها در زمینه درمان این بیماری پس از ابتلاء در دست مطالعه هستند.



شکل ۲- مراحل ایجاد سرطان توسط ویروس پاپیلومای انسانی. HPV از راه زخم یا ساییدگی توسط فردی به فرد دیگر وارد سلول میزبان می‌شود. پس از ایجاد آلودگی، ویروس طی ۲-۱ سال می‌تواند توسط سیستم ایمنی پاک‌سازی شده و از بین برود. در صورت ناتوانی سیستم ایمنی در پاک‌سازی ویروس، آلودگی پیشرفت نموده و به CIN منجر می‌شود که بر اساس شدت تظاهرات درجه‌بندی می‌شوند. ادامه پیشرفت این روند می‌تواند به سرطانی شدن سلول‌ها ختم شود.

روش‌کار

این مطالعه مروری، به منظور بررسی واکسن‌های موجود و واکسن‌های در حال تحقیق به منظور پیشگیری از ابتلاء به ویروس پاپیلومای انسانی یا درمان ضایعات حاصل از آلودگی با ویروس انجام گرفت و به‌طور ویژه بر روی واکسن‌های بر مبنای نوکلئیک اسیدها تمرکز نمود. ابتدا کلمات کلیدی "Human Papilloma Virus"، "Cervix cancer"، "DNA Vaccine"، " RNA Vaccine" و "prevention or treatment of HPV infection" در پایگاه‌های معتبر علمی شامل PubMed، Science direct، Scopus و Google Scholar مورد جستجو قرار گرفت. مقالات به زبان اصلی انگلیسی که در سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۸ در مجلات معتبر به ویژه مجلات چارک اول به چاپ رسیده بودند، انتخاب شده و پس از مطالعه عنوان و چکیده مقالات، تعداد ۴۲ مقاله در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. از سوی دیگر مقالاتی که در مجلات چارک سوم یا چهارم به چاپ رسیده بودند و مقالات دارای مطالب ناقص یا غیرمرتبط کنار گذاشته شدند. جهت رسم شکل‌های موجود در این مطالعه، موضوعات مربوط به هر شکل از مقالات مختلف جمع‌بندی شده و با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ طراحی گردید.

یافته‌ها و بحث

۱- واکسن‌های پیشگیری کننده

در حدود سال ۱۹۹۰ مشخص شد که بیان نوترکیب L1 در برخی از ذرات شبه‌ویروسی که از ژنوم ویروسی استخراج شده‌اند و از نظر ایمونولوژیکی به ویریون‌های اصلی تشابه دارند، می‌توانند در تهیه واکسن مورد استفاده قرار گیرند که بعدها با نام تجاری Cervarix شناخته شد. امروزه سه واکسن ضد ویروس پاپیلومای انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ Cervarix که شامل ذرات شبه‌ویروسی (VLPs) تیپ‌های ۱۶ و ۱۸ است، Gardasil که ذرات شبه‌ویروسی تیپ‌های ۱۶، ۱۸، ۶ و ۱۱ را در بردارد و Gardasil 9 که شامل ذرات شبه‌ویروسی تیپ‌های ۶، ۱۱، ۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۴۵، ۵۲ و ۵۸ هستند (جدول ۱). با اینکه این واکسن‌ها در

پیشگیری از ابتلاء به تیپ‌های با خطر بالای ویروس پاپیلومای انسانی نتایج بسیار خوبی نشان داده‌اند، در زمینه از بین بردن عفونت در افراد مبتلا موفق نبوده‌اند. در واقع این واکسن‌ها پروتئین‌های L1 کپسیدی را مورد هدف قرار می‌دهند که در سلول‌های پایه‌ای اپی‌تلیال فرد مبتلا به ویروس پاپیلومای انسانی بیان نمی‌شوند (۲، ۸، ۱۲-۱۶).

جدول ۱- مشخصات واکسن‌های موجود جهت پیشگیری از ابتلاء به HPV

نام واکسن	آنتی‌ژن	سیستم بیانی	ادجوانت	شرکت تولید کننده
Cervarix	L1 VLP of HPV-16 and HPV-18	BEVS	Aluminiumhydroxide andMPL	GSK
Gardasil	L1 VLP of HPV-6،HPV-11، HPV-16and HPV-18	Yeast	AHSS	Merck
Gardasil 9	L1 VLP of HPV-6، HPV-11، HPV-16، HPV-18، HPV-31، HPV-33، HPV-45،HPV-52 andHPV-58	Yeast	AHSS	Merck

۲- واکسن‌های درمانی

پس از ادغام ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی با ژنوم میزبان در فازهای پیشرفته آلودگی، به دلیل عدم نیاز به پروتئین‌های L1 و L2، واکسن‌های پیشگیری کننده اثربخشی خود را از دست می‌دهند، بنابراین استفاده از آنها پس از ابتلاء افراد، سودبخش نخواهد بود و جای خالی یک واکسن به منظور درمان افراد مبتلا همچنان باقی می‌ماند (۱۷). از این رو، در مبحث تولید واکسن‌های درمانی، محققان سعی در هدف قرار دادن پروتئین‌های فاز اولیه به‌خصوص E6 و E7 دارند. این پروتئین‌ها برای سرطانی شدن سلول لازم می‌باشند و امکان بیان نشدن آنها وجود ندارد. بنابراین، تنها در سلول‌های آلوده‌ای که سرطانی شده‌اند، یافت می‌شوند. به علاوه، این پروتئین‌ها تحمل ایمنی[1] نیز ایجاد نمی‌کنند. بر این اساس، در حال حاضر واکسن‌های متفاوتی در حال بررسی هستند که از انواع آنها می‌توان به پپتید یا پروتئین واکسن‌ها، واکسن‌هایی بر اساس وکتورهای زنده، نوکلئیک‌اسید واکسن‌ها، واکسن‌های مبتنی بر سلول، واکسن‌های تهیه شده از سلول‌های سرطانی و همچنین واکسن‌های ترکیبی از چند روش اشاره کرد. در این مطالعه حاضر مروری بر نوکلئیک اسید واکسن‌ها، ضعف‌های آنها و راه‌های مقابله با این ضعف‌ها پرداخته می‌شود (۱۸، ۱۹).

۳- نوکلئیک‌اسید واکسن‌ها

۳-۱. DNA واکسن‌ها

نوکلئیک‌اسید واکسن‌ها، گزینه مناسبی به منظور تهیه واکسن درمانی هستند؛ چراکه آنها ایمن، پایدار و با قابلیت ایجاد تیتر مناسب از آنتی‌ژن درون سلول هستند (۲۰). DNA واکسن‌ها به عنوان یکی از رویکردهای قابل توجه در زمینه تولید واکسن درمانی برای ویروس پاپیلومای انسانی می‌باشند که به صورت برهنه[2] دارای ضعف‌هایی از جمله عدم توانایی پخش شدن در بین سلول‌ها و عدم ایجاد ایمنی سلولی قوی هستند، اما با تزریق DNA پلاسمیدی کدکننده آنتی‌ژن مورد نظر (معمولاً E6 و E7 مدنظر هستند) به درون سلول میزبان، می‌توان آنها را وارد میزبان نمود (۲، ۲۱). در برخی موارد روش تزریق این واکسن‌ها به‌صورت عضلانی (IM)[3] است که در این صورت معمولاً میوسیت‌ها[4]، سلول‌های گیرنده DNA می‌باشند. سلول‌های میوسیت قادر به ارائه آنتی‌ژن هستند، ولی یک سلول ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (APC)[5] ماهر به شمار نمی‌روند، در نتیجه واکنش ایمنی قوی را به‌وجود نمی‌آورند. از سوی دیگر، می‌توان سلول‌های دندریتیک را که APC ماهری هستند، مورد هدف قرار داد تا واکنش ایمنی مناسبی

[1] immune tolerance

[2] Naked DNA
[3] Intra muscular
[4] myocytes
[5] Antigen presenting cells

مشاهده نمود. مکانیسم عمل این واکسن‌ها، ارائه آنتی‌ژن بیگانه به سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن است که باعث فعالیت سلول‌های T،+CD4 و +CD8 می‌شود و در ادامه لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (CTL)[1] را فعال و باعث تولید آنتی‌بادی می‌شود. در مقایسه با وکتورهای زنده ویروسی یا باکتریایی، پلاسمید DNA برهنه[2] به عنوان واکسن ایمن بوده و می‌توان به‌راحتی آن را تهیه و در دسترس قرار داد (۱۸). این واکسن‌ها در مقایسه با RNA واکسن‌ها، ارزان و پایدار بوده، محدودیت دوزی به دلیل امکان ایجاد سمیت را ندارند و آنتی‌ژن‌ها را در درون سلول برای مدت زمان بیشتری نسبت به RNA و پروتئین یا پپتید واکسن‌ها بیان می‌کنند (۲۲). یکی از مزیت‌های DNA واکسن‌ها این است که می‌توان چندین قطعه DNA را در یک پلاسمید قرار داده و بدین طریق چندین آنتی‌ژن را بر روی یک پلاسمید ارائه کرد. علاوه بر آن، DNA واکسن‌ها به راحتی قابل تولید در میزان بالا با خلوص و پایداری مناسب بوده و می‌توان آنها را برای بیان پروتئین یا پپتید ضدتوموری نیز به‌کار برد. در نتیجه، DNA واکسن قادر به بیان بلندمدت آنتی‌ژن‌ها و قدرتمندسازی خاطره ایمنی سلولی می‌باشد. همچنین، استفاده از DNA واکسن‌ها، توانایی گذر از محدودیت بیان MHCها و در نتیجه ارائه MHCهای کلاس I[3] متفاوت برای بیماران مختلف را فراهم می‌نماید. برخلاف واکسن‌های بر اساس وکتور زنده، می‌توان DNA واکسن‌ها را به طور ایمن و مؤثر به‌طور مرتب به بیمار ارائه نمود. یک نگرانی در رابطه با DNA واکسن‌ها، امکان ادغام ژن‌های E7 و E6 با DNA میزبان و سرطان‌زایی می‌باشد که تاکنون آزمایش مثبتی از این نظر گزارش نشده است (۲، ۱۸). به دلیل اینکه واکنش ایمنی اکتسابی[4] به منظور اثربخشی واکسن مورد نیاز است، مورد هدف قرار دادن سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن، به‌خصوص سلول‌های دندرتیک به‌عنوان هدف DNA واکسن‌ها نقش کلیدی ایفا می‌کند؛ چراکه آنها پل ارتباطی برهم‌کنش‌های بین ایمنی ذاتی و اکتسابی

[1] Cytotoxic T Lymphosytes
[2] naked DNA plasmid
[3] MHC class I
[4] adaptive immune response

می‌باشند. به همین دلیل، استراتژی‌های متفاوتی به منظور افزایش توان DNA واکسن‌های ویروس پاپیلومای انسانی مورد استفاده قرار گرفته است که بیشتر سلول‌های دندرتیک را هدف اصلی قرار داده‌اند (۲۳). در ادامه استراتژی‌هایی که به منظور تقویت این دسته از واکسن‌ها و مقابله با ضعف‌های آنها بیان شده‌اند، بیان خواهیم شد.

۳-۱-۱. وارد کردن آنتی‌ژن به درون سلول هدف

اثربخش بودن تزریق به درون سلول، میزان اثربخشی DNA واکسن را تعیین می‌کند. بنابراین، روش‌های مختلفی به منظور تزریق DNA به درون سلول مورد مطالعه قرار گرفته است تا اثربخشی و قدرت این دسته از واکسن‌های درمانی را به حداکثر برساند. این رویکردها شامل تزریق درون پوستی (ID)[5] و یا زیرپوستی[6] توسط توسط تفنگ ژنی، تزریق درون ماهیچه‌ای از طریق منافذ ایجاد شده توسط شوک الکتریکی[7]، تزریق مخاطی[8]، تزریق درون پوستی همراه با تیمار لیزری[9] و یا انتقال بر بر اساس سیستم‌های نانوذرات و میکروسفرها[10] می‌باشد (۱۷) (شکل ۳).

تزریق به درون سلول‌های پوستی یا سلول‌های واقع در زیر پوست به وسیله تفنگ ژنی:

تفنگ ژنی یک ابزار ترانسفکشن بیولوژیکی پرتابی و با سرعت بالاست که می‌تواند DNA قرار گرفته بر روی یک ذره با اندازه کوچک‌تر از سلول (مانند دانه‌های طلا) را به‌طور مستقیم وارد سلول کند. در رویکرد درون‌پوستی، تزریق به درون سلول‌های کراتینوسیت یا سلول‌های دندرتیک اپیدرمی صورت می‌گیرد که در نهایت سلول‌های دندرتیک در ناحیه پوستی بالغ شده و به بافت لنفوئیدی مهاجرت می‌کنند تا آنتی‌ژن‌های ویروس پاپیلومای انسانی را به سلول‌های T اختصاصی ارائه دهند. مطالعات نشان داده‌اند که تزریق توسط تفنگ ژنی اثربخشی دوزی بیشتری نسبت به تزریق‌های رایج

[5] intradermal
[6] subdermal
[7] electroporation-mediated intramusculal
[8] mucosal administration
[9] intradermal administration followed by laser treatment
[10] microsphere / nanoparticle-based delivery systems

مانند تزریق درون‌ماهیچه‌ای توسط سرنگ دارد. با این وجود، تفنگ‌های ژنی نباید الزاماً ایمنی‌زایی و یا اثر ضدتوموری قوی‌تری نیز داشته باشند (۱۷). یک آزمایش کلینیکی که توسط آزمایشگاه ملی وکتور ژنی (NGVL)[1] در رابطه با روش‌های متفاوت ارائه واکسن پلاسمیدی انجام شد، نشان داد که استفاده از تفنگ ژنی برای واکسن پلاسمیدی pNGVL4a-CRT/E7(detox) تحمل ایمنی مناسبی را ایجاد می‌کند، اما اثربخشی مناسبی به‌عنوان یک واکسن درمانی مورد استفاده در ضایعات حاصل از ویروس پاپیلومای انسانی در مقایسه با تزریق درون ماهیچه‌ای DNA واکسن برهنه ندارد (۲۴).

تزریق درون ماهیچه‌ای و یا ارائه مخاطی همراه با شوک الکتریکی

میزان تأثیرگذاری انتقال DNA از طریق جریان ولتاژ کم در این روش، در مقایسه با تزریق معمولی به درون ماهیچه افزایش می‌یابد؛ به این‌صورت که جریان ولتاژ پایین باعث ایجاد ترک‌های کوچکی در غشای سلول می‌شود که پلاسمید می‌تواند از طریق آن وارد سلول شود. در این فرآیند ممکن است برخی سلول‌ها کشته شده و یا آسیب ببینند. در هر حال آزادسازی سیگنال‌های خطر عفونت باعث فراخوانی سلول‌های ایمنی بیشتری به محل تولید آنتی‌ژن می‌شود که منجر به ارائه آنتی‌ژن بیشتر و در نتیجه پاسخ ایمنی قوی و مؤثرتر می‌شود. ایجاد هر دو واکنش ایمنی سلولی و ایمنی هومورال در شرایط درون‌تنی[2]، حتی با استفاده از میزان پایین DNA همراه با شوک الکتریکی اثبات شده است. در یک مطالعه قبل از فاز کلینیکی، ارائه واکسن pNGVL4a-CRT/E7(detox) به همراه شوک الکتریکی، بیشترین میزان تولید آنتی‌ژن ویروس پاپیلومای انسانی را برای فعال‌سازی +CD8 و فعالیت ضدتوموری نسبت به تزریق درون ماهیچه‌ای معمول و تزریق اپیدرمی توسط تفنگ ژنی نشان داد (۲۵). در یک آزمایش جدیدتر، شوک الکتریکی سطوح مخاطی را نیز مورد هدف قرار داد که می‌تواند پتانسیل درمانی برای بیماری‌های درگیر کننده مخاط مانند HPV و HIV داشته باشد. از شوک الکتریکی برای ارائه GX188E (یک پلاسمید دارای قطعات E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۸ و ۱۶ متصل به تیروزین کیناز شبه FMS یا Flt3L) در فاز تحقیقاتی اول و دوم، ارائه VGX-3100 (مخلوطی از دو پلاسمید کد کننده توالی مورد توافق اپتیمایز شده برای قطعات E6 و E7 تیپ‌های ۱۶ و ۱۸ ویروس است) در فاز تحقیقاتی اول، دوم و سوم و همچنین ارائه INO-3106 (یک پلاسمید کد کننده قطعات E6 و E7 از ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۶) در فاز تحقیقاتی اولیه استفاده شده است که اثرات سوئی در مطالعات اولیه دو واکسن GX-188E و VGX-3100 مشاهده نشد (۱۷).

ارائه درون‌پوستی همراه با تیمار لیزری[3]

این روش تکنیکی است که از اشعه لیزر کم‌انرژی برای افزایش نفوذپذیری بدون آسیب رساندن به بافت سلولی استفاده می‌کند و برای افزایش میزان پذیرش ساختارهای DNA برهنه به‌کار رفته است. استفاده از روش ID همراه با این تکنیک، واکنش سیستم ایمنی سلولی را در مدل‌های قبل از فاز کلینیکی نشان داده است. با این حال در رابطه با بیماری‌های مرتبط با ویروس پاپیلومای انسانی، مطالعه‌ای انجام نشده است که می‌تواند پتانسیل خوبی به عنوان روش درمانی برای مقابله با ویروس پاپیلومای انسانی باشد (۱۷، ۲۶).

سیستم‌های ارائه بر اساس میکروسفرها و نانوذرات

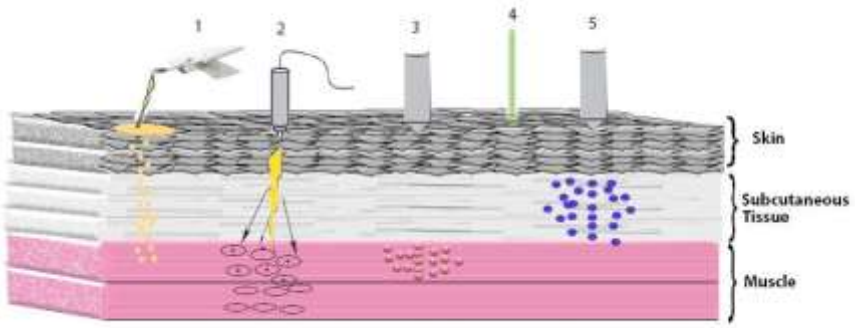
میکروسفرها و نانوذرات شامل مواد زیستی تجزیه‌پذیر و پلیمرهای زیست‌سازگاری[4] هستند که DNA را احاطه کرده و از اثر نوکلئازها در امان نگه می‌دارند و همزمان هدف‌های مناسبی برای فاگوسیته شدن توسط سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن هستند (۱۷). در فاز اولیه تحقیقاتی واکسن ZYC101 (یک پلاسمید کد کننده چندین آنتی‌ژن لوکوسیت انسانی است که قطعه E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ را احاطه کرده است) در بیمارن دارای درجات بالای CIL[5]، تحمل ایمنی مناسبی مشاهده شد و درنتیجه آن، تولید اینترفرون گاما

[1] National Gene Vector Laboratory
[2] In vivo
[3] Femtosecond laser poration
[4] biocompatible polymers
[5] Cervical intraepithelial lesions

نوع C به‌مدت ۶ ماه پس از تزریق اولیه مشاهده شد (۲۷). شکل جدیدی از این دارو با نام ZYC101a که دارای پلاسمید کدکننده قطعات E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ و ۱۸ است، در فاز دو و سه تحقیقات کلینیکی بر روی بیماران دارای CIN2/3، نتایج قوی‌تری بر روی زنان جوان‌تر از ۲۵ نسبت به گروه‌های دیگر داشت (۲۸).

سایر سیستم‌های ممکن برای ارائه

PEI600-Tat از اتصال دمین بازی پروتئین Tat از HIV تیپ I و پلی‌اتیلن ایمین (PEI) به‌دست می‌آید که وزن مولکولی پایینی داشته و به عنوان یک وکتور غیرویروسی توانا در زمینه ارائه مؤثر ژن به سلول میزبان معرفی شده است. در یک مطالعه که قطعه E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ به همراه PEI600-Tat با نسبت ۵۰ به ۱۰ در موش آزمایش شده بود، واکنش ایمنی هومورال و سلولی قوی نسبت به ارائه بدون PEI600-Tat مشاهده شد (۱۲، ۲۲-۱۶).



شکل ۳- روش‌های مختلف ارائه نوکلئیک اسید واکسن‌ها به درون سلول هدف. ۱- تزریق به درون سلول‌های پوستی یا سلول‌های واقع در زیر پوست به وسیله تفنگ ژنی ۲- تزریق درون ماهیچه‌ای و یا ارائه مخاطی همراه با شوک الکتریکی ۳- تزریق درون ماهیچه‌ای واکسن محصور شده در کپسول‌های بر اساس میکروسفرها و نانوذرات ۴- ارائه درون‌پوستی همراه با تیمار لیزری (Femtosecond laser poration) ۵- روش‌های جدید ارائه واکسن برای تقویت کارایی DNA واکسن نظیر تزریق زیرپوستی واکسن مخلوط شده با PEI600-Tat. این روش‌ها به منظور تقویت دریافت آنتی‌ژن توسط سلول‌های دندریتیک توسعه یافته‌اند تا پاسخ ایمنی سلول‌های T را از طریق هر دو نوع +CD4 و +CD8 سلوهای T تقویت نمایند.

۱-۲. گسترش بین سلولی آنتی‌ژن‌های ویروس پاپیلومای انسانی به سلول‌های دندریتیکی:

به منظور ایجاد واکنش سلولی توسط سلول‌های T، ورود آنتی‌ژن‌های ویروس پاپیلومای انسانی به سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (APCs)[1] بسیار حائز اهمیت می‌باشد. از آنجایی که در شرایط درون‌تنی، آنتی‌ژن‌ها به راحتی بین سلول‌ها گسترش پیدا نمی‌کنند، یکی از راه‌حل‌های فائق آمدن بر این مشکل، اتصال آنتی‌ژن به پروتئین‌هایی مانند VP22 از ویروس herpes simplex virus type 1 (HSV-1) است. هنگامی که این پروتئین به پروتئین‌های دیگری مانند GFP، p53 یا EGFP به عنوان یک کایمر پلی‌پپتیدی متصل شود، می‌تواند بین سلول‌ها گسترش یافته و در هسته سلول تجمع یابد (۱۷). اگرچه نتایج دسته‌ای از مطالعات انجام شده حاکی از عدم قابلیت عبور از غشای سلولی توسط VP22 بوده است (۲۹، ۳۰)، دسته دیگری از مطالعات حاکی از تولید بیشتر آنتی‌ژن‌های اختصاصی ویروس پاپیلومای انسانی توسط +CD8 در صورت اتصال آنتی‌ژن E7 ویروس پاپیلومای انسانی به پروتئین VP22 در مدل‌های موشی بوده است. مطالعه میشل و همکاران (۲۰۰۲) نشان داد زمانی که ژن E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ به پروتئین VP22 متصل و به‌عنوان یک DNA واکسن در یک توالی قرار داده شود، تزریق آن به مدل موشی واکنش سیستم ایمنی سلولی تقویت

[1] Antigene presenting cells

شده‌ای نسبت به واکسیناسیون با DNA واکسن فاقد VP22 ایجاد می‌کند (۳۱، ۳۲).

۳-۱-۳. هدف قرار دادن مستقیم سلول‌های دندرتیک جهت ارائه آنتی‌ژن

علی‌رغم گسترش بین‌سلولی آنتی‌ژن‌ها، یکی از رویکردهای ممکن برای ایجاد واکنش ایمنی سلولی قوی، هدف قرار دادن مستقیم سلول‌های دندرتیک برای ارائه آنتی‌ژن‌ها می‌باشد. به این منظور، می‌توان آنتی‌ژن‌ها را به مولکول‌های متصل‌شونده به سلول‌های دندرتیکی مانند HSP70 که یک پروتئین شوک حرارتی است، یا CTLA4[1] متصل نمود (۱۷). DNA واکسن pNGVL4a-Sig/E7(detox)/HSP70 که یک پلاسمید بیان کننده فرم سم‌زدایی شده قطعه E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ متصل به HSP70 می‌باشد، در فاز ۱ و ۲ کلینیکی در بیماران دارای آسیب‌های CIN2/3 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ پتانسیل درمانی از خود نشان داده است؛ به‌طوری‌که در مطالعه تریمبل و همکاران (۲۰۰۹)، ۳ نفر از ۹ نفر تقریباً به‌طور کامل درمان شدند (۳۳). همچنین ترکیب آن با TA-HPV که یک واکسن نوترکیب ویروسی کدکننده قطعات E6 و E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ است، به میزان ۵۷٪ در ایجاد واکنش ایمنی سلولی موفقیت‌آمیز بود. همچنین DNA واکسن pCTLA4-E7E6 هنگام تزریق به موش دارای تومور TC-1، میزان بالاتری از آنتی‌بادی E6 و E7 را در مقایسه با نوع فاقد CTLA4 ایجاد نمود (۱۷، ۲۴).

۴-۱-۳. تقویت آزادسازی آنتی‌ژن‌های ویروس پاپیلومای انسانی به محیط اطراف سلول‌های دندرتیک

یک راهکار دیگر برای شناسایی و پذیرش آنتی‌ژن‌های ویروس پاپیلومای انسانی توسط سلول‌های دندرتیک، تقویت آنتی‌ژن‌های ویروس پاپیلومای انسانی در اطراف سلول‌های دندرتیک می‌باشد. DMXAA یک عامل مختل کننده کارایی رگ‌های خونی است که می‌تواند از ارسال مواد مورد نیاز برای سلول‌های توموری از راه خون جلوگیری کرده و باعث نکروز سلول توموری شود. واکسیناسیون DNA ویروس پاپیلومای انسانی توسط قطعه E7 همراه با DXMAA در موش‌های حاوی تومور TC-1، اثرات ضدتوموری بالقوه و پاسخ‌های ایمنی سلول +TCD8 اختصاصی E7 در سلول‌های طحال موش نشان داده شده است. به شکلی مشابه، تزریق توأم EGCG و DNA واکسن pcDNA3-Sig/E7/LAMP-1 توسط تفنگ ژنی و ارائه نهایی آن به مدل موشی به فرم آشامیدنی، واکنش ایمنی سلولی قدرتمندتری نسبت به ارائه هر کدام از ترکیبات EGCG یا pcDNA3-Sig/E7/LAMP به‌صورت جداگانه از خود نشان داده است. EGCG فلاونوئید اصلی چای سبز می‌باشد که به‌صورت وابسته به دوز باعث آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌شود. Apigenin فلاونوئید دیگری است که همراه با قطعه E7 واکنش ایمنی سلولی را برمی‌انگیزد (۲، ۱۷، ۱۸، ۲۸، ۳۹-۳۴). راهکارهای ذکر شده در این بخش، تنها برخی از مهم‌ترین تلاش‌ها به منظور مقابله با محدودیت‌های DNA واکسن‌ها و تقویت توان آنها می‌باشد.

۵-۱-۳. معرفی برخی از DNA واکسن‌ها:

GX-188E یک واکسن متشکل از قطعات E6 و E7 تیپ‌های ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی است که با لیگاند تیروزین کیناز نوع ۳ مشابه Fms همراه شده است. نتایج فاز اولیه مطالعه این واکسن بر روی ۹ بیمار دارای ویروس پاپیلومای انسانی تیپ‌های ۱۶ و ۱۸ به همراه CIN3، حاکی از تحریک +CD8 و +CD4 بود و در پایان مطالعه درمان کامل در ۷ بیمار از ۹ بیمار CIN3 مشاهده شد (۴۰). در حال حاضر فاز دوم آزمایش این واکسن بر روی زنان دارای ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ و ۱۸ به همراه CIN3 با نتایج مثبت انجام شده است و بخشی دیگر از فاز دوم آزمایشی این واکسن بر روی زنان دارای تیپ ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی به همراه CIN2، CIN2/3 یا CIN3 در دست انجام است (۲).

VGX-3100 یک DNA واکسن بر اساس قطعات E6 و E7 تیپ ۱۶ و ۱۸ ویروس است که تزریق درون‌ماهیچه‌ای آن به همراه شوک الکتریکی نیز منجر به

[1] CTL antigen 4

افزایش اثربخشی واکسن شده است. در فاز اولیه آزمایش کلینیکی این واکسن بر روی بیماران دارای CIN2/3، نتایج حاکی از واکنش +CD8 در ۷۸٪ موارد بود. به‌طور کلی در ۹۴٪ بیماران تیتر آنتی‌بادی E7 علیه تیپ ۱۶ HPV مشاهده شد و تمامی بیماران نیز تیتر بالایی از آنتی‌بادی E7 تیپ ۱۸ ویروس را داشتند (۴۱). این واکسن که در حال حاضر در دست بررسی بر روی زنان دارای CIN2 و CIN3 می‌باشد، تا امروز یکی از موفق‌ترین DNA واکسن‌ها بوده است (۲).

ZNF–603 و ZNF -758 دو واکسنی هستند که حاصل پیشرفت‌های جدید در ابزار اصلاح ژن می‌باشند. این واکسن‌ها که از نوکلئازهای انگشت روی با هدف جلوگیری از رشد و کاهش میزان توموری شدن سلول‌های آلوده به ویروس تولید شده‌اند و می‌توانند قطعه E7 تیپ‌های ۱۶ و ۱۸ ویروس پاپیلومای انسانی را برش دهند، در آسیب‌های پیش از سرطانی شدن در دست آزمایش هستند (۲).

جدول ۲- نقاط ضعف و قوت DNA واکسن‌ها

نقاط قوت	نقاط ضعف
ایجاد واکنش ایمنی سلولی مؤثر	قدرت ورود به سلول و انتقال به APCهای محدود
بیان آنتی‌ژن‌های پپتیدی توموری	قدرت ایمنی‌زایی محدود به شکل برهنه
بیان طولانی‌مدت آنتی‌ژن که می‌تواند باعث ایجاد حافظه سلولی علیه بیماری شود.	عدم توانایی در هدف قرار دادن APCها در حالت عادی
به شکل بیماری‌زا در نیامده و تاکنون آزمایشات نیز حاکی از همین حقیقت بوده‌اند.	امکان ادغام با ژنوم سلولی و ایجاد بیماری
عمر تقریباً بلندی داشته و به‌سرعت از بین نمی‌روند.	امکان ایجاد واکنش ایمنی بر علیه ژن
می‌توان در سطح صنعتی و به آسانی خلوص بالایی از آن را تولید کرد.	

۲. RNA واکسن‌ها

RNA واکسن‌ها بر اساس رپلیکون‌های RNA برهنه که از آلفا ویروس‌ها استخراج شده‌اند، به‌منظور ایجاد ایمنی اکتسابی بر علیه آنتی‌ژن اختصاصی به‌کار برده می‌شوند. وکتورهایی که بر اساس این رپلیکون‌ها هستند، می‌توانند در طیف وسیعی از انواع سلول‌ها تکثیر و به تشدید بیان آنتی‌ژن‌های اختصاصی منجر شوند. از مزایای این واکسن‌ها می‌توان به بیماری‌زا نبودن و عدم درج در کروموزوم اشاره کرد، بنابراین استفاده از این واکسن‌ها منجر به تغییر ماهیت سلولی[1] نخواهد شد (۴۲). از سوی دیگر، RNA رپلیکون‌ها پایداری پایین‌تری نسبت به DNA دارند. بنابراین یک رویکرد ترکیبی، استفاده از قطعه DNA در رپلیکون RNA است که اصطلاحاً به آن DNA خودکشی[2] می گویند. این رویکرد در یک واکسن HPV در مدل‌های قبل از فاز کلینیکی مورد استفاده قرار گرفته است که در آن به‌منظور تقویت واکنش سیستم ایمنی به قطعه E7 ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶، از یک DNA وکتور به نام pSCA1 با منشأ ویروس Semliki Forest استفاده شده است. این وکتور دارای قطعه E7 به همراه BCL-xL از عوامل ضد آپوپتوزی[3] خانواده BCL-2 می‌باشد. نتیجه استفاده از این واکسن در مدل موشی، حاکی از ایجاد ایمنی سلولی بالا توسط +CD8 و حائل آمدن بر ضعف DNAهای خودکشی (که به‌طور معمول پس از تزریق منجر به آپوپتوز می‌شوند) می‌باشد. نوع دیگری از این واکسن‌ها که واکسن بر اساس mRNA(RNActive®) است، در فاز کلینیکی برای سرطان‌های پروستات و سلول‌های سرطانی غیرکوچک شش در حال بررسی است. با وجود تحمل ایمنی خوب این واکسن و برخورداری از ایمنی سلولی و هومورال مناسب، اطلاعاتی از آن بر روی ناهنجاری‌های ناشی از ویروس پاپیلومای انسانی در دست نیست (۷، ۳۴، ۳۹).

نتیجه‌گیری

در حال حاضر واکسن‌هایی به منظور پیشگیری از ابتلاء به ویروس پاپیلومای انسانی در دسترس است، اما این

[1] Cellular transformation
[2] suicidal DNA
[3] antiapoptotic

واکسن‌ها قادر به پیشگیری تمام انواع پرخطر ویروس HPV نیستند. همچنین این واکسن‌ها بر روی افراد از پیش مبتلا و دارای ناهنجاری‌های حاصل از ویروس نظیر CIN1، CIN2، CIN3 و یا سرطان تأثیری ندارد. بنابراین مطالعات بسیاری جهت ارائه یک واکسن کارآمدتر بر علیه این بیماری در حال انجام است. تحقیقات جدید بر راهکارهایی متمرکز شده‌اند تا از پروتئین‌هایی غیر از پروتئین‌های پوشش ویروس که در واکسن‌های موجود به‌کار رفته‌اند، به منظور تهیه واکسن درمانی مؤثری بر علیه HPV استفاده کنند. از این پروتئین‌ها می‌توان به E6 و E7 اشاره کرد که نقش مهمی در مراحل پس از ابتلاء و سرطانی شدن سلول‌ها ایفا می‌کنند. از راهکارهای امیدبخش در این راستا، واکسن‌هایی بر اساس نوکلئیک اسیدها (DNA یا RNA) می‌باشند. نوکلئیک اسید واکسن‌ها به‌طور مشخص دارای نتایج امیدوارکننده‌ای به‌منظور تهیه واکسن به دلیل امن بودن، پایداری، راحتی در تولید و توانایی ایجاد ایمنی اختصاصی می‌باشند. بنابراین، به نظر می‌رسد در آینده‌ای نزدیک، واکسن‌های نوکلئیک اسیدی بر مبنای ژن‌های E6 و E7 ویروس بتوانند به عنوان تیمار مؤثری بر علیه ویروس پاپیلومای انسانی به‌کار روند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از نویسندگان تمامی مقالات مورد استفاده در این مطالعه مروری، تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Zhou HL, Zhang W, Zhang CJ, Wang SM, Duan YC, Wang JX, et al. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in Chinese women between 1991 and 2016: a systematic review. J Infect 2018; 76(6):522-8.
2. Chabeda A, Yanez RJ, Lamprecht R, Meyers AE, Rybicki EP, Hitzeroth II. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. Papillomavirus Res 2018; 5:46-58.
3. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Meeting, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. *Human papillomaviruses*. Geneva: World Health Organization; 2007.
4. Shanmugasundaram S, You J. Targeting persistent human papillomavirus infection. Viruses 2017; 9(8):229.
5. Malakouti J, Mirghafourvand M, Gorbani M, Salehi Poormehr H, Pourasad Shahrak S, Jafari Shabiri M. Incidence of *Human Papilloma Virus* (HPV) infection and its relevant factors among women referring to Alzahra Therapeutic-Educational Center of Tabriz, September 2013 to March 2014. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2016; 18(185):16-22. (Persian).
6. Choi YJ, Park JS. Clinical significance of human papillomavirus genotyping. J Gynecol Oncol 2015; 27(2):e21.
7. Sohrabi A, Rahnamaye Farzami M, Mirab Samiee S, Modarresi MH. An overview on papillomaviruses as the main cause of cervical cancer. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2015; 18(145):14-25. (Persian).
8. Campo MS, Roden RB. Papillomavirus prophylactic vaccines: established successes, new approaches. J Virol 2010; 84(3):1214-20.
9. Roden RB, Stern PL. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. Nat Rev Cancer 2018; 18(4):240.
10. Evans MR, James CD, Bristol ML, Nulton TJ, Wang X, Kaur N, et al. Human papillomavirus 16 E2 regulates keratinocyte gene expression relevant to cancer and the viral life cycle. J Virol 2019; 93(4):e01941-18.
11. Vici P, Pizzuti L, Mariani L, Zampa G, Santini D, Di Lauro L, et al. Targeting immune response with therapeutic vaccines in premalignant lesions and cervical cancer: hope or reality from clinical studies. Expert Rev Vaccines 2016; 15(10):1327-36.
12. Schiller JT, Castellsagué X, Garland SM. A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines. Vaccine 2012; 30(Suppl 5):F123-38.
13. Ma B, Maraj B, Tran NP, Knoff J, Chen A, Alvarez RD, et al. Emerging human papillomavirus vaccines Expert Opin Emerg Drugs 2012; 17(4):469-92.
14. Hasanzadeh Mofrad M, Jedi L, Ahmadi S. The role of *Human Papilloma Virus* (HPV) vaccines in prevention of Cervical Cancer, review article. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2016; 19(21):22-9. (Persian).
15. Deschuyteneer M, Elouahabi A, Plainchamp D, Plisnier M, Soete D, Corazza Y, et al. Molecular and structural characterization of the L1 virus-like particles that are used as vaccine antigens in Cervarix™, the AS04-adjuvanted HPV-16 and-18 cervical cancer vaccine. Hum Vaccines 2010; 6(5):407-19.
16. Hung CF, Ma B, Monie A, Tsen SW, Wu TC. Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions. Expert Opin Biol Ther 2008; 8(4):421-39.

17. Cheng MA, Farmer E, Huang C, Lin J, Hung CF, Wu TC. Therapeutic DNA vaccines for human papillomavirus and associated diseases. Hum Gene Ther 2018; 29(9):971-96.
18. Monie A, Tsen SW, Hung CF, Wu TC. Therapeutic HPV DNA vaccines. Expert Rev Vaccines 2009; 8(9):1221-35.
19. Pierini S, Perales-Linares R, Uribe-Herranz M, Pol JG, Zitvogel L, Kroemer G, et al. Trial watch: DNA-based vaccines for oncological indications. Oncoimmunology 2017; 6(12):e1398878.
20. Bourla AB, Zamarin D. Immunotherapy: new strategies for the treatment of gynecologic malignancies. Oncology 2016; 30(1):59.
21. Yang A, Farmer E, Wu TC, Hung CF. Perspectives for therapeutic HPV vaccine development. J Biomed Sci 2016; 23(1):75.
22. Lee SJ, Yang A, Wu TC, Hung CF. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. J Gynecol Oncol 2016; 27(5):e51.
23. Lin K, Roosinovich E, Ma B, Hung CF, Wu TC. Therapeutic hpv DNA vaccines. Immunol Res 2010; 47(1-3):86-112.
24. Alvarez RD, Huh WK, Bae S, Lamb Jr LS, Conner MG, Boyer J, et al. A pilot study of pNGVL4a-CRT/E7 (detox) for the treatment of patients with HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3 (CIN2/3). Gynecol Oncol 2016; 140(2):245-52.
25. Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, et al. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. J Immunol 2000; 164(9):4635-40.
26. Zeira E, Manevitch A, Manevitch Z, Kedar E, Gropp M, Daudi N, et al. Femtosecond laser: a new intradermal DNA delivery method for efficient, long-term gene expression and genetic immunization. FASEB J 2007; 21(13):3522-33.
27. Klencke B, Matijevic M, Urban RG, Lathey JL, Hedley ML, Berry M, et al. Encapsulated plasmid DNA treatment for human papillomavirus 16-associated anal dysplasia: a Phase I study of ZYC101. Clin Cancer Res 2002; 8(5):1028-37.
28. Garcia F, Petry KU, Muderspach L, Gold MA, Braly P, Crum CP, et al. ZYC101a for treatment of high-grade cervical intraepithelial neoplasia :a randomized controlled trial. Obstet Gynecol 2004; 103(2):317-26.
29. Wu F, Long J, Wang S, Xing J, Li M, Zheng C. Live cell imaging fails to support viral-protein-mediated intercellular trafficking. Arch Virol 2012; 157(7):1383-6.
30. Li ML, Guo H, Ding Q, Zheng CF. A multiple functional protein: the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22. Virol Sinica 2009; 24(3):153-61.
31. Kim TW, Hung CF, Kim JW, Juang J, Chen PJ, He L, et al. Vaccination with a DNA vaccine encoding herpes simplex virus type 1 VP22 linked to antigen generates long-term antigen-specific CD8-positive memory T cells and protective immunity. Hum Gene Ther 2004; 15(2):167-77.
32. 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.
33. Trimble CL, Peng S, Kos F, Gravitt P, Viscidi R, Sugar E, et al. A phase I trial of a human papillomavirus DNA vaccine for HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3. Clin Cancer Res 2009; 15(1):361-7.
34. Beerens A, Rots M, Vries EF, Haisma HJ. Fusion of herpes simplex virus thymidine kinase to VP22 does not result in intercellular trafficking of the protein. Int J Mol Med 2007; 19(5):841-9.
35. Wang S. 195. Tat peptide conjugates of low molecular weight polyethylenimine as effective non-viral gene delivery vectors. Mol Ther 2006; 2:13.
36. Gan L, Jia R, Zhou L, Guo J, Fan M. Fusion of CTLA-4 with HPV16 E7 and E6 enhanced the potency of therapeutic HPV DNA vaccine. PloS One 2014; 9(9):e108892.
37. Morrow MP, Kraynyak KA, Sylvester AJ, Shen X, Amante D, Sakata L, et al. Augmentation of cellular and humoral immune responses to HPV16 and HPV18 E6 and E7 antigens by VGX-3100. Mol Ther Oncolytics 2016; 3:16025.
38. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. Nat Rev Immunol 2012; 12(8):557-69.
39. Kallen KJ, Heidenreich R, Schnee M, Petsch B, Schlake T, Thess A, et al. A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNActive® vaccines. Hum Vaccines Immunother 2013; 9(10):2263-76.
40. Kim TJ, Jin HT, Hur SY, Yang HG, Seo YB, Hong SR, et al. Clearance of persistent HPV infection and cervical lesion by therapeutic DNA vaccine in CIN3 patients. Nat Commun 2014; 5:5317.
41. Bagarazzi ML, Yan J, Morrow MP, Shen X, Parker RL, Lee JC, et al. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses. Sci Transl Med 2012; 4(155):155ra38.
42. Yang A, Jeang J, Cheng K, Cheng T, Yang B, Wu TC, et al. Current state in the development of candidate therapeutic HPV vaccines. Expert Rev Vaccines 2016; 15(8):989-1007.
43.