

دستنامه علمی - شماره ۲

واکسن های نو ترکیب

نویسندگان:

دکتر حسام دهقانی

استاد بیوتکنولوژی مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی و دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

دکتر سید الیاس طباطبایی زاده

استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

دکتر مجید جمشیدیان مجاور

استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

انتشارات:

کمیته بیوتکنولوژی وزارت جهاد کشاورزی

ستاد توسعه زیست فناوری

با حمایت مالی «صندوق حمایت از سرمایه گذاری زیست فناوری»

این دستنامه علمی به شماره ۵۲۹۳۹ در تاریخ ۹۶/۱۰/۲۵
در مرکز فناوری اطلاعات و اطلاع رسانی کشاورزی به ثبت رسیده است

۱۳۹۶

سرشناسه:	دهقانی، حسام.
عنوان و پدیدآور:	واکسن‌های نو ترکیب / حسام دهقانی، سید الیاس طباطبایی زاده، مجید جمشیدیان مجاور
ناشر:	خدمات نشر انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۱۳۹۶.
مشخصات ظاهری:	سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی؛ با مشارکت: کمیته بیوتکنولوژی وزارت جهاد کشاورزی؛ ستاد توسعه زیست‌فناوری؛ صندوق حمایت از سرمایه‌گذاری زیست‌فناوری
شابک:	۹۷۸-۹۶۴-۳۲۴-۳۸۶-۹
یادداشت:	۵۶ ص. مصور، جدول، نمودار. کتابنامه: ص: ۵۱- [۵۶].
موضوع ۱:	واکسن‌ها.
موضوع ۲:	واکسن‌های نو ترکیب.
شناسه افزوده:	طباطبایی زاده، سید الیاس، نویسنده همکار.
شناسه افزوده:	جمشیدیان مجاور، مجید، نویسنده همکار.
رده‌بندی کنگره:	۱۳۹۶: ۲۸ و ۹ / RM۲۸۱
رده‌بندی دیویی:	۶۱۵/۳۷۲



خدمات نشر انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد
مشهد، میدان آزادی، پردیس دانشگاه، سازمان مرکزی جهاد دانشگاهی
ص. پ. ۱۳۷۶-۹۱۷۷۵ تلفن: ۳۸۸۳۲۳۶۷ دفتر پخش: ۳۸۴۲۲۳۰
www.jdmpress.com info@jdmpress.com

واکسن‌های نو ترکیب

نویسندگان:

دکتر حسام دهقانی، دکتر سید الیاس طباطبایی زاده، دکتر مجید جمشیدیان مجاور

چاپ اول ۱۳۹۶ / ۲۰۰۰ نسخه چاپ و صحافی چاپخانه دانشگاه فردوسی

شابک ۹۷۸-۹۶۴-۳۲۴-۳۸۶-۹ ISBN: 978-964-324-386-9

کلیه حقوق نشر برای ناشر محفوظ است.

قیمت: ۶۰.۰۰۰ ریال

فهرست

پیشگفتار.....	۵
۱. مقدمه.....	۷
۲. تاریخچه و اهمیت واکسن و واکسیناسیون در پیشگیری و کنترل بیماری‌ها.....	۹
۳. واکسن‌های مرسوم و نو ترکیب.....	۱۳
۳-۱ واکسن‌های مرسوم: ارگانسیم کامل، کشته یا تخفیف حدت یافته.....	۱۴
۳-۲ واکسن‌های مرسوم: توکسوئیدها.....	۱۴
۳-۳ واکسن‌های نو ترکیب.....	۱۴
۴. انواع واکسن‌های نو ترکیب.....	۱۷
۴-۱ واکسن‌های DNA (DNA واکسن‌ها).....	۱۷
۴-۲ واکسن‌های زیر واحد.....	۲۲
۴-۲-۱ واکسن‌های زیر واحد پروتئینی.....	۲۲
۴-۲-۲ واکسن‌های زیر واحد کربوهیدراتی.....	۲۳
۴-۳ ناقل واکسن‌ها.....	۲۴
۴-۳-۱ ناقل واکسن‌های ویروسی.....	۲۵
۴-۳-۲ ناقل واکسن‌های باکتریایی.....	۲۷
۴-۴ پارتیکل‌های شبه ویروسی.....	۲۸
۴-۵ پارتیکل‌های شبه باکتریایی.....	۳۰
۴-۶ واکسن‌های باکتریایی و ویروسی تخفیف حدت یافته نو ترکیب.....	۳۲
۴-۷ شبح باکتریایی.....	۳۳
۴-۸ نانو واکسن‌ها.....	۳۶
۴-۸-۱ انواع نانوذرات.....	۳۷
۴-۸-۲ واکنش‌های نانوذرات با سلول‌های آنتی‌ژن.....	۳۹
۵. تکوین واکسن‌های نو ترکیب.....	۴۱
۵-۱ قابلیت ساخت.....	۴۲
۵-۲ قابلیت افزایش میزان تولید.....	۴۳
۵-۳ قابل حمل و در دسترس بودن.....	۴۳
۵-۴ تغییرات فرایند تولید واکسن.....	۴۴
۵-۵ فناوری‌های نوین تولید واکسن در حال و آینده.....	۴۵
۶. چشم‌انداز صنعت واکسن‌های نو ترکیب.....	۴۷
۶-۱ وضعیت کنونی واکسن‌های نو ترکیب در شکل تجاری.....	۴۷
۶-۲ اهمیت نگاه استراتژیک به تولید واکسن.....	۴۸
منابع.....	۵۱

پیشگفتار

بیوتکنولوژی یا زیست فناوری به فنونی اطلاق می شود که از موجودات زنده برای ساخت یا تغییر محصولات، ارتقاء کیفی گیاهان یا حیوانات و تغییر صفات میکروارگانیسم ها برای بهبود رفاه بشر و کاربردهای ویژه استفاده می کند. در زیست فناوری کشاورزی حوزه های مختلفی همچون کشت بافت گیاهان زینتی و درختان مثمر و غیر مثمر، مهندسی ژنتیک و تولید گیاهان و حیوانات اصلاح شده ژنتیکی یا تراریخته برای ایجاد صفات برتر، تهیه کیت های تشخیصی گیاهی، دام، طیور و آبزیان به منظور شناسایی مولکولی بیماری های مختلف، تولید کودهای زیستی برای افزایش حاصلخیزی خاک و کاهش مصرف کودهای شیمیایی، تولید داروها و واکسن های نو ترکیب به منظور تأمین سلامت و بهداشت دام و طیور، استفاده از زیست مهارگرها برای کنترل و مدیریت آفات و بیماری های گیاهی، اصلاح مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در شناسایی ژنوتیپی گیاهان یا حیوانات برتر و موارد بسیار دیگر مطرح و به کار گرفته می شود. واکسن، یک ترکیب زیستی است که تجویز آن باعث ایجاد ایمنی اکتسابی فعال در بدن می شود. ابداع و توسعه واکسن نقش بسیار مهمی در افزایش طول عمر و کیفیت زندگی انسان و همچنین پیشگیری از بیماری های دامی به همراه داشته است. در اغلب کشورهای دنیای امروز، بیماری هایی چون سرخک، سرخچه، فلج اطفال، هپاتیت A و B، طاعون گاوی و سل، دیگر، جوامع انسانی و دامی را تهدید نمی کنند. واکسن های مرسوم حاوی شکل کشته یا تخفیف حدت یافته عامل بیماریزا می باشند. واکسن های نسل جدید نو ترکیب می توانند به شکل پارتیکل های شبه ویروسی، واکسن های زیرواحد پروتئینی و کربوهیدراتی، واکسن با ساختار پلاسمیدی، ویروس ها و باکتری های

مهندسی شده ناقل واکسن‌ها، شیخ باکتریایی، پارتیکل‌های نو ترکیب ویروسی و باکتریایی، و نانوواکسن باشند. در این دستنامه پس از ارائه تاریخچه‌ای از واکسیناسیون، انواع واکسن‌های نو ترکیب توضیح داده می‌شوند. تکوین و توسعه واکسن‌های نو ترکیب و نقش کلیدی این صنعت در بخش‌های بعدی مورد بحث قرار می‌گیرند. امید است این مجموعه مختصر در ارائه اطلاعات زمینه‌ای مناسب در خصوص انواع واکسن‌ها و بالاختص واکسن‌های نو ترکیب موفق و مفید باشد. در پایان لازم می‌دانم از همکاری ستاد توسعه زیست فناوری معاونت علمی محترم ریاست جمهوری برای حمایت از این کمیته در انتشار نشریات و نیز به‌خاطر کمک‌های ایشان به وزارت جهاد کشاورزی در اجرایی کردن برنامه‌های زیست فناوری تشکر و قدردانی نمایم.

دکتر عبدالرضا باقری

رئیس کمیته بیوتکنولوژی وزارت جهاد کشاورزی

۱. مقدمه

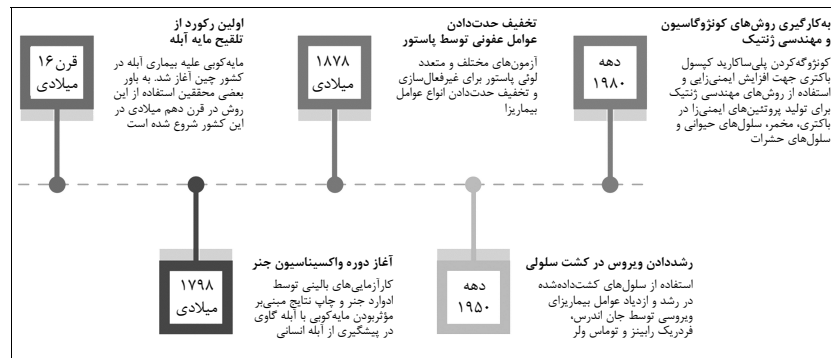
واکسن یک ترکیب زیستی است که تجویز آن باعث ایجاد ایمنی اکتسابی فعال در بدن می‌شود. ابداع و توسعه واکسن نقش بسیار مهمی در افزایش طول عمر و کیفیت زندگی انسان و همچنین پیشگیری از بیماری‌های دامی به همراه داشته است. در اغلب کشورهای دنیای امروز، بیماری‌هایی چون سرخک، سرخچه، فلج اطفال، هپاتیت A و B، طاعون گاوی و سل، دیگر، جوامع انسانی و دامی را تهدید نمی‌کنند. استفاده از واکسن به میزان بسیار مؤثری رخداد بیماری و همچنین شیوع و مرگ و میر ناشی از آن را کاهش می‌دهد. واکسن‌ها با ارائه نمودن آنتی ژن خارجی به سیستم ایمنی، پاسخ‌های ایمنی را برمی‌انگیزند و بدن را در مواجهه با عامل اصلی بیماری‌زا به پاسخ‌های قوی‌تر مجهز می‌کنند. واکسن‌های نسل جدید در درمان بیماری‌های غیرعفونی چون سرطان (که تحریک سیستم ایمنی در درمان آن مؤثر است) نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند.

واکسن‌های مرسوم حاوی شکل کشته یا تخفیف حدت یافته عامل بیماری‌زا می‌باشند. واکسن‌های نسل جدید نو ترکیب می‌توانند به شکل پارتیکل‌های شبه ویروسی، واکسن‌های زیر واحد پروتئینی و کربوهیدراتی، واکسن با ساختار پلاسمیدی، ویروس‌ها و باکتری‌های مهندسی شده ناقل واکسن‌ها، شبیح باکتریایی، پارتیکل‌های نو ترکیب ویروسی و باکتریایی و نانواکسن باشند. در این دستنامه پس از ارائه تاریخچه‌ای از واکسیناسیون، انواع واکسن‌های نو ترکیب توضیح داده می‌شوند. تکوین و توسعه واکسن‌های نو ترکیب و نقش کلیدی این صنعت در بخش‌های بعدی مورد بحث قرار می‌گیرند. امید است که این مجموعه مختصر در ارائه اطلاعات زمینه‌ای مناسب درخصوص انواع واکسن‌ها و بالخصوص واکسن‌های نو ترکیب موفق و مفید باشد.

۲. تاریخچه و اهمیت واکسن و واکسیناسیون در پیشگیری و کنترل بیماری‌ها

استفاده بشر از واکسن، وارد سده چهارم خود گردیده است. به نظر می‌رسد مردم چین یا هند اولین افرادی بودند که در قرن شانزدهم میلادی با استفاده از تلقیح مایع آبله (واریولاسیون)^۱، ایمنی بر ضد بیماری آبله^۲ را ایجاد کرده و استفاده از واکسن را بنا نهادند. مفهوم واقعی واکسن با مشاهدات ادوارد جنر^۳ شکل گرفت. او در قرن نوزدهم میلادی متوجه شد که آلوده کردن فرد به آبله گاوی^۴ می‌تواند ایمنی در برابر آبله انسانی را ایجاد کند. با این یافته، بنای استفاده از واکسن زنده تخفیف حدت یافته گذاشته شد. هشتاد سال بعد لوئی پاستور^۵ راه‌های آزمایشگاهی تخفیف حدت دادن ارگانیسم‌های بیماریزا را مورد مطالعه و بررسی قرار داد. اولین ارگانیسمی که در آزمایشگاه پاستور با گذشت عمر حدت خود را از دست داد عامل وبای مرغی^۶ بود که امروزه پاستورلا مولتوسیدا^۷ خوانده می‌شود. پاستور و همکارانش راه‌های دیگری از جمله پاساژ عامل بیماریزا در یک میزبان غیراصلی، حرارت دادن، رطوبت زدایی، و مواجهه با اکسیژن را در مورد عوامل بیماری هاری و سیاه‌زخم به کار گرفتند (شکل ۱-۲).

-
1. Variolation
 2. Smallpox
 3. Edward Jenner
 4. Cowpox
 5. Louis Pasteur
 6. Fowl cholera
 7. Pasteurella multocida



شکل ۱-۲ مهمترین دستاوردهای بشر در تکوین و توسعه واکسن^[۷۵].

پیشرفت مهم بعدی در زمینه تکوین واکسن‌ها، توانایی غیرفعال نمودن باکتری کامل توسط مواد شیمیایی بود که در آمریکا و در مؤسسه پاستور فرانسه در اواخر قرن نوزدهم میلادی رخ داد. اساس این کار برای غیرفعال‌سازی باکتری سالمونلای ایجادکننده بیماری در خوک توسط سالمون و اسمیت معرفی شد. تلاش دانشمندان آمریکایی و گروه فرانسوی، منجر به تولید واکسن بر علیه بیماری‌های طاعون، وبا، و سیاه‌سرفه شد (شکل ۱-۲).

در نیمه اول قرن بیستم میلادی، پیشرفت‌ها برای تولید واکسن مبتنی بر کارهای پاستور ادامه پیدا کرد. واکسن برعلیه عامل سل تحت عنوان *Bacille Calmette Guérin* در محیط کشت، پاساژ داده شده و به تولید واکسن BCG منجر گردید. عامل بیماری تب زرد نیز با پاساژ در مغز موش و سپس جنین جوجه، حدت خود را از دست داد. سپس از تخم مرغ جنین دار استفاده شد تا عامل ریکتزاییی تیفوس تخفیف حدت داده شود. غیرفعال سازی توکسین باسیل های دیفتری و کزاز توسط فرمالین و ایجاد واکسن های توکسوئیدی منجر به کنترل سریع این بیماری ها نیز شد.

بعد از جنگ جهانی دوم، تکنیک کشت سلول به‌طور موفقیت‌آمیزی اجرا شد و امکان رشد دادن ویروس‌ها در داخل سلول فراهم آمد. کشت ویروس به تولید واکسن‌های متعددی از جمله فلج اطفال، سرخک، سرخچه، اوریون، آبله مرغان^۱، زونا^۲، و عفونت‌های آدنوویروسی

1. Varicella
2. Zoster

رهنمون شد. کشت سلول امکان آن را فراهم ساخت تا واکسن‌های کشت داده شده در مغز یا تخم مرغ نطفه دار از این به بعد در محیط‌های تعریف شده تر کشت سلولی فراهم شوند. واکسن‌های هیپاتیت B و ویروس فلج اطفال مثال‌هایی از واکسن‌های حاوی ویروس کامل غیرفعال شده هستند (شکل ۲-۲).

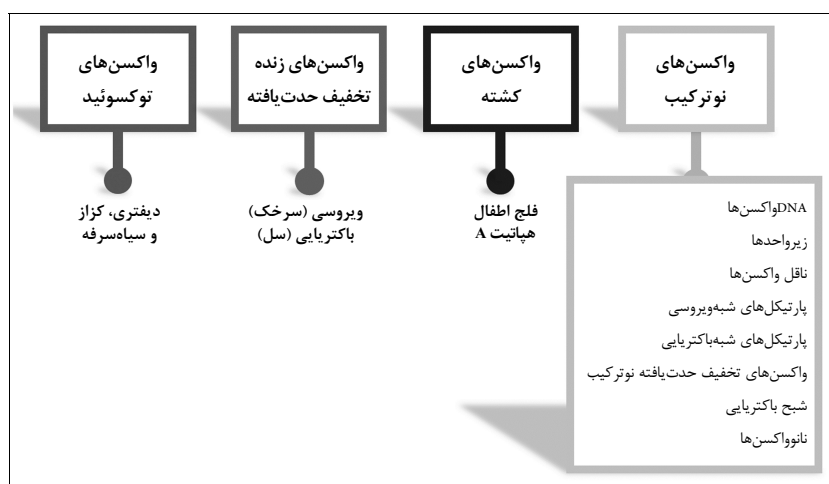
یکی از مشکلاتی که استفاده از واکسن‌های کشته یا تخفیف حدت یافته به همراه داشت، وقوع بیماری به شکل نادر بود. شناخته شده ترین مثال مربوط به واکسن تخفیف حدت یافته خوراکی فلج اطفال بود که در بین سال‌های ۱۹۸۰ تا ۱۹۸۹ میلادی موجب رخداد فلجی با آماری برابر با ۱ در ۲/۵ میلیون نفر گردید. لذا تلاش برای توسعه واکسن‌های کم خطرتر ادامه یافت. تا سال ۱۹۸۶ میلادی کلیه واکسن‌هایی که راهی بازار شدند از نوع کشته یا تخفیف حدت یافته بودند. در سال ۱۹۸۶ میلادی، زمان تولید تجاری واکسن‌های نوترکیب، واکسن نوترکیبی بر ضد هیپاتیت B^۱ توسط شرکت گلاکسو اسمیت کلاین^۲ به بازار عرضه شد که برای ساختش از تکنولوژی نوترکیب استفاده شده بود. در واکسن‌های نوترکیب، اپی‌توپ‌های آنتی ژنیک خاص به شکل مجزا شده از عوامل بیماریزا قابلیت ازدیاد در سیستم‌های بیان سلولی را پیدا کرده و بنابراین خطر مربوط به استفاده مستقیم از عوامل بیماریزا به عنوان واکسن را به دنبال نداشتند. استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و تکنولوژی پروتئین‌های نوترکیب، ساخت و توسعه واکسن را بسیار بهبود داد و امکان ساخت واکسن‌های جدید را میسر ساخت.

صنعت واکسن سازی در ایران با فعالیت مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در سال ۱۳۰۳ به دنبال شیوع بیماری طاعون گاوی در ایران آغاز گردید. این مؤسسه در مدت کوتاهی موفق به تولید واکسن و پیشگیری بیماری طاعون گاوی در کشور گردید. اکنون مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی به همت تلاش متخصصان خود در طی ۹۰ سال توانسته است اکثر واکسن‌های انسانی و حیوانی مورد نیاز کشور را تولید نماید و از نظر حجم و گستردگی تولید فراورده‌های بیولوژیک (بیش از ۷۰ نوع) جایگاه بی نظیری در کشور و خاورمیانه دارد. ریشه کنی و کنترل بسیاری از بیماری‌هایی که زمانی بومی کشور بودند از جمله طاعون گاوی، طاعون اسبی، فلج اطفال، دیفتی، کزاز، سیاه سرفه، سرخک، سرخچه و اوریون، مرهون تولیدات این مؤسسه می باشد.

1. Engerix-B 2. GlaxoSmith Kline (GSK)

۳. واکسن‌های مرسوم و نو ترکیب

واکسن‌ها را می‌توان در دو گروه کلی مرسوم و نو ترکیب قرار داد. واکسن‌های مرسوم در دو دسته ارگانسیم‌های کامل و توکسوئیدها قرار می‌گیرند. از طرف دیگر، واکسن‌های نو ترکیب به دسته‌های ساب‌یونیت (زیر واحد)^۱، کوئزوگه، DNA واکسن^۲، پپتیدهای گیرنده‌ای و کوئزوگه سلول T، پارتیکل‌های شبه ویروسی، ناقل‌های ویروسی، و باکتریایی نو ترکیب تخفیف حدت یافته تقسیم می‌شوند. هر کدام از دو دسته مرسوم و نو ترکیب در ادامه به اختصار معرفی می‌شوند.



شکل ۱-۳ انواع کلی واکسن‌های مرسوم و نو ترکیب.

1. Subunit vaccines
2. DNA vaccine

۳-۱ واکسن‌های مرسوم: ارگانسیم کامل، کشته یا تخفیف حدت یافته

استفاده از این واکسن‌ها که به واکسن‌های نسل اول معروف هستند، به زمان ادوارد جنر (سال ۱۷۹۶ میلادی) و استفاده از آبله گاوی برمی‌گردد. این نوع واکسن‌ها با استفاده از مواد بیولوژیک و جدایه‌های نسبتاً خام تهیه می‌شوند. میزان تأثیرگذاری^۱ این واکسن‌ها به انواع آنتی‌ژن‌های موجود در آنها و توانایی ایجاد پاسخ‌های Th1 (ایمنی با واسطه سلولی) و Th2 (ایمنی با واسطه آنتی‌بادی) بستگی دارد. در انواع تخفیف حدت یافته، نکته بسیار کلیدی و مهم، عدم امکان برگشت^۲ عامل تخفیف حدت یافته به شرایط پاتوژنیک و بیماری‌زای خود می‌باشد. واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته بدون نیاز به ادجوانت هستند، اما واکسن‌های کشته معمولاً نیازمند ادجوانت می‌باشند. بسیاری از این نوع واکسن‌ها مانند واکسن‌های انسانی سرخک، سرخچه، اوریون و فلج اطفال و نیز واکسن‌های دامی مانند شاربن، شاربن علامتی، بروسلوز، قانقاریای عفونی، آگلاکسی واگیر، لیتوزپیروز، تب برفکی، آبله و بسیاری از موارد دیگر در داخل کشور توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تولید می‌گردد.

۳-۲ واکسن‌های مرسوم: توکسوئیدها

واکسن‌های توکسوئیدی که واکسن‌های نسل دوم محسوب می‌شوند شامل توکسین‌هایی هستند که توسط باکتری‌های پاتوژن ایجاد شده و در مقادیر تحت‌سمی به فرد تجویز می‌شوند تا سیستم ایمنی فرد در مواجهه بعدی با خود عامل بیماری‌زا پاسخ‌های سلولی و هومورال را ایجاد کند. از معروفترین مثال‌های واکسن‌های توکسوئیدی می‌توان به واکسن چندگانه دیفتی، کزاز، و سیاه‌سرفه اشاره کرد که توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در کشور تولید می‌گردد.

۳-۳ واکسن‌های نو ترکیب

واکسن‌های نو ترکیب با بهره‌گیری از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و نو ترکیبی DNA ساخته می‌شوند. استراتژی‌های جدید ساخت واکسن با سرعتی قابل توجه در حال تکوین و توسعه

1. Efficacy
2. Reversion

واکسن‌های تخفیف حدت یافته

- ژنتیک معکوس، موتاسیون‌های حساس به دما و بازآرایی.
- نو ترکیب‌های ویروسی و جهش یافته‌های حذف شده.
- بهینه سازی کدون.
- کنترل صحت همانند سازی.
- الحاق میکروریبونوکلئیک اسید.
- ناقل‌های تکثیر شونده که دارای ژن‌هایی از عوامل بیماریزا باشند.
- تحویل ژن با استفاده از باکتری‌های تهاجمی.

واکسن‌های غیر فعال

- پلاسמיד‌های دئوکسی ریبونوکلئیک اسید.
- واکسن شناسی معکوس
- شناسایی آنتی ژن با استفاده از ترنسکریپتومیکس و پروتئومیکس.
- ساخت پروتئین‌های فیوژن.
- ساخت ادجوانت‌های جدید (شامل سایتوکاین‌ها).
- القای ایمنی ذاتی.

شکل ۲-۳ استراتژی‌های نوین مورد استفاده در تکوین و توسعه واکسن^[۷۳].

می‌باشند. شکل ۲-۳ تعدادی از این استراتژی‌ها را به‌طور خلاصه نشان می‌دهد. توان امروزی بشر در طراحی آنتی ژن‌ها، در تحریک پاسخ‌های ایمنی ذاتی به‌منظور افزایش ایمنی اکتسابی و تعیین هویت سلول‌های ایمنی خاص برای پاسخ‌های ایمنی خاص مسلماً به تولید واکسن‌های مؤثرتر منجر می‌گردد.

در زمینه تولید واکسن، سه شاخه علمی نوین که مرهون پیشرفت‌های بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک هستند، آینده تولید واکسن را دگرگون خواهند ساخت و منجر به ایجاد روش‌های باکفایت‌تر تولید و واکسن‌های مؤثرتر می‌شوند. این سه شاخه عبارت‌اند از: (۱) واکسینولوژی معکوس^۱ (مطالعه ژنوم عامل بیماریزا، پیش‌بینی و طراحی اپی‌توپ، و تولید واکسن‌های نو ترکیب)، (۲) واکسینولوژی سیستم‌ها^۲ (شناسایی و درک اثر واکسن‌ها روی کل بدن میزبان و واکنش‌هایی که در بدن ایجاد می‌شوند) و (۳) مراقبت مداوم پروتئوم سلول‌های B^۳ دخیل در ایمنی (مشاهده و بررسی مداوم پاسخ‌های سلول‌های B و پروتئین‌های تولید شده در آنها پس از واکسیناسیون).

1. Reverse vaccinology
2. Systems vaccinology
3. Proteomic monitoring of B-cell immunity

۴. انواع واکسن‌های نو ترکیب

استراتژی علمی پایه که در علم واکسن‌شناسی از گذشته تا حال مطرح بوده است شامل: جداسازی^۱، غیرفعال‌سازی^۲ و تزریق^۳ می‌باشد که برای اولین بار توسط لوئی پاستور ارائه گردید. نو ترکیبی DNA^۴ و نانوتکنولوژی^۵ درحالی که در تولید واکسن‌های جدید مورد استفاده قرار گرفتند و باعث گسترش مجموعه واکسن‌های موجود شدند، اصول پایه ساخت واکسن‌های کشته و زنده را تغییر نداده‌اند. امروزه علم واکسن‌شناسی سه اصل ایجاد تخفیف حدت^۶، غیرفعال‌سازی، و نو ترکیبی^۷ را شامل می‌شود^[۸۸].

۴-۱ واکسن‌های DNA (DNA واکسن‌ها)^۸

ایمن‌سازی با استفاده از DNA واکسن با تجویز DNA ناقل بیانی یوکاریوتی (پلاسمید)^۹ که کدکننده توالی پروتئین آنتی‌ژنیک از یک عامل بیماری‌زا می‌باشد انجام می‌گیرد. در آزمایشگاه، پلاسمیدهای نو ترکیب مهندسی شده در باکتری‌هایی مانند اشرشیاکلی تکثیر می‌یابند و با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی به‌طور کامل از سایر اجزای سلولی جدا و تخلیص می‌گردند. ناخالصی‌هایی با منشأ باکتری مانند لیپو پلی ساکارید^{۱۰} به دلیل سمیت نامطلوب می‌باشند و لذا باید از آلودگی پلاسمید با LPS جلوگیری به عمل آید. پلاسمیدهای

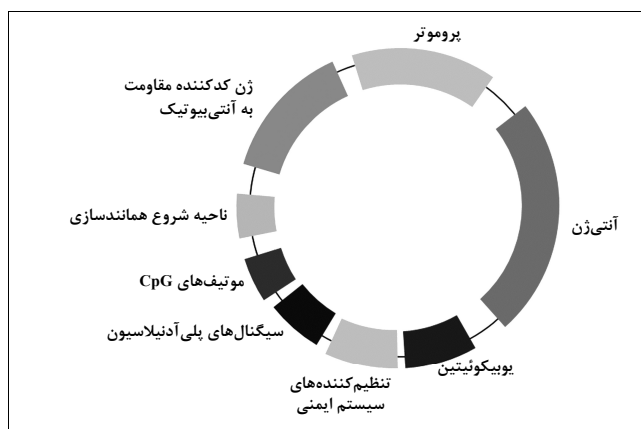
1. Isolation
2. Inactivation
3. Injection
4. Recombinant DNA
5. Nanotechnology
6. Attenuation
7. Recombination
8. DNA vaccines
9. Plasmid
10. Lipopolysaccharide (LPS)

دورشته‌ای حلقوی بعد از جداسازی و تخلیص برای واکسیناسیون آماده می‌شوند. پس از تزریق تولید آنتی‌ژن‌های کدشده توسط پلاسمید در بدن میزبان منجر به القای پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی می‌شود. پروتئین‌های واکسن که به واسطه پلاسمید بیانی در بدن میزبان تولید می‌شوند دارای تغییرات مهم بعد از ترجمه از قبیل گلیکوزیلاسیون‌های صحیح و طبیعی هستند. از آنجا که تجویز پلاسمید به‌تنهایی ایمنی‌زایی مناسب را به‌همراه ندارد، DNA واکسن‌ها مانند واکسن‌های زیر واحد باید همراه با ادجوانت استفاده شوند.

ویژگی منحصر به فرد DNA واکسن‌ها، توانایی آنها در همانندسازی تأثیرات استفاده از واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته می‌باشد. این درحالی است که خطرات استفاده از عوامل تخفیف حدت یافته مانند بازگشت به حالت بیماری‌زا در استفاده از DNA واکسن وجود ندارد. بر این اساس، DNA واکسن‌ها می‌توانند هر دو نوع پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی را القا کنند. ایجاد قطعات پپتیدی حاصل از پردازش آنتی‌ژن توسط سلول دریافت‌کننده پلاسمید منجر به عرضه آنتی‌ژن در سطح سلول به‌وسیله مولکول‌های MHC^۱ کلاس I می‌شود. از دیگر مزیت‌های DNA واکسن‌ها پایداری زیاد حتی در شرایط خارج از زنجیره سرد می‌باشد. نگهداری، انتقال و عرضه DNA واکسن‌ها در شرایط مختلف دارای سهولت و امکان‌پذیری بیشتر و هزینه کم می‌باشد. راه‌ها (عضلانی، خوراکی، مخاطی، داخل جلدی) و روش‌های مختلفی (سوزن، تفنگ ژنی، لیپوزوم) برای تجویز DNA واکسن، مورد استفاده قرار می‌گیرد. تقریباً تمامی ساختارهای DNA پلاسمیدی که تاکنون برای واکسیناسیون استفاده شده‌اند دارای پنج ویژگی مشترک می‌باشند (شکل ۱-۴):

- توالی پروموتور / انهانسر^۲ برای هدایت و افزایش رونویسی از ژن خارجی (آنتی‌ژن)
- محل کلونینگ برای وارد کردن ژن خارجی
- محل شروع همانندسازی پلاسمید در باکتری
- توالی پلی‌آدنیلایسون و خاتمه برای تولید mRNA بالغ
- ناحیه کدکننده پروتئین مقاومت به آنتی‌بیوتیک
- القاکننده‌های سیستم ایمنی مانند CpGs، اینترلوکین‌ها، یوبیکوئیتین و... (روی همان پلاسمید یا یک پلاسمید دیگر)

1. Major histocompatibility complex (MHC) 2. Promoter/enhancer



شکل ۴-۱ ترکیب اجزای مختلف سازنده پلاسمید بیانی مورد استفاده برای ساخت DNA واکسن. آنتی ژن کد شده (طول کامل یا برش خورده) تحت کنترل یک پروموتر/اینهاسر قوی و توالی پلی آدنیلایسون قرار دارد. بیان همزمان سایتوکاین‌ها باعث ارتقای پاسخ های ایمنی می شود. فعال سازی غیراختصاصی سیستم ایمنی می تواند توسط موتیف های CpG انجام شود. واکسن هایی که هدفشان پاسخ های قوی تر ایمنی سلولی است می توانند با بیان همزمان یوبیکوئیتین همراه آنتی ژن موردنظر به طور مؤثرتری عمل کنند.

واکسن های DNA در راه رسیدن به هسته سلول باید یک سری از سدهای زیستی را پشت سر بگذارند. بعد از تجویز DNA واکسن به بافت هدف مانند عضله اسکلتی یا پوست، تعداد زیادی از نوکلئازهای بافتی باعث تخریب مقادیر زیادی از DNA تجویز شده می شوند. همچنین ماتریکس خارج سلولی به دلیل وجود کلاژن و هیالورونیک اسید مانع انتقال واکسن از محل تجویز به غشای سلولی می شوند. تنها قسمت کمی (حدود ۱٪) از پلاسمیدهایی که بدون آسیب باقی مانده اند، خواهند توانست از غشای سلولی به واسطه فرایندهای فاگوسیتوز و پینوسیتوز به داخل سلول راه یابند. در داخل سلول در مسیر انتقال به هسته نیز اگزونوکلئازها و اندونوکلئازهای فراوانی وجود دارند، به طوری که احتمالاً به طور تقریبی تنها حدود ۰/۱ درصد پلاسمیدها موفق خواهند شد که به طور فعال از منافذ غشای هسته عبور کرده و وارد هسته شوند. پارتیکل های کوچک (کمتر از ۴۰ کیلودالتون) می توانند از طریق منافذ غشای هسته به صورت غیرفعال عبور کنند، اما پارتیکل های بزرگتر برای انتقال کارآمد نیاز به کمک پروتئین های حامل

دارند. به دلیل اینکه از کاهش قابل توجه DNA پلاسمیدی (که تا حدود ۹۹/۹٪ تخمین زده می‌شود) جلوگیری شود، از ابزارها و روش‌های مختلفی مانند کپسوله کردن^۱ آنها به داخل لیپوزوم‌ها یا اتصال DNA به دندریمرها^۲ (پلیمرهای سنتتیک با ساختارهای شبه‌درختی) برای حفاظت DNA پلاسمیدی و افزایش کارایی واکسن استفاده شده است.

با وجود عدم دریافت مجوز استفاده برای DNA واکسن در انسان، مواردی از DNA واکسیناسیون موفق در انسان گزارش شده است^[۳۷،۵۰،۵۱،۸۷]. در رابطه با بیماری‌های به شدت مسری و کشنده که برای ساخت واکسن به روش‌های معمول نیاز به صرف زمان و هزینه و ایجاد خطر زیستی مربوط به جداسازی، تکثیر و غیرفعال‌سازی عامل بیماری را دارند، استفاده از DNA واکسن اهمیت بیشتری می‌یابد. برای نمونه، برای ساخت واکسن آنفلوانزا برای مقابله با همه‌گیری ویروس، در روش‌های معمول واکسن‌سازی نیاز به جداسازی، تکثیر و غیرفعال‌سازی ویروس بیماریزا می‌باشد که علاوه بر نیاز به مقادیر زیاد تخم مرغ‌های جنین دار و خطرات کار با مقادیر بالای ویروس حاد تکثیرشده، در بهترین حالت نیاز به حداقل ۶ ماه زمان می‌باشد. این درحالی است که برای ساخت DNA واکسن، نیاز به جداسازی و تکثیر ویروس بیماریزا نمی‌باشد و در مدت زمان حدود یک ماه می‌توان تولید انبوه واکسن را انجام داد^[۱۰۳]. در مواردی از آزمایشات بالینی بر روی انسان با استفاده از DNA واکسن آنفلوانزا، تیترهای آنتی‌بادی یکسان یا حتی چندین برابر، نسبت به واکسن غیرفعال معمول گزارش شده است که بر اهمیت قابلیت استفاده از DNA واکسن‌ها در مواردی مانند همه‌گیری آنفلوانزا که نیاز به یک راهکار سریع و مؤثر دارد تأکید می‌نماید^[۵۱،۸۷].

اولین DNA واکسن‌ها از سال ۲۰۰۵ در دامپزشکی مجوز استفاده گرفته‌اند. اولین DNA واکسن دامپزشکی برای استفاده در اسب مجوز گرفت. در حال حاضر آزمایشات بالینی دامپزشکی با استفاده از DNA واکسن‌ها برای تعداد زیادی از گونه‌های دامی در سرتاسر دنیا در حال انجام است^[۱۸،۴۲،۴۳،۵۹،۸۶،۱۰۷]. واکسن مورد استفاده در سگ جهت درمان ملانومای بدخیم سگ‌سانان (CMM)^۳ استفاده می‌شود. ملانومای بدخیم سگ‌سانان به عنوان یکی از مهاجم‌ترین و مرگبارترین سرطان‌ها در سگ‌ها می‌باشد. درمان‌های استاندارد مانند جراحی،

1. Encapsulation

2. Dendrimers

3. Canine malignant melanoma (CMM)

پروتوئیدی و شیمی‌درمانی از روش‌های معمول جهت مبارزه با ملانومای بدخیم سگ‌سانان می‌باشند. DNA واکسنی که برای درمان ملانومای بدخیم سگ‌سانان استفاده می‌شود، پلاسמיד کدکننده پروتئین تیروزیناز^۱ انسانی است که یک آنتی‌ژن توموری می‌باشد. این آنتی‌ژن موتاسیون‌نیافته برای ملانوما اختصاصی می‌باشد. ایمن‌سازی سگ‌ها با DNA واکسن کدکننده تیروزیناز انسانی (زینوژنیک^۲) می‌تواند باعث شکسته‌شدن تحمل ایمنی در برابر این آنتی‌ژن توموری شود و پاسخ‌های آنتی‌بادی و سلول‌های T سلول‌کش را در برابر سلول‌های ملانوما القا نماید.

شرکت سازنده ONCEPT در سال ۲۰۰۷ جواز مشروط و در سال ۲۰۱۰ جواز قطعی استفاده و عرضه این واکسن را از USDA^۳ دریافت کرد. نتایج ایمن‌سازی با این واکسن نشان‌دهنده افزایش قابل‌توجهی در زمان زنده‌ماندن حیوانات واکسینه‌شده در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

واکسن مورد استفاده در اسب جهت پیشگیری بیماری حاصل از ویروس نیل غربی^۴ مورد استفاده قرار می‌گیرد. ویروس نیل غربی از خانواده فلاویویریده و از جنس فلاوی ویروس می‌باشد که پشه ناقل آن است. یک‌سوم تمامی اسب‌هایی که توسط پشه‌های ناقل گزیده می‌شوند، دچار بیماری و مرگ می‌شوند. پروتئین E، که یک پروتئین سطحی پوششی در این ویروس است، هدف اصلی برای پاسخ‌های آنتی‌بادی می‌باشد. از طرف دیگر، پروتئین پیش‌غشایی prM در زمان بلوغ ویروس به پپتیدهای غشایی کوچک M شکسته می‌شود. بیان و تولید پروتئین‌های prM و E در سلول‌ها منجر به ایجاد پارتیکل‌های شبه‌ویروسی^۵ می‌شود. پلاسמיד بیانی نهایی برای ایمن‌سازی اسب‌ها دارای پروموتور سیتومگالو ویروس انسانی (hu CMV)، سکانس‌های سیگنال از ویروس آنسفالیت ژاپنی و ژن فیوژن prM و E می‌باشد. DNA واکسن ویروس نیل غربی پاسخ ایمنی کامل، پایدار و بلندمدتی (۱۲ ماه) ایجاد می‌کند و بدون واکنش‌های نامناسب می‌باشد. این واکسن در سال ۲۰۰۵ توسط USDA برای استفاده در دامپزشکی مورد تأیید قرار گرفت و در سال ۲۰۰۸ به بازار عرضه شد.

1. Tyrosinase
2. Xenogeneic
3. U.S. department of agriculture
4. West Nile Virus
5. Virus-like particles

واکسن علیه بیماری حاصل از ویروس نکروز عفونی خونریزی‌دهنده^۱ در ماهی آزاد اولین DNA واکسن تجاری بود که به بازار عرضه شد. در مورد DNA واکسن برای ماهی‌ها باید در نظر گرفت که واکسن نه تنها نباید برای ماهی خطر داشته باشد بلکه به خصوص برای انسان به عنوان مصرف کننده ماهی نیز باید کاملاً بی خطر باشد. یکی از مشکلات اصلی برای ماهی آزاد ویروس IHN می باشد. ژن G ویروس IHN، کدکننده گلیکوپروتئین‌های سطحی به نام اسپایک‌ها^۲ است که اهداف اصلی برای پاسخ‌های سیستم ایمنی می باشند و برای ساخت واکسن مورد استفاده قرار گرفته است. این DNA واکسن ماهیان برای اولین بار در سال ۲۰۰۵ در کانادا مجوز استفاده گرفت.

۴-۲ واکسن‌های زیر واحد^۳

واکسن‌های زیر واحد در دو دسته پروتئین و کربوهیدرات قرار می گیرند. واکسن‌های زیر واحد به طور ذاتی ایمنی زایی ضعیفی دارند و استفاده از ادجوانت‌های قوی برای ایجاد پاسخ‌های ایمنی قوی تر ضروری می باشد.

۴-۲-۱ واکسن‌های زیر واحد پروتئینی

واکسن‌های زیر واحد پروتئینی بر پایه استفاده از مولکول پروتئین برای القای پاسخ‌های ایمنی همورال می باشند، و القای پاسخ‌های ایمنی سلولی به دنبال این نوع واکسیناسیون به طور مؤثری ایجاد نمی شود. آنتی ژن‌های پروتئینی پس از تجویز توسط سلول‌های حرفه‌ای عرضه کننده آنتی ژن گرفته شده و بعد از پیگانه‌خواری، پروتئین‌ها توسط پروتئازهای وابسته به اسید در اندوزوم‌ها تجزیه می شوند (مسیر خارجی یا اندوزومال) و پپتیدهای آنتی ژنیک توسط MHC کلاس ۲ در سطح این سلول‌ها عرضه می شوند. این مسیر به طور اختصاصی پاسخ‌های همورال قوی تری را می تواند القا نماید. این پپتیدهای عرضه شده بر سطح سلول، شکلی از زیر واحد می باشند.

یکی از کاربردهای این نوع واکسن در مبارزه با کنه‌های^۴ بیماریزا است. کنه‌ها به طور گسترده‌ای در سرتاسر دنیا پراکنده شده‌اند و حدود ۸۰ درصد جمعیت گاو‌ها را در دنیا

1. Infectious hematopoietic necrosis

2. Spikes

3. Subunit vaccines

4. Tick vaccine

تحت تأثیر قرار داده‌اند. آلودگی با کنه‌ها تأثیراتی از قبیل انتقال بیماری، فلجی، مسمومیت و عفونت‌های ثانویه را به دنبال دارد. مطالعات نشان داده است که آلودگی با کنه می‌تواند باعث ایجاد مقاومت اکتسابی در میزبان شود. با چندین بار قراردادن میزبان در معرض کنه یا هموزن تهیه شده از کنه می‌توان در برابر آلودگی مجدد مقاومت ایجاد کرد. گلائیکو پروتئین Bm86 که در مجاری گوارشی کنه وجود دارد، برای اولین بار در کنه ریپیسفالوس میکروپلاس^۱ شناسایی شد و سپس همولوگ‌های آن در سایر گونه‌های کنه شناسایی گردید. واکسیناسیون با پروتئین کامل Bm86 انجام می‌شود و میزان کارآمدی واکسن به‌طور مستقیم با تیتراژ آنتی‌بادی ضد Bm86 مرتبط می‌باشد. تغذیه کنه از میزبان واکسینه شده منجر به برداشت آنتی‌بادی‌های ضد Bm86 می‌شود که تأثیرات کشنده‌ای بر روی کنه دارند. واکسن ضدکنه بر اساس پروتئین Bm86 تنها واکسن ضدکنه‌ای است که به‌طور تجاری تولید شده است. مطالعات گسترده به دنبال واکسیناسیون گاوها با این واکسن در کوبا، برزیل، آرژانتین و مکزیک نشان‌دهنده کنترل ۵۵ تا ۱۰۰ درصدی کنه‌های ریپیسفالوس میکروپلاس در یک دوره ۳۶ هفته‌ای می‌باشد. این واکسن با نام تجاری Gavac محصول شرکت Heber Biotec S.A. در کشور کوبا تولید می‌شود.

از واکسن‌هایی که توسط FDA مجوز استفاده دریافت کرده‌اند می‌توان به واکسن زیرواحد بر ضد بیماری هپاتیت B با نام‌های تجاری HB ساخت شرکت مرک کشور آمریکا، Engerix-B ساخت شرکت GlaxoSmithKline Pharmaceuticals کشور آمریکا و ضد بیماری آنفلوانزا با نام تجاری Flublok ساخت شرکت Protein Sciences کشور آمریکا نام برد.

۲-۲-۴ واکسن‌های زیرواحد کربوهیدراتی

کربوهیدرات‌ها نیز به‌عنوان زیرواحدهایی با ایمنی‌زایی ضعیف و وابسته به سن مورد استفاده قرار گرفته‌اند. آنتی‌ژن‌های کربوهیدراتی القاکننده پاسخ‌های سلول‌های B مستقل از سلول T هستند. بنابراین، کربوهیدرات‌ها برای افزایش سطح القای پاسخ‌های ایمنی به جزء پروتئینی متصل می‌شوند که به این فرایند کونژوگاسیون^۲ اطلاق می‌شود.

1. Rhipicephalus microplus
2. Conjugation

کپسول پلی‌ریبوزیل ریبتول فسفات (PRP)^۱ یک فاکتور حداث اصلی برای ارگانیسم هموفیلوس آنفلوانزای تیپ B (Hib)^۲ می‌باشد. PRP یک آنتی‌ژن مستقل از سلول T است که با القای ضعیف پاسخ‌های آنتی‌بادی در کودکان کمتر از ۱۸ ماه و بچه‌ها و نیز ناتوانی در القای پاسخ بویستر همراه است. برای غلبه بر ویژگی مستقل از سلول T بودن با اتصال کووالان PRP به یک آنتی‌ژن پروتئینی وابسته به سلول‌های T، واکسن کانزوگه ساخته می‌شود. در حال حاضر، سه ناقل پروتئینی برای اتصال به PRP مجوز استفاده گرفته است. این سه پروتئین شامل پروتئین‌هایی از عوامل دیفتری با نام HbOC محصول شرکت Praxis Biologics، نیسریا با نام تجاری PedvaxHIB محصول شرکت مرک و کلستریدیوم با نام تجاری ActHIB محصول شرکت Sanofi Pasteur کشور فرانسه می‌باشند.

واکسن‌های زیر واحد کانزوگه و پروتئین نیز بر ضد بیماری شیگلوز^۳ طراحی و تولید شده‌اند. شیگلوز یکی از مهمترین علت‌های شیوع و مرگ و میر با حدود ۹۰ میلیون مورد شیوع سالانه و حدود ۱۰۰،۰۰۰ مورد مرگ سالانه است. حدود ۶۰ درصد موارد مرگ در کودکان زیر ۵ سال در کشورهای جهان سوم اتفاق می‌افتد. گوناگونی سروتیپی شینگلا به واسطه تغییرات در آنتی‌ژن O جزء لیپوپلی ساکاریدی ایجاد می‌شود. آنتی‌ژن O یکی از اجزای ایمنی‌زای اصلی شینگلا و یک فاکتور حداث می‌باشد. تجویز لیپوپلی ساکارید یا آنتی‌ژن O به‌تنهایی نمی‌تواند پاسخ‌های ایمنی مناسب را ایجاد نماید. برای حل این مشکل، این مولکول‌های همراه با پروتئین‌های مختلف به‌عنوان حامل مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از این حامل‌ها پروتئین خارج‌غشایی نیسریا می‌باشد. واکسن کاندید دیگر براساس پروتئین‌های نو ترکیب T3SS از پروتئین‌های حفظ‌شده و عوامل حداث شینگلا می‌باشد. این پروتئین‌های نو ترکیب می‌توانند در سطوح بالایی در اشرشیاکلی بیان شوند. در آزمایشی که روی موش انجام گرفت، بیشتر از ۹۰ درصد حفاظت همولوگ و بیشتر از ۶۰ درصد حفاظت هترولوگ مشاهده شده است.

۳-۴ ناقل واکسن‌ها^۴

با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک می‌توان میکروارگانیسم‌های تخفیف حداث یافته یا غیربیماریزا مانند ویروس‌ها و باکتری‌ها را برای تولید آنتی‌ژن‌های نو ترکیب هترولوگ استفاده

1. Polyribosyl ribitol phosphate
2. Haemophilus influenzae type B

3. Shigellosis
4. Vector vaccines

نمود و با تجویز این میکروارگانیسم‌های تغییر یافته به میزان مورد نظر پاسخ‌های ایمنی را در برابر یک آنتی ژن خاص القا کرد. به میکروارگانیسم بیان کننده آنتی ژن هترولوگ ناقل واکسن گفته می‌شود.

یکی از نکات مهم در رابطه با این گونه واکسن‌ها ایمنی زیستی آنها است. اولین دستنامه ایمنی زیستی در سال ۱۹۸۳ منتشر شد. این دستنامه موارد راجع به ارزیابی خطر و استفاده ایمن از تکنولوژی DNA نو ترکیب را شامل می‌شود. چهار سطح ایمنی زیستی (BSL)^۱ که به ترتیب با افزایش شماره از نظر میزان خطر افزایش می‌یابد در نظر گرفته شده است. به عنوان مثال، در رابطه با تزریق داخل عضلانی آدنوویروس ۵ نشان داده شده است که ناقل غالباً در نزدیکی محل تزریق و گره‌های لنفاوی تا ۶ ماه باقی می‌ماند. مقادیر کمی از الحاق به داخل DNA کروموزومی با میزان جهش 2×10^{-7} جهش در سلول مشاهده شده است. میزان جهش خود به خودی سلول برابر با 2×10^{-6} و بنابراین ۱۰ برابر بیشتر می‌باشد. آدنوویروس ۵ در ایمنی زیستی سطح ۲ (BSL-2)^۲ دسته بندی می‌شود.

ناقل واکسن‌های زنده می‌تواند ایمنی مخاطی و همچنین ایمنی‌های سیستمیک همورال و سلولی را القا نماید. یکی از مشکلات جدی استفاده از تکنولوژی ناقل واکسن‌ها این است که زمانی که یک بار مورد استفاده قرار می‌گیرند، به دلیل القای پاسخ‌های ایمنی توسط ناقل و شناسایی شدن ناقل توسط آنتی بادی‌ها در مواجهه دوباره با سیستم ایمنی نمی‌توان برای دومین بار همان ناقل را در همان بیمار به طور مؤثری استفاده نمود. بر این اساس، خاطره ایمنی پیشین بر علیه میکروارگانیسم ناقل می‌تواند منجر به ناکارآمدی استفاده از بوستر (دومین تجویز واکسن) و عدم تأثیر واکسیناسیون شود. استفاده از سیستم واکسیناسیون پرایم-بوستر هترولوگ^۳ و پرایمینگ با ناقل می‌تواند به برطرف شدن مانع ذکر شده منجر گردد.

۱-۳-۴ ناقل واکسن‌های ویروسی

استفاده از ناقل ویروس‌های نو ترکیب، تکنولوژی قدرتمندی برای تحویل آنتی ژن‌های هترولوگ می‌باشد. توانایی ناقل ویروس‌ها در آلوده کردن سلول‌های میزبان و به دنبال آن بیان آنتی ژن هترولوگ که ممکن است وارد مسیر ترشحی شود و یا به مسیرهای فرایند داخل سلولی

1. Biosafety Levels

2. Biosafety Level 2

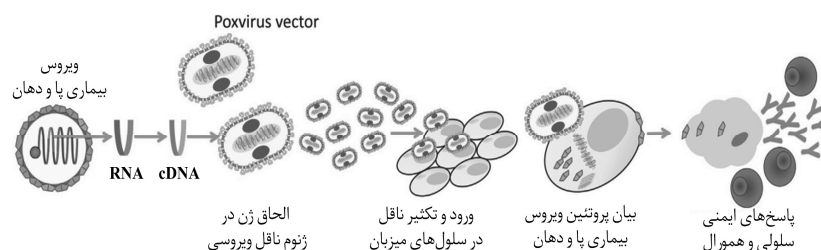
3. Heterologous prime-boost vaccination

هدایت گردد، می‌تواند القای کارآمد هر دو نوع پاسخ ایمنی سلولی و همورال را به‌دنبال داشته باشد. این روش در مقایسه با واکسن‌های زیر واحد دارای مزیت است زیرا که القای سلول‌های T سلول‌کش که با کارایی بالایی به‌دنبال تجویز ناقل ویروس انجام می‌شود، برای از بین بردن عوامل بیماری‌زای داخل سلولی دارای اهمیت می‌باشد. ناقل‌های ویروسی به دلیل بیان الگوهای مولکولی مربوط به عوامل بیماری‌زا (PAMPs)^۱ که فعال‌کننده‌های سیستم ایمنی ذاتی هستند، به‌طور ذاتی دارای ویژگی‌های ادجوانتی می‌باشند. حذف هدفمند ژن یا ژن‌های دارای نقش در توانایی تکثیر ناقل ویروسی می‌تواند تضمین‌کننده بی‌خطری استفاده از ناقل ویروس‌ها برای انسان باشد. با این حال، تعدادی از ناقل ویروس‌هایی که توانایی تکثیر دارند می‌توانند بدون نگرانی از خطر، مورد استفاده قرار گیرند و فراهم‌کننده ایمنی مناسب با دوزهای کمتر ناقل ویروسی باشند.

دو مورد از واکسن‌های ناقل ویروسی که برای مصرف انسان مجوز استفاده دریافت کرده‌اند عبارت‌اند از واکسن ChimeriVax-JE بر علیه آنسفالیت ژاپنی (JE)^۲ با نام تجاری IMOJEV محصول شرکت Sanofi Pasteur کشور فرانسه حاوی ناقل ویروس تب زرد (YFV)^۳ که کدکننده دو پروتئین از ویروس آنسفالیت ژاپنی می‌باشد، و نیز واکسن چهارگانه دنگی^۴ با نام تجاری Dengvaxia محصول شرکت Sanofi Pasteur کشور فرانسه حاوی ناقل ویروس تب زرد کدکننده چهار پروتئین از ویروس دنگی. واکسن ChimeriVax-JE محصول شرکت Sanofi Pasteur کشور فرانسه برای اولین بار در سال ۲۰۱۰ در استرالیا مجوز استفاده دریافت کرد و از نظر بی‌خطری و ایمنی‌زایی در بچه‌های ۱۲ سال به بالا بسیار خوب ارزیابی شده است. واکسن Dengvaxia اخیراً در برزیل و مکزیک به‌دنبال ارزیابی‌های کلینیکی موفق برای استفاده در بچه‌ها و بالغین بین ۹ تا ۴۵ سال مجوز استفاده دریافت کرده است.

استفاده از ناقل‌های ویروسی جهت واکسیناسیون در دامپزشکی نیز در تحقیقات زیادی مورد توجه قرار گرفته است. از جمله ناقل‌های ویروسی که مجوز استفاده دریافت کرده‌اند می‌توان از ویروس آبله‌پرنده‌گان کدکننده آنتی‌ژن هماگلوتینین ویروس آنفلوانزا برای استفاده در

1. Pathogen-associated molecular patterns
2. Japanese encephalitis
3. Yellow fever virus
4. Tetravalent dengue vaccine



شکل ۲-۴ اساس طراحی و عملکرد ناقل واکسن ویروسی. در این مثال ژن کدکننده پروتئین کپسیدی ویروس تب برفکی وارد پاکس ویروس (ناقل) می‌گردد. ناقل جهت ایمنی‌زایی سلول‌های میزبان مورد استفاده قرار می‌گیرد.

پرنندگان با نام تجاری TROVAC-AIV-H5 محصول شرکت Merial کشور فرانسه و هرپس ویروس بوقلمون^۱ (HVT) به‌عنوان ناقل ویروسی برای واکسیناسیون بر ضد بیماری گامبورو با نام تجاری VaxxitexHVT + IBD محصول شرکت Merial کشور فرانسه نام برد.

۲-۳-۴ ناقل واکسن‌های باکتریایی

میکروارگانیزم‌های تخفیف‌حادث یافته شامل باکتری‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا همزیست را می‌توان برای تحویل آنتی‌ژن‌های هترولوگ جهت القای پاسخ‌های ایمنی میزبان بر علیه ناقل و همچنین عامل بیماری‌زایی که ژن آن در ناقل قرار گرفته است استفاده نمود. ناقل باکتری‌های زنده تخفیف‌حادث یافته می‌توانند پاسخ‌های ایمنی وسیعی شامل ایمنی موکوزال موضعی و نیز ایمنی سیستمیک شامل همورال و سلولی را القا نمایند. باکتری‌ها به‌عنوان ناقل واکسن‌های زنده برای بیان آنتی‌ژن‌های هترولوگ برای مدت بیشتر از ۳۰ سال مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. این تکنولوژی برای القای پاسخ‌های ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زای باکتریایی، ویروسی، پروتوزوآ و متازوآ در مدل‌های حیوانی و آزمایشات بالینی مورد استفاده قرار گرفته است. ناقل واکسن‌های باکتریایی دارای چندین مزیت می‌باشند: (۱) ساخت آسان و کم‌هزینه با قابلیت تولید انبوه؛ (۲) قابلیت استفاده از روش‌های مختلف جهت تجویز واکسن به‌خصوص مسیر دهانی موکوسی برای القای پاسخ‌های ایمنی وسیع‌الطیف؛ (۳) وجود جهش‌های شناخته‌شده برای ایجاد تخفیف‌حادث؛ (۴) وجود ناقل باکتری‌های حساس به آنتی‌بیوتیک جهت شروع

1. Herpes virus of turkey

درمان ضد ناقل در صورت مشاهده عوارض نامطلوب. باکتری‌های بیماری‌زای زنده تخفیف حدت یافته مانند مایکوباکتریوم، سالمونلا و بردتلا^۱ معروفترین ناقل‌های زنده هستند که تاکنون مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این ناقل‌ها به‌خوبی برای شروع عفونت از طریق سطوح موکوزال سازگار هستند. مهمترین ویژگی منفی واکسن‌های زنده شامل تخفیف حدت یافتن ناکافی و احتمال بازگشت به وضعیت بیماری‌زا می‌باشد.

باکتری‌های لاکتوباسیل از جمله لاکتوباسیلوس پلاتاروم^۲ از نظر ایمنی زیستی، از دسته میکروارگانیسم‌های سالم محسوب می‌شوند و در دهه گذشته به‌عنوان ادجوانت‌های قوی برای واکسن‌های موکوزال مورد استفاده قرار گرفته‌اند. لاکتوباسیلوس پلاتاروم به‌عنوان تحویل‌دهنده آنتی‌ژن در برابر بیماری طاعون^۳ که توسط یرسینیا پستیس^۴ ایجاد می‌شود مورد استفاده قرار گرفته است. ویژگی بی‌خطر بودن باکتری‌های لاکتیک اسید برای مصارف انسانی، آنها را به‌عنوان ناقل‌های مناسبی برای تحویل مولکول‌های درمانی و پیشگیری‌کننده برای انسان مطرح کرده است. در رابطه با استفاده از باکتری‌های لاکتیک اسید به‌عنوان ناقل واکسن نشان داده شده است که بالاترین میزان پاسخ‌های سیستم ایمنی با تولید آنتی‌ژن‌های سطحی متصل به دیواره سلولی باکتری ناقل در مقایسه با دو روش تولید داخل سلولی و ترشح خارج سلولی ایجاد شده است.

۴-۴ پارتیکل‌های شبه‌ویروسی

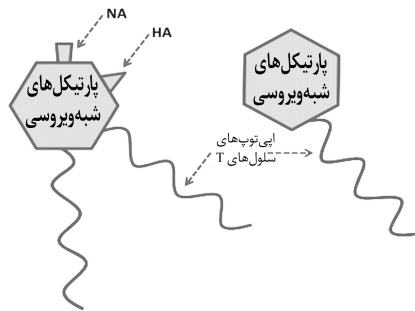
بسیاری از پروتئین‌های ساختاری ویروس‌ها دارای توانایی ذاتی در خودآرایش^۵ و ایجاد پارتیکل‌های شبه‌ویروسی (VLPs)^۶ می‌باشند. پارتیکل‌های شبه‌ویروسی از لحاظ سازماندهی و ساختاری مشابه با ویروس وحشی هستند که از آن مشتق شده‌اند، با این تفاوت که فاقد ژنوم ویروسی هستند و کاندید واکسن بی‌خطرتری را ایجاد می‌کنند. بر این اساس، به‌دلیل مشابهت آنتی‌ژنیک و ویژگی‌های فیزیکی و ایمنی‌زایی به ویروس وحشی می‌توانند بدون نیاز به ادجوانت به‌عنوان واکسن‌هایی مؤثر و یا به‌عنوان پایه‌ای برای عرضه آنتی‌ژن‌های خارجی

1. Bordetella
2. Lactobacillus plantarum
3. Plague disease
4. Yersinia pestis
5. Self-assembly
6. Virus-like particles

استفاده کردند. قدرت این واکسن‌ها با حذف پروتئین‌های وحشی ویروس که تضعیف‌کننده پاسخ‌های سیستم ایمنی هستند افزایش می‌یابد. درمورد این واکسن‌ها ایجاد تخفیف حدت یا غیرفعال‌سازی لازم نیست؛ این مسئله از آنجایی حائز اهمیت است که معمولاً فرایند غیرفعال‌سازی با ایجاد تغییراتی در اپی‌توپ‌ها همراه است. درمقایسه با استفاده از پروتئین‌ها یا پپتیدها به‌تنهایی، پارتیکل‌های شبه‌ویروسی اپی‌توپ‌های فضایی مشابه ویروس وحشی را به سیستم ایمنی عرضه می‌کنند؛ بنابراین، انتظار می‌رود پاسخ‌های آنتی‌بادی قوی‌تری القا شود. اکثر پارتیکل‌های شبه‌ویروسی بین ۲۰ و ۱۰۰ نانومتر قطر دارند، اندازه‌ای که به آنها اجازه می‌دهد تا آزادانه وارد عروق لنفاوی و سپس گره‌های لنفی شوند و به‌طور کارآمد توسط سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن برداشت شوند. همچنین پارتیکل‌های شبه‌ویروسی ساختاری دارند که نقش مهمی در فعال‌سازی سلول‌های B ایفا می‌کنند. اپی‌توپ‌های چندگانه و تکراری که بر روی ساختار پارتیکل‌های شبه‌ویروسی وجود دارد می‌تواند بین گیرنده‌های سطحی سلول B واکنش متقاطع ایجاد کرده و منجر به القای قوی سلول‌های B و ایجاد پاسخ‌های قوی و پایدار آنتی‌بادی شود. قدرت پارتیکل‌های شبه‌ویروسی می‌تواند فراهم‌کننده پاسخ حفاظتی در دوزهای پایین‌تر آنتی‌ژن باشد که می‌تواند به‌میزان قابل‌توجهی به کاهش هزینه ساخت واکسن منجر شود.

استفاده از پارتیکل‌های شبه‌ویروسی به‌عنوان واکسن برای سال‌ها مورد بررسی قرار گرفته است و اولین واکسن بر پایه پارتیکل‌های شبه‌ویروسی در سال ۱۹۸۱ برای بیماری هپاتیت B با نام تجاری HEPTAVAX-B محصول شرکت مرک کشور آمریکا مجوز استفاده دریافت کرد. اخیراً دو واکسن بر پایه پارتیکل‌های شبه‌ویروسی بر علیه بیماری پاپیلوما‌ی انسانی به‌نام‌های Gardasil1 محصول شرکت مرک کشور آمریکا و Cervarix1 محصول شرکت GlaxoSmithKline کشور انگلستان توسط سازمان غذا و داروی آمریکا مجوز استفاده دریافت کرده‌اند. این واکسن‌ها به‌ترتیب در سلول‌های مخمر و حشرات تولید می‌شوند.

یکی از کاربردهای جالب پارتیکل‌های شبه‌ویروسی در تهیه واکسن علیه ویروس‌هایی است که دچار تغییرات ژنتیکی می‌شوند. همین اتفاق در ویروس آنفلوآنزای H5N1 در پاندمی سال ۲۰۰۹ رخ داد. برای مواجهه با چنین ویروس‌هایی امکان آن وجود دارد که



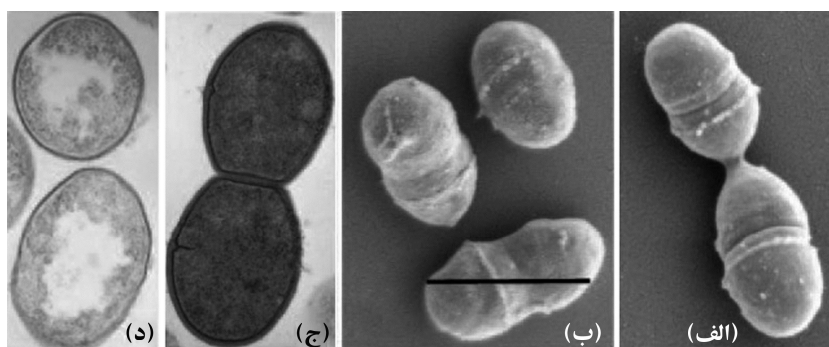
شکل ۳-۴ اپی‌توپ‌های T متصل به آنتی‌ژن‌های NA و HA ویروس آنفلوانزا در سطح پارتیکل‌های شبه‌ویروسی (VLP).

اپی‌توپ‌های محافظت‌شده‌ای از سلول T، به آنتی‌ژن‌های آنفلوانزا در سطح VLP متصل شده و مولکول‌هایی را به نام T-epitope kites ایجاد کنند که شکل مولکولی شبیه به کایت دارند (شکل ۳-۴). این نوع واکسن‌ها پاسخ‌های ایمنی مؤثرتری ایجاد می‌کنند.

۴-۵ پارتیکل‌های شبه‌باکتریایی^۱

این ذرات براساس باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس (*Lactococcus lactis*) غیرنو ترکیب هستند، که یک باکتری گرم مثبت بی‌ضرر بوده و معمولاً در صنایع غذایی استفاده می‌شود. این باکتری در سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA)، بی‌خطر شناخته شده است. این ویژگی، باکتری را برای استفاده در واکسن بسیار مناسب می‌کند. سطح سلول باکتری‌های گرم مثبت شامل یک غشای تک‌لایه در داخل و یک دیواره سلولی ضخیم در خارج است. سلول‌های دیواره از لایه‌های متعدد پپتیدوگلیکان با اجزای مختلف دیگر ساخته شده است که ممکن است اجزای آن در داخل و خارج متفاوت باشد. تیمار با مواد شیمیایی خاص، اجزای داخل سلولی مانند DNA را از بین می‌برد. قطعات همراه دیواره سلولی از جمله پپتیدوگلیکان سفت و سخت نیز تخریب می‌شود. در نتیجه، ذرات غیرزنده، همان شکل و اندازه را به‌عنوان باکتری قبل از تیمار، حفظ می‌کنند.

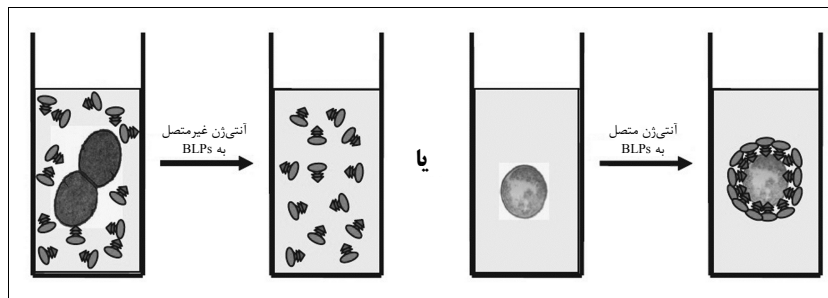
1. Bacterium-like particles (BLPs)



شکل ۴-۴ (الف) و (ب): عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، (ج) و (د): میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس طبیعی (الف و ج) و شبه‌باکتری حاصل از آن (ب و د).

پارتیکل‌های شبه‌باکتریایی در دو شکل متفاوت استفاده می‌شوند. آنها به‌عنوان محرک سیستم ایمنی به‌سادگی با آنتی‌ژن واکسن مخلوط شده و استفاده می‌شوند. این شکل به‌خصوص در فرمول واکسن‌های موجود استفاده می‌شود. شکل دیگر، استفاده در واکسن نو ترکیب بوده که در آن آنتی‌ژن به سطح BLPs متصل است. اتصال آنتی‌ژن به BLPs نیازمند حضور یک تگ اتصال یا Protan در آنتی‌ژن است. تا به امروز، بیش از ۴۰ آنتی‌ژن مختلف باکتریایی، ویروسی و یا انگلی حاوی Protan با موفقیت تولید شده است. BLPs پس از تخلیص، شستشو و فرموله‌شدن در یک بافر مناسب به Protan متصل می‌شود.

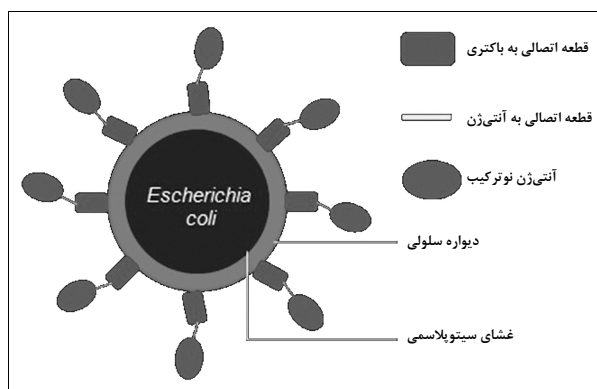
واکسن‌های تولید شده با این شیوه بیشتر به‌صورت مخاطی مورد استفاده قرار می‌گیرند که در مقایسه با واکسن‌های تزریقی فعلی و کلاسیک، علاوه بر سهولت کاربرد بدون سوزن، توانایی القای هردو پاسخ ایمنی سیستمیک و موضعی در سطح مخاط را دارا می‌باشند و حفاظت گسترده‌تری فراهم می‌کنند. نتایج مشاهدات حاصل از مرحله اول کارآزمایی بالینی واکسن FluGEM-A که با این روش و علیه آنفلوانزا تولید شده است، این مطالب را تأیید می‌نماید. استفاده داخل بینی FluGEM-A موجب افزایش تیتراژ آنتی‌بادی سیستمیک و پاسخ ایمنی موضعی می‌گردد و به‌طور کلی موجب بهبود محافظت در برابر آنفلوانزا خواهد شد.



شکل ۴-۵ پارتیکل‌های شبه‌باکتریایی به صورت متصل و یا غیرمتصل به آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زا، مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۴-۶ واکسن‌های باکتریایی و ویروسی تخفیف حدت یافته نو ترکیب

در حال حاضر، پیشرفت در زمینه‌های زیست‌شناسی مولکولی و مهندسی ژنتیک امکان ایجاد واکسن‌هایی را با توانایی ارائه آنتی‌ژن هترولوگ فراهم نموده است. در این روش، از ظرفیت ایمنی‌زایی باکتری و ویروس زنده واکسن برای ایجاد پاسخ ایمنی علیه آنتی‌ژن‌های واکسن و همچنین پروتئین هترولوگ بیان شده در آنها، به عنوان واکسن نو ترکیب زنده استفاده می‌گردد. استفاده از واکسن‌های باکتریایی زنده تخفیف حدت یافته جدید نیست. با این حال، استفاده از آنها به عنوان حامل و یا حامل برای بیان آنتی‌ژن هترولوگ نشان‌دهنده یک فناوری با کاربرد گسترده بوده که ممکن است تأثیر قابل توجهی در توسعه واکسن داشته باشد. پیشرفت‌های قابل توجهی در زیست‌شناسی مولکولی برای حذف دقیق ژن فاکتورهای بیماری‌زای مهم، همچنین وارد نمودن DNA نو ترکیب به واکسن غیر بیماری‌زا رخ داده است. حامل‌های باکتریایی مزایای بسیاری دارند که آنها را برای سیستم‌های ارائه آنتی‌ژن هترولوگ جذاب می‌کند. آنها می‌توانند پاسخ ایمنی همورال و یا سلولی را تحریک کنند و همچنین به صورت خوراکی تجویز گردند و در نتیجه موجب ایمنی مخاطی شوند. چند باکتری، مانند مایکوباکتریوم بوویس، لیستریا مونوسیتوزنز، سالمونلا و شیگلا، همگی به عنوان حامل مطرح بوده و قادر به ایجاد پاسخ‌های ایمنی در برابر پاتوژن‌های ویروسی، باکتریایی، تک‌یاخته‌ای و عوامل بیماری‌زای چندیاخته‌ای در مدل‌های حیوانی هستند. به عنوان مثال، واکسن Pneumovax که توسط کمپانی مرک آمریکا ساخته شده است انسان را در مقابل طیف وسیعی از پنوموکوک‌ها ایمن می‌نماید.



شکل ۴-۶ واکسن نو ترکیب باکتریایی به همراه آنتی‌ژن ثانویه بیان شده در سطح آن.

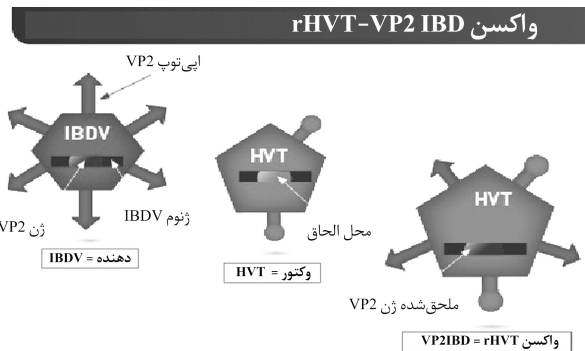
اخیراً، مطالعات زیادی در مورد استفاده از BCG^۱ نو ترکیب به عنوان وسیله‌ای برای افزایش محافظت در برابر سل انجام شده است. واکسن BCG نو ترکیب موجب القاء پاسخ ایمنی بهتر بدن در مقایسه با BCG استاندارد در مدل‌های حیوانی شده است و این واکسن در کارآزمایی‌های بالینی تحت ارزیابی می‌باشد.

یکی دیگر از کلاس‌های مهم ارائه آنتی‌ژن هترولوگ، حامل‌های ویروسی است. استفاده از حامل‌های ویروسی در توسعه واکسن به تازگی بررسی شده است. واکسن‌های حاملی ویروسی با ارائه آنتی‌ژن در داخل سلول میزبان و پردازش آنتی‌ژنی، از طریق کلاس اصلی کمپلکس سازگاری بافتی (MHC) کلاس یک، بر روی سطح سلول‌های آلوده ظاهر شده و القاء پاسخ‌های ایمنی سلولی را در پی دارد. طیف گسترده‌ای از حامل‌های ویروسی تحت بررسی به عنوان حامل واکسن وجود دارد. به عنوان مثال، واکسن VAXXITEK HVT + IBD که توسط شرکت مریال فرانسه ساخته شده است جوجه را علیه بیماری گامبورو و مارک ایمن می‌نماید.

۴-۷ شبیح باکتریایی^۲

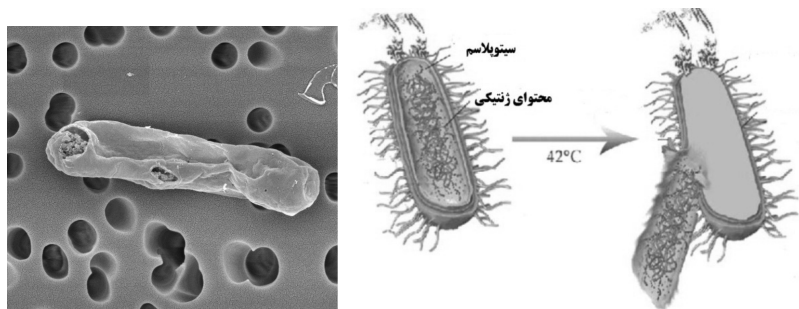
شبیح باکتریایی اصطلاحی است که برای باکتری‌هایی به کار برده می‌شود که محتوای سیتوپلاسمی آنها به طور کامل خارج شده است بدون آنکه دیواره آنها از بین برود و یا حالت

1. Bacillus Calmette-Guérin 2. Bacterial ghost (BG)



شکل ۴-۷ نمونه‌ای از واکسن‌های ویروسی نو ترکیب.

نرمال خود را از دست بدهند. نحوه ساخت آن به‌طور کلی از طریق بیان کنترل‌شده ژن لیزکننده گرفته‌شده از یک فاژ است. محصول این ژن، پروتئینی را رمز می‌کند که با نفوذ در غشای باکتری در آن ایجاد کانالی با قطر حداکثر $1\mu\text{m}$ می‌کند که تمامی محتویات سلولی از طریق این کانال و در اثر فشار اسمزی محیط کشت به بیرون نشت می‌کند. با توجه به اینکه کانال در دیواره باکتری ایجاد می‌شود، تنها می‌توان آن را بر روی باکتری‌های گرم منفی ایجاد کرد و انواع گرم مثبت برای این منظور مناسب نیستند. این کانال می‌تواند برای وارد کردن مواد خارجی به داخل BG نیز مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۴-۸ نحوه تشکیل شبیح باکتری با ایجاد حفره در غشای سیتوپلاسمی (راست) و تصویر میکروسکوپ الکترونی از یک شبیح باکتریایی (چپ).

اهمیت این روش در آن است که دیواره باکتری سالم می ماند و در ایمنی زایی نقش مؤثری بازی می کند. دیواره باکتری‌ها دارای PAMP^۱ می باشند که توسط مولکول‌هایی به نام شناساگرهای الگو یا Pattern Recognition Receptor که بر روی سلول‌های سیستم ایمنی میزبان وجود دارند شناسایی می شوند. وجود PAMP بر روی یک ساختار باعث می شود تا این جزء به سرعت توسط سلول‌های سیستم ایمنی شناسایی و به روش‌های مختلف حذف شود. یکی از این روش‌ها، فاگوسیتوز است که توسط ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک انجام می شود. این سلول‌ها از اصلی ترین نقش آفرینان در سیستم ایمنی ذاتی می باشند که همچنین باعث می شوند تا واکسن‌ها مؤثر عمل کنند. این سلول‌ها که اصطلاحاً ارائه دهنده‌گان آنتی ژن نیز نامیده می شوند، با برداشت آنتی ژن خارجی آن را به سایر سلول‌های سیستم ایمنی ارائه می دهند و در نتیجه ایجاد پاسخ مؤثر در برابر عامل خارجی را تضمین می کنند.

شیخ باکتریایی با داشتن این مولکول‌ها بر روی خود به عنوان یک عامل خارجی شناخته می شود و بلافاصله توسط فاگوسیتوز سلول‌های بیگانه خوار از محیط بدن میزبان حذف می گردد. این ساختارها با وارد شدن به داخل سلول‌های بیگانه خوار تجزیه می شوند و سپس این مواد و مولکول‌ها بر روی مولکول‌های MHC کلاس ۱ و ۲ در سطح سلول به سایر اعضای سیستم ایمنی ارائه می شوند. این عمل باعث می شود تا ایمنی قابل توجهی نسبت به BG وارد شده در بدن میزبان ایجاد گردد. به علاوه، چون آنتی ژن‌ها بر روی هر دو کلاس سیستم ایمنی ارائه می گردند، هر دو بازوی سیستم ایمنی (همورال و سلولی) برانگیخته می شود که این از لحاظ کارایی واکسن بسیار اهمیت دارد.

در کنار ویژگی ذکر شده، باید به این نکته نیز اشاره کرد که با وارد کردن آنتی ژن خارجی به داخل BG به صورت پروتئین و یا به صورت DNA (DNA واکسن) می توان پاسخ ایمنی در برابر این آنتی ژن را نیز ایجاد کرد. این موضوع در کنار اینکه BG به سرعت توسط سلول‌های بیگانه خوار برداشته می شود، باعث افزایش ارائه آنتی ژن مورد نظر به سلول‌های سیستم ایمنی می شود.

ویژگی منحصر به فرد دیگر BG خاصیت ادجوانتی آن است. این ساختار به واسطه داشتن PAMP بر روی خود می تواند PRRs در سیستم ایمنی که عمدتاً گیرنده‌های شبه تول^۲ هستند

1. Pathogen-associated molecular patterns 2. Toll like receptors (TLRs)

را تحریک کند. تحریک شدن TLRs به ایجاد پاسخ‌های ایمنی ذاتی منجر می‌شود که در نهایت منجر به افزایش پاسخ به آنتی‌ژن می‌شوند. از لیگاندهای TLRs که به‌طور معمول به‌عنوان ایمونوآدجوانت در DNA واکسن‌ها استفاده می‌شوند می‌توان به موتیف‌های CpG اشاره کرد که تحریک کننده TLR9 هستند.

ویژگی بسیار مهم بعدی نحوه تجویز BG به‌عنوان واکسن است. این روش برای تجویز از راه موکوزی و خوراکی ایده‌آل است که این نیز ناشی از سالم بودن دیواره آن می‌باشد که باعث می‌شود به‌سرعت توسط M-Cells^۱ که در سطح اپیتلیوم غشای مخاطی هستند برداشته شوند. بدیهی است که انواع بی‌نیاز به تزریق واکسن از ارجحیت بیشتری برای تولید برخوردارند.

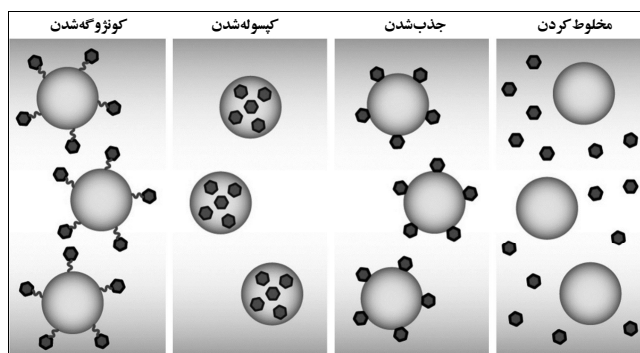
پایداری از دیگر ویژگی‌های مهم BG است. این ساختارها را می‌توان به‌وسیله فریزدرایر به‌صورت لیوفیلیزه تبدیل کرد و به‌آسانی از نقطه‌ای به نقطه‌ای دیگر منتقل نمود. به‌علاوه، در این حالت BG برای سال‌ها بدون ازدست‌دادن ویژگی‌های خود، پایدار است. شبح باکتریایی را می‌توان تقریباً از تمامی باکتری‌های گرم منفی ساخت. ازلحاظ نحوه تولید در مقیاس صنعتی، BG را می‌توان به‌سهولت در فرماتور تولید کرد. همچنین هزینه تولید BG به‌نسبت سایر واکسن‌ها و تولیدات وابسته به آنها، پایین‌تر است.

نمونه‌ای از واکسن ساخته‌شده توسط این تکنولوژی، واکسن OCUVAC است که توسط مرکز تحقیقاتی Laura Bassi در وین اتریش علیه کوری ناشی از *Chlamydia trachomatis* ساخته شده و در مراحل نهایی اخذ تأییدیه مصرف می‌باشد.

۴-۸ نانو واکسن‌ها

فناوری نانو در زمینه طراحی نانوذرات مختلف برای استفاده در حوزه پزشکی نیز فعالیت دارد. درواقع، نانوذرات، انقلابی در تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری‌ها ایجاد کرده‌اند. استفاده از فناوری نانو در علوم مربوط به واکسن، منجر به تولد علم جدید «Nano vaccinology» شده است. در هر دو روش پیشگیری و درمان، نانوذرات به‌صورت یک سیستم تحویل‌دهنده به‌منظور افزایش پردازش آنتی‌ژن استفاده می‌شوند و موجب افزایش فعالیت سیستم ایمنی می‌شوند.

1. Microfold cells



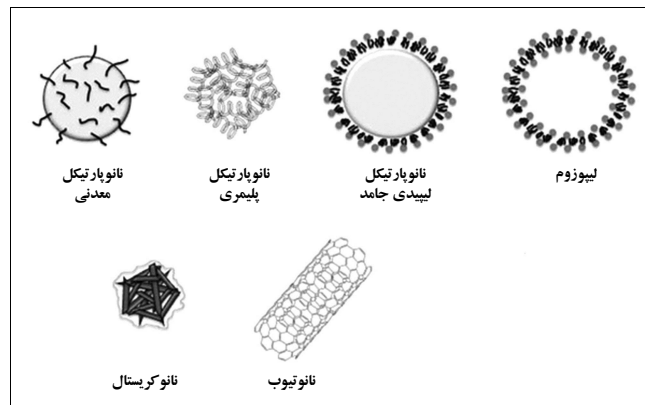
شکل ۹-۴ روش‌های اتصال آنتی‌ژن‌ها و نانوذرات.

تعدادی از واکسن‌ها که با استفاده از تکنولوژی نانو ساخته شده‌اند برای استفاده در انسان تأیید شده‌اند، مانند Inflexal V و Epaxal که به ترتیب در شرکت‌های Berna کشور سوئیس و Cruceal کشور اسپانیا ساخته می‌شود.

۱-۸-۴ انواع نانوذرات

نانوذرات پلیمری: پلیمرهایی مانند پلی‌L-لاکتیک اسید (PLA) و پلیمرهای طبیعی مانند پلی‌ساکاریدها، در سنتز نانوذرات آبدوست استفاده شده‌اند. نانوذرات کیتوزان به طور گسترده‌ای در تحویل آنتی‌ژن، مانند آنتی‌ژن کلستریدیوم بوتولینوم نوع A، زیر واحد نوروتوکسین HC در واکسن داخل بینی، و آنتی‌ژن نو ترکیب NcPDI برای واکسیناسیون نئوسپورا استفاده شده است.

نانوذرات معدنی: بسیاری از نانوذرات معدنی برای استفاده در واکسن‌ها مطالعه شده‌اند. اگرچه این نانوذرات عمدتاً از نظر زیستی غیرقابل تجزیه هستند، اما مزیت آنها ساختارهای سخت و کنترل سنتز آنها می‌باشد. نانوذرات طلا (AuNPs) در تحویل واکسن استفاده می‌شوند. آنها را به راحتی می‌توان به شکل‌های مختلف (کروی، میله، مکعب و غیره) با اندازه ۲ تا ۱۵۰ نانومتر تبدیل کرد. نانوذرات کربن، یکی دیگر از ترکیبات معمول مورد مطالعه برای تحویل دارو و واکسن هستند. آنها به خاطر سازگاری خوب شناخته شده‌اند و می‌توانند به انواع نانولوله‌ها تبدیل شوند. یکی از مواد معدنی مستعد برای Nano vaccinology، سیلیس است.



شکل ۱۰-۴ انواع نانوذرات.

نانوذرات مبتنی بر سیلیکا (SiNPs) زیست‌سازگار بوده و دارای خواص بسیار عالی به‌عنوان نانوذرات برای کاربردهای مختلف، مانند هدف‌قراردادن انتخابی تومور، تصویربرداری زنده از بافت و تولید واکسن هستند.

نانوذرات کلسیم فسفات را می‌توان با مخلوط کردن کلرید کلسیم، فسفات سدیم و سترات سدیم تحت شرایط خاصی ایجاد کرد. آنها غیرسمی هستند و می‌توانند در اندازه ۵۰ تا ۱۰۰ نانومتر تشکیل شوند. این نانوذرات به‌عنوان ادجوانت برای واکسن‌های DNA و ایمنی مخاطی مفید بوده و سازگاری بسیار عالی نشان می‌دهند.

لیپوزوم‌ها: لیپوزوم توسط فسفولیپیدهای زیست‌تخریب‌پذیر و غیرسمی تشکیل می‌شود. لیپوزوم‌ها می‌توانند آنتی‌ژن را در محفظه‌ای برای تحویل قرار داده و ویروزم‌ها را، از جمله در آنفلوانزا، تشکیل دهند.

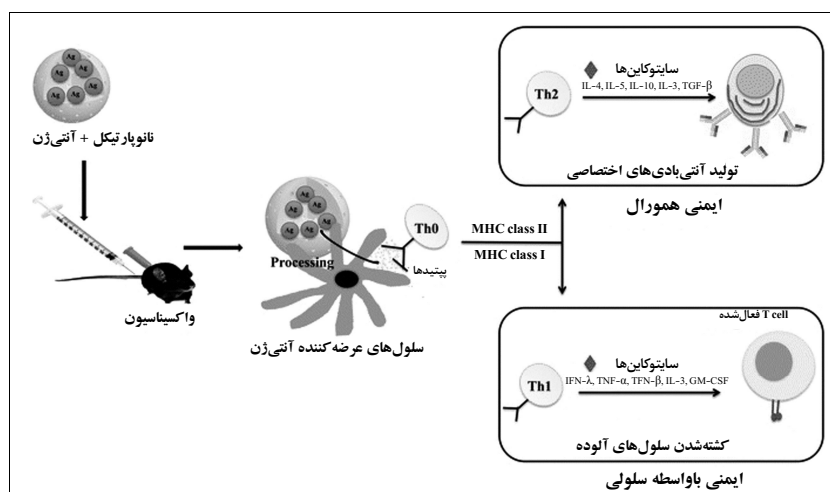
کمپلکس‌های محرک ایمنی (ISCOM): این کمپلکس‌ها ذرات قفس‌مانند در اندازه حدود ۴۰ نانومتر، ساخته شده از ادجوانت کوئیل A، کلسترول، فسفولیپیدها و پروتئین‌های آنتی‌ژنیک هستند. آنتی‌ژن‌های مختلف به فرم ISCOM در قالب واکسن استفاده شده‌اند، از جمله آنتی‌ژن به‌دست‌آمده از آنفلوانزا، ویروس هرپس سیمپلکس، HIV^۲ و ویروس بیماری نیوکاسل.

1. Immune stimulating complexes (ISCOMs)
2. Human Immunodeficiency Virus

نانوامولسیون: نوع دیگری از نانوذرات که به‌عنوان ادجوانت در تحویل واکسن‌ها استفاده می‌شود، نانوامولسیون است. این نانوذرات می‌توانند به‌اشکال روغن در آب و یا آب در روغن، با اندازه قطرات ۵۰ تا ۶۰۰ نانومتر وجود داشته باشند. امولسیون می‌تواند آنتی‌ژن را در داخل خود حمل کرده و یا به‌سادگی با آنتی‌ژن مخلوط شود. امولسیون روغن در آب MF59TM به‌عنوان ادجوانت، در بیش از ۲۰ کشور دارای مجوز بوده و استفاده می‌شود.

۲-۸-۴ واکنش‌های نانوذرات با سلول‌های آنتی‌ژن

ترکیب آنتی‌ژن و نانوذرات باعث تأثیرگذاری بیشتر آنتی‌ژن بر سلول‌های سیستم ایمنی و پاسخ ایمنی قوی‌تر می‌شود. سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها اغلب به‌عنوان هدف اصلی در طراحی واکسن هستند. برای توسعه واکسن‌های نانوذره‌ای، درک خوبی از سلول‌های دندریتیک و مکانیزم‌های جذب ماکروفاژ و فعل‌وانفعالات نانوذرات با این سلول‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که اندازه، شارژ و شکل نانوذرات نقش قابل‌توجهی در جذب آنتی‌ژن بازی می‌کنند.



شکل ۱۱-۴ فعال‌شدن سیستم ایمنی توسط نانوذرات.

در سال‌های اخیر، طیف گسترده‌ای از نانوذرات توسعه یافته و به‌عنوان ناقل آنتی‌ژن و یا محرک سیستم ایمنی به کار رفته‌اند. علاوه‌براین، نه‌تنها نانوذرات به‌طور فزاینده برای ارائه آنتی‌ژن موردنظر، بلکه به‌عنوان ادجوانت نیز به کار می‌روند. با این حال، هنوز استفاده از نانوذرات در واکسن‌ها و همچنین تحویل دارو در مراحل اولیه توسعه قرار دارد. تعدادی از چالش‌ها، ازجمله سنتز نانوذرات مناسب، عدم درک کامل از خواص فیزیکی نانوذرات و توزیع زیستی و چگونگی تأثیر بر سیستم بیولوژیکی در تمام سطوح از سلول تا بافت و کل بدن، هنوز باقی مانده است. با این وجود، با شناخت بیشتر و تجمیع خواص مختلف نانوذرات، سیستم‌های واکسن نوین با خصوصیات جدید ازجمله تک‌دز بودن و قابل تجویز بدون سوزن نیز در آینده نزدیک عملی خواهند شد.

۵. تکوین واکسن‌های نو ترکیب

مراحل تحقیق، توسعه و تولید واکسن شامل طی فازهای پیچیده و پرهزینه‌ای می‌باشد که از کار تحقیقاتی پایه شروع شده و پس از کارآزمایی‌های گسترده بالینی است که به اخذ جواز تولید ختم می‌شود. واکسن‌های کاندید شده ممکن است در هر یک از مراحل کارآزمایی در ایجاد ایمنی مؤثر، شکست خورده و حذف شوند (شکل ۱-۵). جدول ۱-۵ هزینه تحقیق و توسعه در هر یک از فازهای تکوین واکسن را نشان می‌دهد.



شکل ۱-۵ مراحل تحقیق و توسعه واکسن^(۱۰۲)

جدول ۱-۵ تخمین هزینه تحقیق و توسعه تولید واکسن (به میلیون دلار آمریکا)^(۱۰۲)

مراحل	کشف و پیش بالینی	فازهای ۱ و ۲	فاز ۳	اخذ جواز تولید	جمع
هزینه	۱۵ تا ۵	۴ تا ۱۰	۵۰ تا ۱۲۰	۲ تا ۳	۶۰ تا ۱۴۵
شانس موفقیت	۴۰٪	۳۳٪	۷۵٪	-	۱۰٪
هزینه با احتساب خطر					۱۳۵ تا ۳۵۰

از اهداف بسیار مهم در جهت تکوین و توسعه واکسن‌های نو ترکیب رعایت نکاتی است که به استفاده عملی از واکسن منجر شود. برای مثال، اگر قرار است واکسنی در مناطق گرم مورد استفاده قرار گیرد، لازم است در ساخت آن به این نکته نیز توجه شود که ممکن است ایجاد شرایط نگهداری طولانی مدت واکسن در دماهای پایین در چنین مناطقی فراهم نباشد. همچنین در بعضی مناطق صعب‌العبور ممکن است امکان تکرار تجویز واکسن میسر نباشد و لذا استفاده از واکسن‌هایی که نیازمند به تکرار تجویز دارند چندان مؤثر واقع نمی‌شود. موارد زیر، نکات عملی در تکوین و توسعه واکسن‌ها را مورد تأکید قرار می‌دهند.

۱-۵ قابلیت ساخت^۱

لازم است فرایند ساخت یک واکسن در شرایط تجاری و صنعتی راحت باشد. سادگی و تکرارپذیری روند تولید واکسن در شرایط صنعتی از اهمیت زیادی برخوردار است و به‌میزان بسیار قابل توجهی بر روی میزان هزینه‌های ساختاری تولید (به‌عنوان مثال، بیوراکتورهای تولید واکسن)، روند تولید، شرایط نگهداری واکسن تولیدشده، و شبکه‌های توزیع واکسن اثر می‌گذارد.

برای مثال، روش فعلی تولید واکسن آنفلوانزا از روند سخت و پیچیده‌ای برخوردار می‌باشد که بیش از ۷۰ سال پیش پایه‌گذاری شده است. در ساخت جهانی این واکسن، از سالانه ۷۰۰ میلیون تخم مرغ نطفه‌دار استفاده می‌شود. برای هر کدام از این واحدهای تولیدی (هر تخم مرغ)، بارورسازی تخم، تلقیح، انکوباسیون، مشاهده جنین با استفاده از نور، جمع‌آوری مایعات تخم، خالص‌سازی مایعات، غیرفعال‌سازی ویروس و فیلتراسیون اجرا می‌شوند. این فرایند پیچیده نیاز به برنامه‌ریزی طولانی مدت برای تولیدهای سالانه دارد و باتوجه به نیاز به تخم مرغ‌های SPF^۲ به راحتی قابلیت افزایش سطح تولید در آن امکان‌پذیر نمی‌باشد. افزایش سطح تولید در شرایط عود بیماری در مناطق مختلف دنیا غیرقابل اجتناب می‌باشد. درضمن، با توجه به تغییر مداوم سویه در گردش این ویروس، یک کارخانه تولیدکننده نیازمند آن خواهد بود تا در مدت کوتاهی نوع واکسن خود را نیز متوجه عامل

1. Manufacturability
2. Specific pathogen free

جدول ۵-۲ شکاف بین تولید و استفاده از واکسن آنفلوانزا. نیاز به افزایش تولید واکسن آنفلوانزا در شرایط عود بیماری در مواقع اپیدمی‌های گسترده و پاندمی جهت ایمن‌کردن جمعیت در معرض خطر بسیار افزایش می‌یابد. لذا قابل‌ساخت‌بودن واکسن یکی از معیارهای بسیار اساسی برای آن واکسن می‌باشد^[۸].

مدت زمان تولید	ظرفیت جهانی تولید (دوزهای ۱۵ میکروگرمی تک‌ظرفیتی)	پوشش واکسیناسیون در سطح جهان (درصد)
۱ سال	۱۰۰۰.۰۰۰.۰۰۰ دوز	۱۷
۲ سال	۲۵۰۰.۰۰۰.۰۰۰ دوز	۴۰
۴ سال و ۹ ماه	۶۵۰۰.۰۰۰.۰۰۰ دوز	۱۰۰

بیماری در گردش در آن منطقه و کشور کند. با این توضیحات آشکار می‌شود که روند فعلی تولید واکسن آنفلوانزا نیازمند به تغییر و بهبود می‌باشد و از «قابلیت ساخته‌شدن» خوبی برخوردار نیست. تغییر روند فعلی واکسن آنفلوانزا به روش‌های تولید مبتنی بر سلول، سادگی در روند تولید، مواد اولیه ارزانتر و در دسترس‌تر و دوره تولید کوتاه‌تری (۳ هفته برای افزایش تولید در مقابل ۴ تا ۵ ماه برای تولید در تخم مرغ SPF) را به‌ارمغان می‌آورد^[۳].

۵-۲ قابلیت افزایش میزان تولید^۱

قابل‌افزایش تولیدبودن یعنی همگام با افزایش میزان تولید، خصوصیات شیمیایی و بیولوژیک واکسن نیز حفظ شده و همان اثرات بالینی را که در هنگام انجام تست‌های آزمایشگاهی نشان داده است را به‌همراه داشته باشد. بدین‌منظور لازم خواهد بود خصوصیات شیمیایی و بیولوژیک واکسن در مراحل مختلف افزایش تولید به آزمایش گذاشته شوند.

۵-۳ قابل حمل و در دسترس بودن^۲

نحوه حمل واکسن، نگهداری طولانی‌مدت، و توزیع آن برای استفاده در افراد یک منطقه از موارد بسیار مهمی می‌باشند که موفقیت تجاری یک واکسن نو ترکیب را تعیین می‌کند. نیاز به زنجیره سرد برای حمل و مکان سرد برای نگهداری ممکن‌است در تمام نقاط یک کشور بالاخص مناطق فاقد زیرساختارهای جاده‌ای و بهداشتی امکان‌پذیر نباشد. یک راه‌حل مؤثر

1. Scalability

2. Deliverability and accessibility

برای اینکه بتوان واکسن را در چنین شرایطی استفاده کرد لیوفیلیزه کردن آن می‌باشد که در مورد همه واکسن‌ها امکان‌پذیر نیست. مسلماً بدین منظور استفاده از مواد تثبیت کننده مؤثر، بی‌خطر و ارزان ضروری است. راه حل دیگر این است که کارخانه‌های تولیدی کوچکتر به تعداد بیشتر در مناطق مختلف تأسیس شوند که هر کدام بتوانند نیاز یک منطقه را پوشش داده و واکسن را در کوتاهترین مدت پس از ساخت به مصرف کننده برسانند. در چنین مدلی نیاز به ذخیره طولانی مدت واکسن نمی‌باشد.

۴-۵ تغییرات فرایند تولید واکسن

در طول تاریخ، تغییرات متعدد در روند تولید واکسن و بهبود مسیر ساخت به طور مداوم مدنظر محققین بوده است. این تغییرات به منظور افزایش کارایی، کیفیت و ایمنی برای فرد استفاده کننده، سهولت ساخت، و قیمت ارزانتر اعمال شده‌اند (جدول ۳-۵).

جدول ۳-۵ تغییرات صورت گرفته در فرایند تولید واکسن^[۹۳]

ماهیت تغییر در فرایند ساخت واکسن	سال	دلیل تغییر
ساخت واکسن تک‌طرفیتی ← واکسن چندطرفیتی (کزاز، سیاه‌سرفه، دیفتری)	دهه ۱۹۴۰ میلادی	کاهش تعداد واکسیناسیون در زمان کودکان
استخراج پروتئین از پلاسما ← تولید پروتئین نو ترکیب (هیپاتیت B)	۱۹۸۶ میلادی	افزایش ایمنی برای فرد واکسینه شده
پلی‌ساکارید آزاد ← پلی‌ساکارید کونژوگه (هموفیلوس آنفلوانزا B)	۱۹۸۹ میلادی	ایمن کردن نوزادان علاوه بر بالغین
سلول کامل ← فاقد سلول (سیاه‌سرفه)	۱۹۹۱ میلادی	افزایش خلوص به منظور کاهش اثرات جانبی
زنده تخفیف حدت یافته ← غیرفعال شده (فلج اطفال)	۱۹۹۰ میلادی	افزایش ایمنی برای فرد واکسینه شده
غیرفعال شده ← زنده تخفیف حدت یافته (آنفلوانزا)	۱۹۹۳ میلادی	انتقال از طریق مخاط و اجتناب از تزریق
زنده تخفیف حدت یافته ← ویروس باز آرای شده (روتا و ویروس)	۲۰۰۶ میلادی	افزایش ایمنی برای فرد واکسینه شده
مشتق از تخم مرغ ← تکوین یافته در کشت سلول (آنفلوانزا)	۲۰۰۶ میلادی به بعد	افزایش سرعت و ظرفیت ساخت
فیلترای سلولی ← نو ترکیب (سیاه‌زخم)	۲۰۰۶ میلادی به بعد	افزایش کارایی و کاهش اثرات جانبی
وزیکول‌های غشای خارجی ← نو ترکیب (مننگوکوکوس B)	۲۰۰۶ میلادی به بعد	افزایش پوشش ایمنی در مقابل سویه‌های مشابه

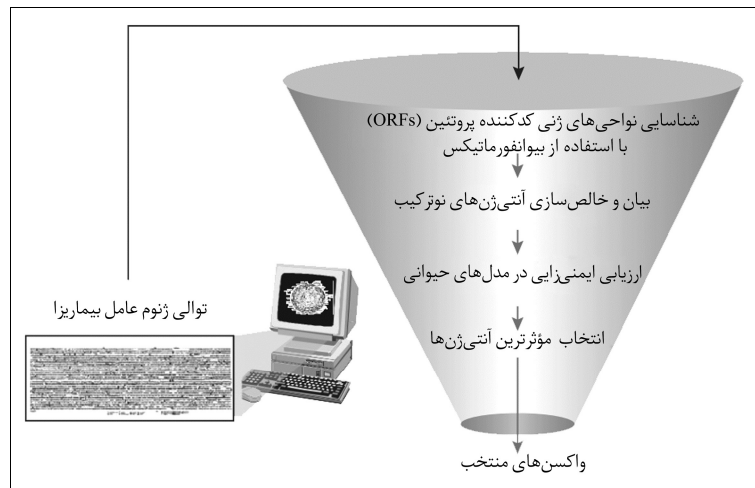
۵-۵ فناوری‌های نوین تولید واکسن در حال و آینده

جداسازی، غیرفعال‌سازی، و تزریق عامل عفونی رویه‌ای بود که در تکوین واکسن‌های تولیدشده توسط ادوارد جنر، لوئی پاستور و موريس هیلمن دنبال شد. چنین واکسن‌هایی از جمله واکسن آنفلوانزا، فلج اطفال، سرخچه، سرخک، و اوریون، جان میلیون‌ها انسان را از ابتلا به بیماری نجات داد و هنوز هم در قرن بیست‌ویکم مورد استفاده قرار دارند. در دهه ۱۹۸۱-۱۹۹۰ میلادی فناوری‌های جدیدی برای تولید واکسن مورد استفاده قرار گرفتند که تولید واکسن‌هایی را موجب شدند که با تکنیک‌های قدیمی امکان تولید نداشتند. فناوری DNA نو ترکیب امکان آن‌را فراهم ساخت که پارتیکل‌های شبه‌ویروسی هپاتیت B در مخمر، بیان شده و به‌منظور واکسن مورد استفاده قرار گیرند. در سال‌های اخیر، همین فناوری برای بیان پارتیکل‌های شبه‌ویروسی حاوی پروتئینی از ویروس پاپیلوما مورد استفاده قرار گرفته است که به‌عنوان واکسن کاربرد دارد.

فناوری بعدی که در تولید واکسن‌های نوین بسیار مؤثر بود، تکنولوژی کونژوگاسیون بود. در این روش، پلی‌ساکاریدهای کپسول هموفیلوس آنفلوانزا، و سویه‌های پنوموکوکوس و استرپتوکوکوس به‌طور کوالان به پروتئین‌های حامل متصل شده و بدین‌شکل توانسته‌اند بیماری‌های مرتبط را به‌طور کلی حذف کنند.

آخرین فناوری که به‌طور گسترده‌ای چشم‌انداز تولید واکسن را دگرگون کرده و واکسینولوژی معکوس را ایجاد کرده است، ظهور و پاگیری علم ژنومیکس است که امکان بررسی کل ژنوم عامل پاتوژن و جستجو برای بهترین ژن‌های کدکننده اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنی را فراهم آورده است. مثالی از یک واکسن به‌دست‌آمده از این فناوری، واکسن برعلیه مننگوکوکوس B می‌باشد که در سال ۲۰۱۳ میلادی در اروپا و در سال ۲۰۱۵ میلادی در ایالات متحده آمریکا جواز استفاده را اخذ کرد.

فناوری‌های دیگری نیز در حال استفاده برای تکوین واکسن‌های نوین هستند که در آینده واکسن تأثیرگذار خواهند بود. این فناوری‌ها عبارت‌اند از: فناوری استفاده از ادجوانت‌های مؤثرتر، طراحی ایمونوژن‌ها از روی ساختار کریستالی آنها، و تولید واکسن‌های سنتتیک با استفاده از انواع RNA، پپتیدها و کربوهیدرات‌ها و دیگر مولکول‌های حیاتی.



شکل ۲-۵ واکسینولوژی معکوس برای شناسایی آنتی‌ژن‌های نوین. ابتدا کلیه نواحی ژنی کدکننده پروتئین (Open reading frames; ORFs) توسط روش‌های بیوانفورماتیکی شناسایی می‌شوند. سپس روش‌های مهندسی ژنتیک به کار برده می‌شوند تا تولید این پروتئین‌ها در باکتری انجام گیرد. سپس این پروتئین‌ها در مدل‌های حیوانی جهت ارزیابی ایمنی‌زایی مورد استفاده قرار می‌گیرند و بهترین آنتی‌ژن‌ها برای ساخت واکسن کاندید می‌شوند^[۹۴].

۶. چشم انداز صنعت واکسن های نو ترکیب

۱-۶ وضعیت کنونی واکسن های نو ترکیب در شکل تجاری

در نزدیک به سه دهه پس از ورود اولین واکسن نو ترکیب به بازار، بیش از ۳۴ واکسن نو ترکیب ساخته شده و وارد بازار جهانی شده اند. با این وجود واکسن های نو ترکیب موجود تعداد معدودی از بیماری ها را پوشش می دهند. در آمریکا در سال ۲۰۱۶، تعداد سه واکسن بر علیه پاپیلوما ویروس و چهار واکسن بر علیه هپاتیت مجوز ورود به بازار را اخذ کرده اند و در مجموع واکسن های نو ترکیب کمتر از ۱۰٪ از ۸۳ واکسن موجود در بازار آمریکا را در سال ۲۰۱۶ شامل می شوند.

تعداد زیادی واکسن نو ترکیب در حال تحقیق، توسعه، و طی مراحل کار آزمایی بالینی می باشند. از این بین، می توان به واکسن های سایتومگالو ویروس، آنفلوآنزا، لیشرمانیا، مالاریا، ایدز، ابولا و زیکا اشاره کرد. تعداد قابل توجهی واکسن نو ترکیب بر علیه انواع سرطان در حال تولید می باشند. همچنین انواع زیادی از واکسن های دام و طیور نیز در حال تهیه می باشند. مزیت قابل توجه تولید واکسن به روش نو ترکیب، سهولت روش تولید و کارایی تولید می باشد که می تواند تولید واکسن در میزان زیاد را در مدت کوتاهی میسر سازد و بالاخص برای ارگانیسم هایی که در کشت سلول رشد نمی کنند یا رشد بطئی دارند، شاید تنها راه حل ممکن برای تولید باشد.

باتوجه به سابقه نودساله مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در تولید مجموعه بزرگی از واکسن های کشته، زنده تخفیف حدت یافته و توکسوئیدی مورد استفاده انسان و دام، یکی از برنامه های جدی مؤسسه رازی، کار روی واکسن های نو ترکیب و نسل جدید است که

یکی از نخستین واکسن‌های تولیدی در مرحله نیمه‌صنعتی بوده و برای پیشگیری از بیماری‌های ناشی از کنگه کاربرد دارد.

۲-۶ اهمیت نگاه استراتژیک به تولید واکسن

مسلماً استفاده از واکسن در چهارصدسال گذشته به پیشگیری و درمان بیماری‌های جوامع انسانی و دامی کمک شایانی کرده است. اما بروز بیماری ناشی از ویروس زیکا^۱ در سال ۲۰۱۶ میلادی در قاره آمریکا و شیوع ابولا^۲ در سال ۲۰۱۴ میلادی در آفریقای غربی هشدارهایی بسیار جدی برای همه مردم کره زمین، بالاخص برای کشورهای درحال توسعه می‌باشند. در سال ۲۰۱۴ قادر نبودیم درمقابل ابولا واکسن مؤثری را طراحی و تولید کنیم. با خوش‌شانسی و رعایت جدی موازین بهداشتی این بیماری فروکش کرد. اما زیکا گوشزد جدی‌تری است مبنی بر اینکه سیستم‌های تولید واکسن و مبارزه با بیماری‌های نوپدید^۳ و بازپدید^۴ بسیار ناکارآمد می‌باشند. ما واکسنی برای مقابله با زیکا هم نداریم. تخمین زده می‌شود که در هر ماه، پنج‌درصد از جمعیت پورتوریکو به زیکا آلوده شوند که در میان این جمعیت، تعداد زیادی را زنان باردار تشکیل می‌دهد. لذا بسیار ضروری است که مراقبت‌های همیشگی برای رخداد بیماری‌های عفونی بسیار سریع‌تر به تولید واکسن منجر شوند. این یک آمادگی بسیار بالا برای تحقیق، توسعه، ساخت، و توزیع واکسن را طلب می‌کند. مسلماً کشورهای درحال توسعه به دلیل زیرساخت‌های ضعیف‌تر و درگیری همیشگی با نیازهای فعلی واکسن موردنیاز، خیلی بیشتر در معرض خطرات ناشی از بیماری‌های عفونی نوپدید و بازپدید می‌باشند.

آمادگی برای مقابله با بیماری‌های عفونی نیازمند آن است که بخش اعظم کار در قبل از رخداد بیماری انجام گرفته باشد. اجرای چند استراتژی می‌تواند در دسترس بودن واکسن را در مواقع اضطراری تضمین کند. (۱) برای پاتوژن‌های نوپدید لازم است پلتفرم‌های تولیدی موجود باشند که بتوانند سریع نمونه‌های انواع واکسن را تولید کنند و در صورت موفقیت یک نمونه

1. Zika

2. Ebola

3. Emerging diseases

4. Re-emerging diseases

در ایجاد ایمنی محافظت‌کننده^۱، آن‌را به میزان بالایی تولید برسانند. (۲) لازم‌است طرح‌های نوآورانه‌ای برای ارزیابی ایمن‌بودن و ایمنی‌زایی واکسن برعلیه تعدادی از پاتوژن‌ها به‌اجرا درآمده باشند تا در مواقع اضطراری با سهولت بیشتری قابل اجرا و پیاده‌سازی باشند. (۳) کشف اثرات یک واکسن و واکنش‌هایی که در بدن بیمار ایجاد می‌کند و مطالعه سیستمیک این اثرات موجب آن می‌گردد که مجموعه‌ای از متغیرها شناسایی شوند که واکسن‌های بعدی یا فرمولاسیون‌های جدید، و حتی واکسن‌های طراحی‌شده برعلیه عوامل عفونی نزدیک (از لحاظ ساختار و پاتوژنز) نیز توسط آنها قابل مقایسه و ارزیابی باشند.

نکات فوق همگی دال بر اهمیت توسعه فناوری‌هایی هستند که آمادگی برای آینده را نیز برای کشور به‌ارمغان می‌آورند. تکنولوژی نو ترکیبی DNA و مهندسی ژنتیک، پلتفرم‌های نوین تولید واکسن‌های نو ترکیب، روش‌های نوین بررسی و ارزیابی اثرات واکسن روی بدن بیمار با تکیه بر روش‌های بیولوژی مولکولی (برای مثال: بررسی پروتئوم سلول‌های ایمنی) همگی تکنیک‌هایی هستند که بایستی در حال و آینده تولید واکسن کشور نقش بسیار پررنگ‌تری ایفا کنند.

منابع

1. Adair BM. Nanoparticle vaccines against respiratory viruses. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009 Jul;1(4):405–14.
2. Azhahianambi P, De La Fuente J, Suryanarayana VV, Ghosh S. Cloning, expression and immunoprotective efficacy of rHaa86, the homologue of the Bm86 tick vaccine antigen, from *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Parasite immunology*. 2009 Mar;31(3):111–22.
3. Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(11):787–96.
4. Badiie A, Heravi Shargh V, Khamesipour A, Jaafari MR. Micro/nanoparticle adjuvants for antileishmanial vaccines: present and future trends. *Vaccine*. 2013 Jan 21;31(5):735–49.
5. Bandyopadhyay A, Fine RL, Demento S, Bockenstedt LK, Fahmy TM. The impact of nanoparticle ligand density on dendritic-cell targeted vaccines. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(11):3094–105.
6. Barnard RT. Recombinant vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 2010 May;9(5):461–3.
7. Bermúdez-Humarán LG, Kharrat P, Chatel J-M, Langella P. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microbial cell factories*. 2011;10(1):1.
8. Boom JA, Cunningham RM. Understanding and Managing Vaccine Concerns [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2014 [cited 2016 Oct 24]. (SpringerBriefs in Public Health). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-07563-1>
9. Bosma T, Kanninga R, Neef J, Audouy SA, van Roosmalen ML, Steen A, *et al*. Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jan;72(1):880–9.
10. Brun A, editor. Vaccine Technologies for Veterinary Viral Diseases [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2016 [cited 2016 Feb 14]. (Methods in Molecular Biology; vol. 1349). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3008-1>
11. Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail HI, Chotpitayasunondh T, Chua MN, *et al*. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014 Oct 11;384(9951):1358–65.
12. Carleton HA. Pathogenic bacteria as vaccine vectors: teaching old bugs new tricks. *Yale J Biol Med*. 2010 Dec;83(4):217–22.
13. Clark TG, Cassidy-Hanley D. Recombinant subunit vaccines: potentials and constraints. *Dev Biol (Basel)*. 2005;121:153–63.
14. Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, *et al*. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 2007 Oct 12;318(5848):283–7.
15. Cunningham AL, Garçon N, Leo O, Friedland LR, Strugnell R, Laupèze B, *et al*. Vaccine

- development: From concept to early clinical testing. *Vaccine* [Internet]. 2016 Oct [cited 2016 Oct 28]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X16309173>
16. Curtiss R 3rd, Xin W, Li Y, Kong W, Wanda SY, Gunn B, *et al.* New technologies in using recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Crit Rev Immunol*. 2010;30(3):255–70.
17. D'Amelio E, Salemi S, D'Amelio R. Anti-Infectious Human Vaccination in Historical Perspective. *International Reviews of Immunology*. 2016 May 3;35(3):260–90.
18. Dan X, Liu X, Han Y, Liu Q, Yang L. Effect of the novel DNA vaccine fusing inhibin α (1-32) and the RF-amide related peptide-3 genes on immune response, hormone levels and fertility in Tan sheep. *Animal Reproduction Science*. 2016 Jan;164:105–10.
19. Davis BS, Chang GJ, Cropp B, Roehrig JT, Martin DA, Mitchell CJ, *et al.* West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of virology*. 2001 May;75(9):4040–7.
20. de la Fuente J, Rodriguez M, Montero C, Redondo M, Garcia-Garcia JC, Mendez L, *et al.* Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genetic analysis: biomolecular engineering*. 1999 Nov;15(3–5):143–8.
21. DelVecchio VG, Alefantis T, Ugalde RA, Comerchi D, Marchesini MI, Khan A, *et al.* Identification of protein candidates for developing bacterial ghost vaccines against *Brucella*. *Methods Biochem Anal*. 2006;49:363–77.
22. Dong Y, Yang J, Zhang J, Zhang X. Nano-Delivery Vehicles/Adjuvants for DNA Vaccination Against HIV. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2016 Mar;16(3):2126–33.
23. Ewer KJ, Lambe T, Rollier CS, Spencer AJ, Hill AV, Dorrell L. Viral vectors as vaccine platforms: from immunogenicity to impact. *Current Opinion in Immunology*. 2016;41:47–54.
24. Fahmy TM, Demento SL, Caplan MJ, Mellman I, Saltzman WM. Design opportunities for actively targeted nanoparticle vaccines. *Nanomedicine (Lond)*. 2008 Jun;3(3):343–55.
25. Fan Y, Moon JJ. Nanoparticle Drug Delivery Systems Designed to Improve Cancer Vaccines and Immunotherapy. *Vaccines (Basel)*. 2015 Aug 27;3(3):662–85.
26. Fredriksen L, Mathiesen G, Sioud M, Eijsink VG. Cell wall anchoring of the 37-kilodalton oncofetal antigen by *Lactobacillus plantarum* for mucosal cancer vaccine delivery. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Nov;76(21):7359–62.
27. Frieze KM, Peabody DS, Chackerian B. Engineering virus-like particles as vaccine platforms. *Current opinion in virology*. 2016;18:44–9.
28. Garver KA, LaPatra SE, Kurath G. Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHNV) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon. *Diseases of aquatic organisms*. 2005 Apr 6;64(1):13–22.
29. Ghanem A, Healey R, Adly FG. Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: a review. *Analytica chimica acta*. 2013 Jan 14;760:1–15.
30. Giese M, Bahr U, Jakob NJ, Kehm R, Handermann M, Muller H, *et al.* Stable and long-lasting immune response in horses after DNA vaccination against equine arteritis virus. *Virus genes*. 2002 Oct;25(2):159–67.
31. Giese M, editor. *Molecular Vaccines* [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2013 [cited 2016 Oct 24]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-1419-3>
32. Hadinegoro SR, Arredondo-Garcia JL, Capeding MR, Deseda C, Chotpitayasunondh T, Dietze R, *et al.* Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med*. 2015 Sep 24;373(13):1195–206.
33. Halstead SB, Thomas SJ. New Japanese encephalitis vaccines: alternatives to production in mouse brain. *Expert Rev Vaccines*. 2011 Mar;10(3):355–64.
34. Hatfaludi T, Liska M, Zellinger D, Ousman JP, Szostak M, Ambrus A, *et al.* Bacterial ghost technology for pesticide delivery. *J Agric Food Chem*. 2004 Sep 8;52(18):5627–34.

35. Hu Q, Wu M, Fang C, Cheng C, Zhao M, Fang W, *et al.* Engineering nanoparticle-coated bacteria as oral DNA vaccines for cancer immunotherapy. *Nano Lett.* 2015 Apr 8;15(4):2732–9.
36. Jennings GT, Bachmann MF. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological chemistry.* 2008;389(5):521–36.
37. Jones S, Evans K, McElwaine-Johnn H, Sharpe M, Oxford J, Lambkin-Williams R, *et al.* DNA vaccination protects against an influenza challenge in a double-blind randomised placebo-controlled phase 1b clinical trial. *Vaccine.* 2009 Apr 21;27(18):2506–12.
38. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology.* 2004;129 Suppl:S3–14.
39. Kamau L, Skilton RA, Odongo DO, Mwaura S, Githaka N, Kanduma E, *et al.* Differential transcription of two highly divergent gut-expressed Bm86 antigen gene homologues in the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodida). *Insect molecular biology.* 2011 Feb;20(1):105–14.
40. Karaca K, Swayne DE, Grosebaugh D, Bublot M, Robles A, Spackman E, *et al.* Immunogenicity of fowlpox virus expressing the avian influenza virus H5 gene (TROVAC AIV-H5) in cats. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Nov;12(11):1340–2.
41. Karch CP, Burkhard P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochemical Pharmacology.* 2016 Nov;120:1–14.
42. Kayansamruaj P, Dong HT, Pirarat N, Nilubol D, Rodkhum C. Efficacy of α -enolase-based DNA vaccine against pathogenic *Streptococcus iniae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture.* 2017 Feb 1;468, Part 1:102–6.
43. Kotla S, Sanghratna Vishanath B, H.J. D, K. G, V.V.S. S, Reddy GR. DNA vaccine (P1-2A-3C-pCDNA) co-administered with Bovine IL-18 gives protective immune response against Foot and Mouth Disease in cattle. *Veterinary Microbiology.* 2016 Sep 25;193:106–15.
44. Krishnamachari Y, Geary SM, Lemke CD, Salem AK. Nanoparticle delivery systems in cancer vaccines. *Pharm Res.* 2011 Feb;28(2):215–36.
45. Kutzler MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature reviews Genetics.* 2008 Oct;9(10):776–88.
46. Kyriakis CS. Tomorrow's vector vaccines for small ruminants. *Veterinary Microbiology.* 2015 Dec;181(1–2):47–52.
47. Langemann T, Koller VJ, Muhammad A, Kudela P, Mayr UB, Lubitz W. The Bacterial Ghost platform system: production and applications. *Bioeng Bugs.* 2010 Sep;1(5):326–36.
48. Lau YF, Tang LH, McCall AW, Ooi EE, Subbarao K. An adjuvant for the induction of potent, protective humoral responses to an H5N1 influenza virus vaccine with antigen-sparing effect in mice. *J Virol.* 2010 Sep;84(17):8639–49.
49. Lebel ME, Chartrand K, Leclerc D, Lamarre A. Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants. *Vaccines (Basel).* 2015 Aug;3(3):620–37.
50. Ledgerwood JE, Hu Z, Gordon IJ, Yamshchikov G, Enama ME, Plummer S, *et al.* Influenza Virus H5 DNA Vaccination Is Immunogenic by Intramuscular and Intradermal Routes in Humans. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 Nov 1;19(11):1792–7.
51. Ledgerwood JE, Wei C-J, Hu Z, Gordon IJ, Enama ME, Hendel CS, *et al.* DNA priming and influenza vaccine immunogenicity: two phase 1 open label randomised clinical trials. *Lancet Infect Dis.* 2011 Dec;11(12):916–24.
52. Le Gros FX, Dancer A, Giacomini C, Pizzoni L, Bublot M, Graziani M, *et al.* Field efficacy trial of a novel HVT-IBD vector vaccine for 1-day-old broilers. *Vaccine.* 2009 Jan 22;27(4):592–6.
53. Lemaire D, Barbosa T, Rihet P. Coping with genetic diversity: the contribution of pathogen and human genomics to modern vaccinology. *Braz J Med Biol Res.* 2012 May;45(5):376–85.
54. Lepenies B. Carbohydrate-based vaccines. New York, NY: Springer Science+Business Media; 2015.
55. Liao JC, Gregor P, Wolchok JD, Orlandi F, Craft D, Leung C, *et al.* Vaccination with

- human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer immunity*. 2006;6:8.
56. Lin IY, Van TT, Smooker PM. Live-Attenuated Bacterial Vectors: Tools for Vaccine and Therapeutic Agent Delivery. *Vaccines (Basel)*. 2015;3(4):940–72.
57. Lipsitch M, Cowling BJ. Zika vaccine trials. *Science*. 2016 Sep 8;353(6304):1094.
58. Liu B, Knirel YA, Feng L, Perepelov AV, Senchenkova SN, Wang Q, *et al*. Structure and genetics of Shigella O antigens. *FEMS microbiology reviews*. 2008 Jul;32(4):627–53.
59. Liu X, Liu Q, Xiao K, Li P, Liu Q, Zhao X, *et al*. Attenuated Salmonella Typhimurium delivery of a novel DNA vaccine induces immune responses and provides protection against duck enteritis virus. *Veterinary Microbiology*. 2016 Apr 15;186:189–98.
60. Lubitz W, Witte A, Eko FO, Kamal M, Jechlinger W, Brand E, *et al*. Extended recombinant bacterial ghost system. *J Biotechnol*. 1999 Aug 20;73(2–3):261–73.
61. Lukashevich IS, Shirwan H, editors. Novel Technologies for Vaccine Development [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2014 [cited 2016 Oct 24]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-1818-4>
62. Manmohan Singh, Salnikova M, editors. Novel approaches and strategies for biologics, vaccines, and cancer therapies. Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier; 2015. 509 p.
63. Manolova V, Flace A, Bauer M, Schwarz K, Saudan P, Bachmann MF. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *European journal of immunology*. 2008;38(5):1404–13.
64. Marasini N, Skwarczynski M, Toth I. Oral delivery of nanoparticle-based vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2014 Nov;13(11):1361–76.
65. Martinez-Becerra FJ, Kissmann JM, Diaz-McNair J, Choudhari SP, Quick AM, Mellado-Sanchez G, *et al*. Broadly protective Shigella vaccine based on type III secretion apparatus proteins. *Infection and immunity*. 2012 Mar;80(3):1222–31.
66. McCosker PJ. *Global aspects of the management and control of ticks of veterinary importance*. In: Rodriguez J, editor. Recent Advances in Acarology. New York: Academic; 1979.
67. Naim HY. Applications and challenges of multivalent recombinant vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2013 Mar 18;9(3):457–61.
68. Notkins AL, Oldstone MBA. Concepts in Viral Pathogenesis [Internet]. New York, NY: Springer New York; 1984 [cited 2016 Oct 24]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4612-5250-4>
69. Orr N, Robin G, Cohen D, Arnon R, Lowell GH. Immunogenicity and efficacy of oral or intranasal Shigella flexneri 2a and Shigella sonnei proteosome-lipopolysaccharide vaccines in animal models. *Infection and immunity*. 1993 Jun;61(6):2390–5.
70. Osterholm MT. Ebola and Zika: Cautionary tales. *Science*. 2016 Sep 8;353(6304):1073.
71. Peconick AP, Sossai S, Girao FA, Rodrigues MQ, Souza ESCH, Guzman QF, *et al*. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus: preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. *Experimental parasitology*. 2008 May;119(1):37–43.
72. Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J Pharm*. 2008 Dec 8;364(2):272–80.
73. Plotkin SA, Plotkin SL. The development of vaccines: how the past led to the future. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(12):889–893.
74. Plotkin SA, editor. Mass vaccination: global aspects, progress and obstacles ; with 40 figures and 27 tables. Berlin: Springer; 2006. 271 p. (Current topics in microbiology and immunology).
75. Plotkin SA, editor. History of Vaccine Development [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2011 [cited 2016 Oct 24]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-1339-5>

76. Pulliam B, Sung JC, Edwards DA. Design of nanoparticle-based dry powder pulmonary vaccines. *Expert Opin Drug Deliv*. 2007 Nov;4(6):651–63.
77. Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, *et al*. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat Biotechnol*. 2007 Oct;25(10):1159–64.
78. Riedmann EM, Lubitz W, McGrath J, Kyd JM, Cripps AW. Effectiveness of engineering the nontypeable *Haemophilus influenzae* antigen Omp26 as an S-layer fusion in bacterial ghosts as a mucosal vaccine delivery. *Hum Vaccin*. 2011 Jan;7 Suppl:99–107.
79. Roland KL, Tinge SA, Killeen KP, Kochi SK. Recent advances in the development of live, attenuated bacterial vectors. *Curr Opin Mol Ther*. 2005 Feb;7(1):62–72.
80. Roldao A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2010 Oct;9(10):1149–76.
81. Saksida SM. Infectious haematopoietic necrosis epidemic (2001 to 2003) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in British Columbia. *Diseases of aquatic organisms*. 2006 Oct 27;72(3):213–23.
82. Saluja V, Visser MR, Ter Veer W, van Roosmalen ML, Leenhouts K, Hinrichs WL, *et al*. Influenza antigen-sparing by immune stimulation with Gram-positive enhancer matrix (GEM) particles. *Vaccine*. 2010 Nov 23;28(50):7963–9.
83. Sebastian Giese MG. Oral Vaccination of Honeybees Against Varroa Destructor. *Molecular Vaccines*. 2013;269–78.
84. Shahabi V, Maciag PC, Rivera S, Wallecha A. Live, attenuated strains of *Listeria* and *Salmonella* as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioeng Bugs*. 2010 Jul;1(4):235–43.
85. Shata MT, Stevceva L, Agwale S, Lewis GK, Hone DM. Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Mol Med Today*. 2000 Feb;6(2):66–71.
86. Sheng Z, Gao N, Cui X, Fan D, Chen H, Wu N, *et al*. Electroporation enhances protective immune response of a DNA vaccine against Japanese encephalitis in mice and pigs. *Vaccine*. 2016 Nov 11;34(47):5751–7.
87. Smith LR, Wloch MK, Ye M, Reyes LR, Boutsaboualoy S, Dunne CE, *et al*. Phase 1 clinical trials of the safety and immunogenicity of adjuvanted plasmid DNA vaccines encoding influenza A virus H5 hemagglutinin. *Vaccine*. 2010 Mar 16;28(13):2565–72.
88. Strugnell R, Zepp F, Cunningham A, Tantawichien T. Vaccine antigens. *Perspectives in Vaccinology*. 2011 Aug;1(1):61–88.
89. Sun W, Roland KL, Curtiss R 3rd. Developing live vaccines against plague. *J Infect Dev Ctries*. 2011 Sep;5(9):614–27.
90. Talebkhan Y, Bababeik M, Esmaeili M, Oghalaei A, Saberi S, Karimi Z, *et al*. *Helicobacter pylori* bacterial ghost containing recombinant Omp18 as a putative vaccine. *J Microbiol Methods*. 2010 Sep;82(3):334–7.
91. Thomas S, editor. Vaccine Design [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2016 [cited 2016 Oct 24]. (Methods in Molecular Biology; vol. 1403). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3387-7>
92. Traxler GS, Anderson E, LaPatra SE, Richard J, Shewmaker B, Kurath G. Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV. *Diseases of aquatic organisms*. 1999 Nov 30;38(3):183–90.
93. Ulmer JB, Valley U, Rappuoli R. Vaccine manufacturing: challenges and solutions. *Nature Biotechnology*. 2006 Nov;24(11):1377–83.
94. Vanengelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, *et al*. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS one*. 2009;4(8):e6481.
95. Villar L, Dayan GH, Arredondo-Garcia JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, *et al*. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med*. 2015 Jan 8;372(2):113–23.
96. Walcher P, Mayr UB, Azimpour-Tabrizi C, Eko FO, Jechlinger W, Mayrhofer P, *et al*.

- Antigen discovery and delivery of subunit vaccines by nonliving bacterial ghost vectors. *Expert Rev Vaccines*. 2004 Dec;3(6):681–91.
97. Wang S, Kong Q, Curtiss R 3rd. New technologies in developing recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Microb Pathog*. 2013 May;58:17–28.
98. Wee JL, Scheerlinck JP, Snibson KJ, Edwards S, Pearce M, Quinn C, *et al*. Pulmonary delivery of ISCOMATRIX influenza vaccine induces both systemic and mucosal immunity with antigen dose sparing. *Mucosal Immunol*. 2008 Nov;1(6):489–96.
99. Wen EP, Ellis RJ, Pujar NS, editors. *Vaccine development and manufacturing*. Hoboken, New Jersey: Wiley, a John Wiley & Sons, Inc. Publication; 2015. 440 p. (Wiley series in biotechnology and bioengineering).
100. West NP, Sansonetti P, Mounier J, Exley RM, Parsot C, Guadagnini S, *et al*. Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. *Science*. 2005 Feb 25;307(5713):1313–7.
101. Willadsen P. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary parasitology*. 2001 Nov 22;101(3–4):353–68.
102. Wilson P. This paper draws on studies conducted by Andrew Jones for MSF and Paul Wilson for Oxfam Cover photos: Nico Heijenberg/MSF, Oliver Asselin Back cover photos: Guillaume Ratel, Oliver Asselin Cover design and layout: Daniel Jaquet. 2010 [cited 2016 Oct 28]; Available from: <https://www.aerzte-ohne-grenzen.de/sites/germany/files/attachments/giving-developing-countries-best-shot-vaccines-2010-05.pdf>
103. Wong S-S, Webby RJ. Traditional and New Influenza Vaccines. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Jul 1;26(3):476–92.
104. Xie E, Kotha A, Biaco T, Sedani N, Zou J, Stashenko P, *et al*. Oral Delivery of a Novel Recombinant *Streptococcus mitis* Vector Elicits Robust Vaccine Antigen-Specific Oral Mucosal and Systemic Antibody Responses and T Cell Tolerance. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143422.
105. Xie E, Kotha A, Biaco T, Sedani N, Zou J, Stashenko P, *et al*. Correction: Oral Delivery of a Novel Recombinant *Streptococcus mitis* Vector Elicits Robust Vaccine Antigen-Specific Oral Mucosal and Systemic Antibody Responses and T Cell Tolerance. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147781.
106. Xu W, Huang M, Zhang Y, Yi X, Dong W, Gao X, *et al*. Novel surface display system for heterogenous proteins on *Lactobacillus plantarum*. *Lett Appl Microbiol*. 2011 Dec;53(6):641–8.
107. Yang Y, Xue X, Yang Y, Chen X, Du A. Efficacy of a potential DNA vaccine encoding *Cryptosporidium baileyi* rhomboid protein against homologous challenge in chickens. *Veterinary Parasitology*. 2016 Jul 30;225:5–11.
108. Zabel F, Kündig TM, Bachmann MF. Virus-induced humoral immunity: on how B cell responses are initiated. *Current opinion in virology*. 2013;3(3):357–62.
109. Zhang W, Wang L, Liu Y, Chen X, Liu Q, Jia J, *et al*. Immune responses to vaccines involving a combined antigen-nanoparticle mixture and nanoparticle-encapsulated antigen formulation. *Biomaterials*. 2014 Jul;35(23):6086–97.
110. Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, *et al*. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*. 2014 Jan 9;32(3):327–37.