

A Review of Next-Generation Plasmid Systems for the Design and Optimization of DNA Vaccines

Sima Habibzadeh¹

Roya Yousefi¹

Sima Rafati²

Negar Seyed³

¹ M.Sc., Microbial Biotechnology – Immunology; Department of Immunotherapy and Leishmania Vaccine Research, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

² Professor, Immunotherapy and Leishmania Vaccine Research Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Immunotherapy and Leishmania Vaccine Research Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

(Received September 29, 2025; Accepted June 20, 2026)

Abstract

Vaccines are widely regarded as one of the greatest achievements of modern medicine. By substantially reducing the burden of infectious diseases, they have dramatically improved global public health and life expectancy. Vaccination has successfully controlled or eliminated many life-threatening diseases, including smallpox, plague, poliomyelitis, and tetanus. However, effective vaccines remain unavailable for several diseases in which protection depends predominantly on cell-mediated immunity rather than humoral immune responses. Third-generation vaccines, also known as DNA vaccines, represent a major advance in vaccine technology because they are capable of inducing robust cellular immune responses and offer several advantages over conventional vaccine platforms. Nevertheless, no DNA vaccine has yet been approved for the prevention of human infectious diseases. One of the major limitations is the presence of prokaryotic sequences within conventional plasmid DNA vectors. These bacterial elements are required during plasmid construction and propagation but serve no functional purpose once the vector is delivered into human cells. Moreover, they raise safety concerns, including the potential spread of antibiotic resistance genes. Fortunately, advances in molecular biotechnology have led to the development of next-generation DNA vectors designed to overcome these limitations. This review summarizes these emerging vector platforms and the mechanisms by which they function. Replacing conventional plasmid vectors with these next-generation systems may facilitate the development of effective DNA vaccines against diseases that require strong cell-mediated immunity, such as leishmaniasis. Furthermore, these advanced plasmid platforms have the potential to enhance not only DNA vaccine efficacy but also other applications of molecular medicine, including gene therapy, genome editing, and immunotherapy.

Keywords: Plasmids, antibiotic resistance gene, new generation, vaccine

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 36 (258): 222-235 (Persian).

Corresponding Author: Negar Seyed - Immunotherapy and *Leishmania* Vaccine Research Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran (E-mail: negarse@gmail.com)

مروری بر سامانه‌های پلاسمیدی نسل جدید در طراحی و بهینه‌سازی واکسن‌های DNA

سیما حبیب زاده^۱

رویا یوسفی^۱

سیما رأفتی^۲

نگار سید^۳

چکیده

به‌طور حتم واکسن‌ها جزء مهم‌ترین دستاوردهای علم پزشکی محسوب می‌شوند که با ارتقا وضعیت سلامت جوامع بشری، نیمه عمر مفید انسان را به بالاترین مرز ممکن در قرن بیست و یکم افزایش داده‌اند و انسان را از بیماری‌های خطرناک نظیر آبله، طاعون، فلج اطفال و کزاز مصون نگه داشته‌اند. با این وجود، برخی بیماری‌ها که به‌واسطه‌ی ایمنی سلولی کنترل می‌شوند و بیش از آنتی بادی به پاسخ‌های قوی اکتسابی نیازمندند، هم‌چنان واکسنی ندارند. واکسن‌های نسل سوم یا DNA واکسن‌ها از جمله موارد پیشرفت تکنولوژی‌های واکسن هستند که نیاز به تحریک ایمنی سلولی را به‌خوبی برآورده می‌کنند و مزایای فراوانی دارند ولی هنوز واکسنی بر پایه‌ی DNA در بازار برای عفونت‌های انسانی وجود ندارد. مهم‌ترین دلیل، وجود بخش‌های پروکاریوتی بر روی سازه‌های DNA است. بخش‌های پروکاریوتی ناقل‌های DNA نسل اول، تنها در مراحل آزمایشگاهی تهیه واکسن کاربرد دارند و پس از انتقال به بدن انسان نقشی ایفا نمی‌نند ولی همین ناحیه مشکلاتی به‌دنبال می‌آورد که خطر گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در جمعیت انسانی از جمله آن‌ها است. خوشبختانه، به‌واسطه توسعه دانش مولکولی در ارتباط با رفع معایب ناقل‌های متداول نسل اول، ناقل‌های جایگزین در حال معرفی به حوزه واکسن‌های اسید نوکلئیکی هستند. این مطالعه مروری با هدف، معرفی این ناقل‌های جایگزین و نحوه عملکرد آن‌ها، انجام پذیرفت. جایگزینی نسل اول ناقل‌های پلاسمیدی با ناقل‌های نسل جدید می‌تواند امید تازه‌ای برای ورود واکسن‌های کارآمد علیه بیماری‌های عفونی که به تحریک پاسخ‌های سلولی وابسته هستند مانند لیشرمانیوز به بازار واکسن‌های انسانی ایجاد نماید. این فناوری نه تنها در نسل آینده واکسن‌ها بلکه در تمام عرصه‌های پزشکی مولکولی از جمله ژن درمانی، ویرایش ژنی و ایمنی درمانی راهکاری قابل اطمینان در افزایش کارایی ارائه خواهد داد.

واژه‌های کلیدی: پلاسمید، ژن مقاومت به آنتی بیوتیک، نسل جدید، واکسن

E-mail: negarse@gmail.com

مؤلف مسئول: نگار سید - تهران، میدان پاستور، خیابان پاستور، پلاک ۶۹، بخش ایمونوترابی و تحقیقات واکسن لیشمانیا

۱. کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی میکروبی - ایمونولوژی بخش ایمونوترابی و تحقیقات واکسن لیشمانیا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲. استاد، بخش ایمونوترابی و تحقیقات واکسن لیشمانیا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳. دانشیار، بخش ایمونوترابی و تحقیقات واکسن لیشمانیا، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۷/۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۷/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۴۰۵/۳/۳۰

مقدمه

واکسن‌ها یکی از مهم‌ترین مداخلات پزشکی در تاریخ بشر محسوب می‌شوند که به پیشگیری از بیماری‌های متعددی از جمله آبله، سرخک، سرخجه و فلج اطفال کمک شایان نموده‌اند. عمده بیماری‌هایی که به واسطه‌ی واکسیناسیون از پیشرفت آن‌ها در جوامع بشری جلوگیری شده است در حقیقت به سادگی به واسطه‌ی تولید آنتی‌بادی در بدن میزبان کنترل می‌شوند. برای این منظور واکسن‌های کشته شده و یا زنده ضعیف شده از مهم‌ترین استراتژی‌های به کار رفته در طی سالیان متمادی بوده‌اند که به‌خوبی منجر به تولید آنتی‌بادی‌های با دوام در بدن میزبان می‌شوند. با پیشرفتهای علمی اخیر و دسترسی به تکنولوژی‌های نو ترکیبی و نیز دست یابی به ادجوانت‌های متنوع، برخی بیماری‌ها نظیر هپاتیت نوع B و مننگو کوک نیز به لیست بیماری‌های کنترل شونده افزوده شدند (۱). با این حال، برخی بیماری‌ها از جمله ایدز، مالاریا، سل و لیشرمانیا در زمره بیماری‌هایی هستند که همچنان واکسن پیشگیری کننده قابل عرضه ای به بازار انسانی ندارند (۲). علت اصلی این موضوع مشخص نبودن نوع رابطه‌ی ایمونولوژیک بین میزبان و پاتوژن و پیچیدگی‌های این رابطه است به عبارت بهتر تولید آنتی‌بادی به‌تنهایی پاسخ‌گو نبوده و سیستم ایمنی سلولی میانجی‌گر اصلی محسوب می‌شود. در همین ارتباط واکسن‌های زنده ضعیف شده و واکسن‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک از جمله سازوکارهایی شناخته می‌شوند که می‌توانند به پاسخ‌های سلولی مؤثر منتهی شوند (۳-۶).

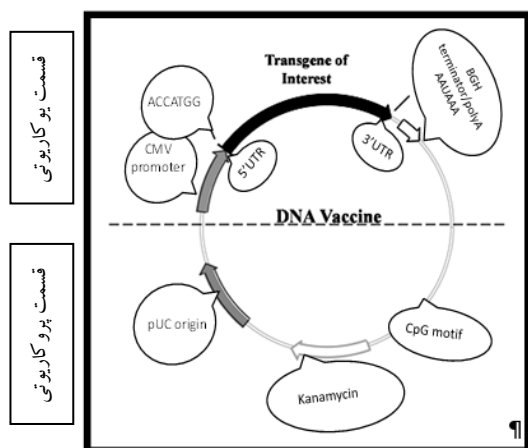
نتیجه‌ی مطالعات نشان می‌دهد که از میان سایر استراتژی‌های مورد استفاده در طراحی واکسن‌های زیر واحدی، واکسن‌های مبتنی بر DNA، تا سال ۲۰۲۱ بیش‌ترین کاربرد را در عفونت‌های مختلف داشته‌اند (۷). واکسن‌های DNA مزایای فوق‌العاده‌ای دارند که می‌توان به پروتئین در داخل سلول‌های میزبان به فرم اصلی خود تولید می‌شود، پاسخ‌های مناسب سلولی و همورال در کنار هم قابل القاء است، ساختار DNA به دمای بالا مقاوم بوده و برای انتقال نیاز به زنجیره سرد ندارد به همین دلیل برای

مناطق استوایی بسیار مناسب است، در بدن پاسخی بر علیه DNA گزارش نشده است به‌همین دلیل برخلاف ناقل‌های ویروسی یا باکتریایی استفاده از DNA به‌صورت Prime-Boost همولوگ امکان‌پذیر است و مهم‌تر این که ایمنی این واکسن‌ها در مقایسه با انگل‌های زنده ضعیف شده بالاتر می‌باشد، اشاره کرد (۸-۱۰). DNA واکسن‌ها در حال حاضر برای چندین بیماری حیوانی و مواردی از سرطان‌ها (به‌عنوان واکسن‌های درمانی) مجوز استفاده دارند و حتی به فازهای دو و سه کارآزمایی‌های بالینی واکسن‌های پیشگیری کننده انسانی هم رسیده‌اند (۷، ۱۱، ۱۲). با این وجود، علی‌رغم این که عوارض خاصی از جمله ورود DNA به‌داخل کروموزوم و خودایمنی یا تولرانس ایمنی گزارش نشده است، هنوز واکسنی بر پایه DNA در بازار برای پیشگیری از عفونت‌های انسانی وجود ندارد (۱۳). مهم‌ترین دلیل، وجود بخش‌های پروکاریوتی بر روی سازه‌های DNA است که وارد بدن فرد واکسینه می‌شود و از نظر ارگان‌های نظارتی سلامت در کل دنیا این بخش‌ها می‌بایست از واکسن‌های انسانی حذف گردد یا به حداقل اندازه‌ی خود برسد (۱۴). در این مقاله مروری به معرفی جدیدترین نوع سازه‌های DNA پرداخته شد. این سازه‌های جدید فاقد معایب ساختارهای نسل اول بوده و می‌توانند در آینده‌ی نه چندان دور جایگزین ساختارهای DNA موجود شوند و ورود واکسن‌های DNA به بازار انسانی را امکان پذیرتر نمایند. برای این منظور ابتدا به ساختار سازه‌های DNA نسل اول و مشکلات آن‌ها اشاره و سپس راهکارهای جایگزین برای رفع معایب سیستم‌های موجود و چشم‌انداز آینده نسل جدید پلاسمیدها ارائه شده است. قابل ذکر است که مطالعه مروری حاضر با کد اخلاقی IR.PII.REC.1399.089، انجام گرفت.

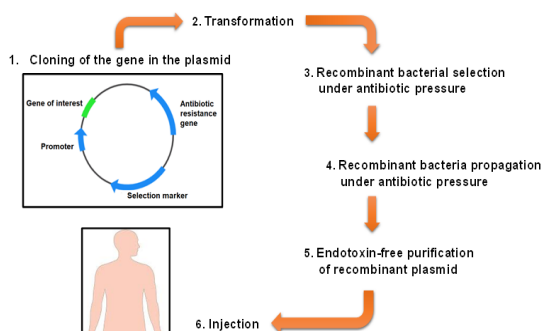
ساختار ناقل‌های پلاسمیدی نسل اول

واکسن‌های مبتنی بر DNA در واقع از ساختار پلاسمید به‌عنوان حامل آنتی‌ژن کاندید واکسن به‌داخل سلول‌های میزبان استفاده می‌کند. پلاسمیدها مولکول‌های

پلاسمید نو ترکیب و تخلیص آن) و سپس تزریق واکسن به طور شماتیک نمایش داده شده است.



تصویر شماره ۱: ساختار پلاسمید بیانی مورد استفاده در واکسن‌های DNA. ناحیه یوکاریوتی شامل پروموتور، توالی‌های غیر ترجمه‌ای در ناحیه ۵' و ۳' قطعه، توالی خاتمه ترجمه و پلی آدنیلایسون و توالی کزاک می‌باشد. ناحیه پروکاریوتی شامل جایگاه همانند سازی و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک و نواحی محرک ایمنی ذاتی (CpG motif) است.



تصویر شماره ۲: مراحل تهیه و تخلیص DNA واکسن، ۱: کلون سازی ژن کاندید واکسن در سازه پلاسمید، ۲: انتقال پلاسمید نو ترکیب به داخل سلول باکتری صلاحیت دار، ۳: انتخاب باکتری نو ترکیب تحت فشار آنتی بیوتیکی، ۴: تکثیر باکتری نو ترکیب تحت فشار آنتی بیوتیکی، ۵: تخلیص پلاسمید با حذف اندوتوکسین در مقیاس بالا، ۶: تزریق واکسن

کوچک DNA خارج کروموزومی در باکتری‌ها و گاهی در مخمرها هستند که به صورت حلقوی بوده و معمولاً جایگاه همانندسازی (origin of replication) خود را دارند و به همین دلیل مستقل از ژنوم باکتری (یا مخمر) تکثیر می‌شوند. هر پلاسمید به طور معمول یک یا چند ژن را کد می‌کند که برای بقای باکتری (یا مخمر) اهمیت زیادی ندارند ولی قابلیت‌هایی نظیر بیماری‌زایی و مقاومت به شرایط نامناسب محیطی از جمله وجود آنتی بیوتیک و توکسین‌ها را به دنبال می‌آورند. در نسل سوم واکسن‌ها، پلاسمیدهای دست ورزی شده، علاوه بر قابلیت انتقال ژن مورد نظر به داخل سلول‌های میزبان امکان بیان در سلول هدف را نیز فراهم می‌نمایند. این نوع پلاسمیدها که عمدتاً منشأ باکتریایی دارند، از دو قسمت پروکاریوتی و یوکاریوتی تشکیل می‌شوند (۱۵). همان گونه که در تصویر شماره ۱ نمایش داده شده است، قسمت پروکاریوتی واجد جایگاه همانندسازی (معمولاً جایگاه pUC) و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک (بعنوان مثال کانامایسین) است که به ترتیب برای تکثیر پلاسمید در سلول‌های باکتری در مراحل تولید انبوه واکسن و برای انتخاب باکتری‌های نو ترکیب در مراحل آزمایشگاهی و پیش از تزریق به میزبان به کار می‌روند. این قسمت از پلاسمیدها به دلیل این که منشأ باکتریایی دارند می‌توانند پاسخ‌های ایمنی ذاتی را به سبب وجود توالی‌های تکرار شونده ی CpG غیر متیله تحریک نمایند (خاصیت خود اذجوانی) (۱۶).

قسمت یوکاریوتی واجد ناحیه ی کلون سازی است که برای وارد نمودن ژن مورد نظر استفاده می‌شود، هم چنین پروموتور یوکاریوتی در سمت بالادست ژن (معمولاً مشتق از سیتومگالو ویروس) و نواحی غیر ترجمه ای (untranslated regions-UTR) در دو سمت ژن مورد نظر و سیگنال پلی آدنیلایسون در پایین دست ژن مورد نظر تعبیه شده است. در پلاسمیدهای بیانی مختلف امکان افزوده شدن توالی کزاک نیز گاهی وجود دارد (۱۷). در تصویر شماره ۲، مراحل آزمایشگاهی (تهیه

مشکلات ناقل‌های پلاسمیدی نسل اول

هنگامی که سازه پلاسمیدی وارد بدن میزبان یوکاریوتی می‌شود تنها ناحیه یوکاریوتی مورد استفاده قرار می‌گیرد و ناحیه ی پروکاریوتی عملاً استفاده‌ای ندارد. اخیراً مشخص شده که ناحیه ی پروکاریوتی که واجد ژن مقاومت به آنتی بیوتیک و جایگاه همانند سازی می‌باشد اختلالاتی را ایجاد می‌نماید که عمدتاً شامل موارد زیر است:

- حضور ژن مقاومت به آنتی بیوتیک می‌تواند سبب گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی به سایر باکتری‌های موجود در بدن فرد واکسینه شده از طریق انتقال افقی (Horizontal transfer) شود. بسیاری از ساختارهای پلاسمیدی از ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها مثل کانامایسین و نئومایسین استفاده می‌کنند که مصارف انسانی دارند. بنابراین خطر ایجاد مقاومت به این آنتی بیوتیک‌ها وجود دارد. برخی دیگر از ساختارها از ژن مقاومت به بتالاکتام‌ها نظیر آمپی سیلین استفاده می‌کنند. چنان چه در مراحل تهیه ی پلاسمید مقادیر اندکی از آنتی بیوتیک همراه پلاسمید باقی بماند می‌تواند در افراد حساس منجر به واکنش شدید آنافیلاکسی شود (۱۵).

- مقاومت در برابر آنتی بیوتیک در کشت وسیع باکتری با اعمال فشار متابولیکی بر این سلول منجر به کاهش راندمان تکثیر پلاسمید می‌گردد، چرا که در مجاورت آنتی بیوتیک ژن مقاومت به‌طور مداوم رونویسی می‌شود تا پروتئین مهار کننده را تولید نماید به همین دلیل از سرعت تکثیر پلاسمید و سرعت رشد باکتری کاسته می‌شود (۱۶، ۱۸).

- بخش پروکاریوتی در روند بیان ژن مورد نظر در سلول‌های یوکاریوتی اختلال ایجاد می‌کند. پس از ورود به سلول یوکاریوتی، ناحیه ی پروکاریوتی عمدتاً هتروکروماتینی می‌شود که با گسترش به ناحیه ژن مورد نظر مانع بیان می‌گردد (۱۹، ۲۰). علاوه بر این نواحی پروکاریوتی ممکن است پروموتورهای پنهان (کریپتیک)

داشته باشند که در سلول یوکاریوت منجر به تولید توالی‌های RNA کوچکی می‌شود که به صورت مکمل چنان چه به mRNA ژن کد شده اتصال یابد مانع بیان می‌شود.

- پلاسمیدهای نسل اول مورد استفاده برای واکسن یا ایمونوتراپی نظیر pcDNA ساینز نسبتاً بزرگی دارند و بخش عمده‌ای از این ساختار بزرگ متعلق به نواحی پروکاریوتی است که در روند انتقال سازه DNA به داخل سلول و کارایی ترانسفکشن اختلال ایجاد می‌کنند. مقایسه نشان داده است که هر چه ساینز سازه DNA کوچک‌تر باشد کارایی ترانسفکشن بیش‌تر خواهد بود (۲۱). علی‌رغم این که روش‌هایی نظیر الکتروپوراسیون، Gene Gun یا لیپوزوم‌ها و نانوپارتنیکل‌های لیپیدی به افزایش انتقال از غشاء به داخل سلول کمک می‌کنند، با این حال اندازه بزرگ پلاسمید روند انتقال از سیتوپلاسم به هسته را کند می‌کند (۲۲). در حالی که پلاسمیدهای با ساینز کوچک‌تر راحت‌تر منتقل می‌شوند (۲۳). به همین دلیل هم پلاسمیدهای کوچک‌تر در بیان ژن کد شونده موفق عمل می‌کنند. این مسأله به‌خصوص در ارتباط با عوامل عفونی با پیچیدگی‌های فراوان پروتئینی نظیر انگل لیشرمانیا که نیاز به بیش از یک آنتی‌ژن برای القاء ایمنی دارند، حائز اهمیت است.

راهکارهای جدید برای رفع معضلات سازه‌های نسل اول

طی دهه‌های گذشته تلاش‌های زیادی برای یافتن راهکارهایی که به افزایش راندمان انتقال پلاسمید به درون سلول‌ها و افزایش بیان ژن کد شده در پلاسمید شود و موافقت سازمان‌های نظارتی را در به کارگیری پلاسمیدهای فاقد ژن مقاومت به آنتی بیوتیک فراهم نماید، صورت گرفته است. در همین راستا نسل جدید یا نسل دوم پلاسمیدهای بیانی که در ژن درمائی و یا ایمنی زایی پیشگیرانه (واکسن) قابل استفاده باشند معرفی شده اند که با حذف و یا کوچک نمودن قابل توجه ناحیه

پروکاریوتی به اهداف مورد نظر تا حدود زیادی دست یافته‌اند (۲۴). به عبارت دیگر، کاهش اندازه پلاسمید نه تنها به کاهش بار متابولیکی برای میزبان باکتریایی در طول فرآیند تکثیر پلاسمید منجر می‌شود، بلکه باعث حذف رونویسی و ترجمه ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی، و همچنین کاهش محتوای توالی‌های محرک ایمنی CpG می‌گردد. چنین پلاسمیدهایی برای اهداف ژن درمانی مناسب هستند، ولی با هدف طراحی واکسن می‌بایست با ادجوانت مناسب همراه شوند (۲۷-۲۵).

در این بخش به معرفی سازه‌های فاقد ناحیه پروکاریوتی (minicircle) و سازه‌های دارای ناحیه پروکاریوتی به حداقل رسیده که غیر وابسته به ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند، پرداخته شده است. در جدول شماره ۱، ویژگی‌های این پلاسمیدها خلاصه شده است.

۱. Minicircles ها، سازه‌های فاقد ناحیه پروکاریوتی

در سال ۱۹۹۷، Minicircle ها طراحی شدند. در این نوع پلاسمیدها، پس از تکثیر در باکتری، بخش‌های پروکاریوتی بروس نوترکیبی از ساختار پلاسمید اولیه حذف می‌گردد (۲۸). Minicircle ها ساختارهای بیانی دو رشته‌ای و ابرمارپیچ بدون ستون فقرات باکتریایی، هستند. برای ایجاد این ساختارها از نوترکیبی بین دو

جدول شماره ۱: ویژگی‌های برخی از پلاسمیدهای نسل جدید

نام سیستم	ناحیه یوکاریوتی	مشخصات	Reference
Minicircle	ندارد	پس از مراحل تکثیر آزمایشگاهی، بخش‌های پروکاریوتی بروس نوترکیبی از ساختار پلاسمید اولیه حذف می‌گردد. ساخت Minicircle ها فرآیندی پر زحمت بوده و در حال حاضر فاقد قابلیت تکرار در مقیاس بزرگ است. در حقیقت تخلیص این پلاسمیدها پیچیده تر از پلاسمیدهای نسل اول می‌باشد.	۲۸-۳۶
pFAR	سیستم انتخابی پلاسمید نوترکیب بر مبنای سیستم آگزوتروفي است. ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک حذف و ناحیه پروکاریوتی کاهش یافته است.	یک کدن خاتمه در داخل ژن ضروری تیمیدیلات سنتاز باکتری، آن را غیر فعال می‌نماید. در طرف مقابل پلاسمید کد کننده suppressor tRNA در صورت انتقال به سلول این جهش را با اسید آمینه مربوطه ترمیم میکند و پروتئین فعال سنتز می‌شود و باکتری زنده می‌ماند.	۳۸، ۳۷
pCOR	علاوه بر ویژگی‌های pFAR دارای جایگاه همانند سازی شرطی است (R6K) که از انتقال پلاسمید به باکتری‌های دیگر جلوگیری به عمل می‌آورد.	باکتری دست ورزی شده، یک پروتئین آغازگر ترانس فعال بنام پی (π) را توسط ژن انتقال داده شده به داخل کروموزوم کد می‌نماید. جایگاه همانند سازی پلاسمید برای شروع تکثیر به این پروتئین نیاز دارد و در صورتی که باکتری به میزان فاقد پروتئین پی انتقال باید قادر به همانند سازی نخواهد بود.	۴۰، ۳۹
pORT	سیستم انتخابی پلاسمید نوترکیب بر پدیده تیراسیون رپرسور متکی است. ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک حذف و ناحیه پروکاریوتی کاهش یافته است.	این سیستم به یک باکتری اصلاح شده نیاز دارد که اپراتور ژن dapD آن تحت کنترل رپرسور قرار دارد. پلاسمید اصلاح کننده این وضعیت واجد چندین اپراتور متوالی است و در صورت انتقال بدون سلول، با فراهم کردن جایگاه اتصال رپرسور، فشار رپرسور از روی اپراتور ژن dapD برداشته شده و ژن سنتز دیواره سلول فعال میشود و باکتری به حیات ادامه میدهد.	۴۱-۴۴
ناوپلاسمید	از برهمکنش RNA/RNA جهت حذف ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در ساختار پلاسمید استفاده می‌کنند. جایگاه همانند سازی از نوع R6K است. اندازه این پلاسمید به حداقل ممکن کاهش یافته است.	در باکتری دست‌ورزی شده، آنزیمی به نام لوان سوکراز برای تبدیل سوکروز به یک متابولیت کشنده تولید می‌شود. mRNA این آنزیم همراه با RNA کوچک RNA-IN در ناحیه ۵ سنتز می‌شود. پلاسمیدی که ترمیم کننده این سیستم است RNA کوچک RNA-OUT و مکمل RNA-IN کد می‌نماید. در صورتی که پلاسمید نوترکیب وارد سلول باکتری شود، RNA-OUT پلاسمید به RNA-IN متصل شده و بیان آنزیم لوان سوکراز مختل می‌شود و سلول زنده می‌ماند.	۴۵-۵۲
RNA I/II	همانند ناوپلاسمید از برهمکنش RNA/RNA استفاده می‌کند. مزیت اصلی این سیستم کاهش سایز ناحیه پروکاریوتی به کم‌تر از سیستم RNA-OUT است چون RNA I در داخل خود جایگاه همانند سازی کد می‌شود.	در باکتری دست ورزی شده، ژن ضروری murA (برای مونتاژ پپتیدوگلیکان دیواره) تحت کنترل رپرسوری قرار دارد که mRNA آن به همراه RNA کوچکی در سمت ۵ سنتز می‌شود (RNA II). هنگام ورود پلاسمید به سلول باکتری، با تولید RNA I که توسط جایگاه همانند سازی کد می‌شود، و اتصال آن به RNA II، تولید پروتئین رپرسور متوقف می‌شود و ژن murA از فشار رپرسور رها می‌گردد و سلول زنده می‌ماند.	۵۳

جایگاه هدف آنزیم‌های ریکامیناز که در دو طرف واحد بیان یوکاریوتی قرار دارند، استفاده می‌شود. رویداد نوترکیبی، Mincircle مورد نظر را همراه با Miniplasmid ایجاد می‌کند. Miniplasmid ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی و جایگاه همانندسازی باکتریایی را کد می‌کند و بدین ترتیب حذف می‌شود. استفاده از ساختارهای Minicircle در رابطه با سرطان‌ها، ویروس هپاتیت B، ویروس ایدز، بیماری نیوکاسل و لیستریا مونوسایتوزنر در جریان می‌باشد و در تمام موارد کارایی بالاتری در مقایسه با پلاسمیدهای نسل اول مشاهده شده است (۳۳-۲۹). مشاهده شده است که پاسخ‌های ایمنی سلولی وابسته به T-CD8⁺ بدنبال تزریق Minicircle ها و بیان طولانی مدت آنتی ژن به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد (۳۳، ۳۴). به عنوان مثال پلاسمید pVAX1 جز نسل اول پلاسمیدها است که از ژن مقاومت به کانامایسین و جایگاه همانندسازی pUC استفاده می‌کند. این نواحی واجد پروموتورهای کریپتیک هستند (۳۵). Wang و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که حذف قسمت پروکاریوتی از این پلاسمید و ایجاد Minicircle ها، پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال را نسبت به ساختار اولیه تا سه برابر افزایش می‌دهد (۳۱).

ساخت Minicircle ها فرآیندی پرزحمت بوده و در حال حاضر فاقد قابلیت تکرار در مقیاس بزرگ است. درحقیقت تخلیص این پلاسمیدها پیچیده تر از پلاسمیدهای نسل اول می‌باشد. سیستم‌های جدیدتر، حذف قسمت پروکاریوتی در درون سلول یوکاریوتی را پیشنهاد می‌نماید که در این شرایط پلاسمید اولیه در هر صورت وارد سلول می‌شود و در نهایت مخلوطی از پلاسمید اولیه و minicircle در سلول موجود خواهد بود (۳۲). ضمن این که حذف کامل قسمت‌های پروکاریوتی بیش‌تر از جنبه‌ی درمانی اهمیت دارد که پاسخ‌های ایمنی القاء نشود، ولی در رابطه با طراحی واکسن حذف کامل ناحیه‌ی پروکاریوتی می‌تواند ایمنی زایی را کاهش دهد (۳۶).

۲. پلاسمیدهای کاهش یافته در ناحیه‌ی پروکاریوتی

در این نوع از پلاسمیدهای نسل جدید، ناحیه‌ی پروکاریوتی بطور کامل حذف نمی‌شود بلکه با جایگزینی ژن مقاومت به آنتی بیوتیک با سیستم‌های دیگر انتخابی و هم‌چنین کوتاه نمودن جایگاه همانندسازی (عمدتاً R6K یا pMB1)، این ناحیه به حداقل ممکن کاهش می‌یابد.

۲-۱. پلاسمیدهای مبتنی بر سیستم اگزوتروفی

سیستم‌های اگزوتروفی بر سرکوب یک ژن باکتریایی کروموزومی ضروری متکی هستند و ادامه‌ی حیات باکتری مشروط به حضور محصول ژن مورد نظر است. در روش‌های قدیمی‌تر، ژن ضروری از ساختار کروموزوم باکتری حذف و بر روی پلاسمید سوار می‌شود، نظیر سیستم glyA که با حذف ژن سرین هیدروکسی متیل ترانسفراز از ژنوم، باکتری را نسبت به گلايسين شرطی می‌نماید. اگر ژن مورد نظر بواسطه‌ی پلاسمید بداخل باکتری منتقل شود، باکتری در عدم حضور گلايسين در محیط کشت می‌تواند زنده بماند و در غیر این صورت از بین می‌رود. در حال حاضر از این

سیستم در پلاسمیدهای pFAR (موتاسیون در ژن کد کننده‌ی تیمیدیلات سنتاز) استفاده شده است با این تفاوت که یک جهش بی‌معنی (nonsense) با وارد نمودن کدون خاتمه در ژن ضروری تیمیدیلات سنتاز ایجاد می‌شود و در عوض ژن کد کننده tRNA که با کدون خاتمه یک اسید آمینه در زمان سنتز وارد می‌نماید (suppressor tRNA) بر روی پلاسمید قرار دارد. بدین ترتیب باکتری برای تیمیدین شرطی است و تنها در حضور پلاسمید قادر به ادامه‌ی حیات خواهد بود و گرنه به‌علت توقف در سنتز آنزیم فوق، باکتری در عدم حضور تیمیدین زنده نمی‌ماند. مزیت این سیستم نسبت به سیستم‌های قدیمی، کاهش قابل توجه در ناحیه‌ی پروکاریوتی به‌علت جایگزینی ژن مقاومت به آنتی بیوتیک با ژن tRNA برای انتخاب باکتری نو ترکیب در مراحل تولید پلاسمید می‌باشد. داده‌های in vivo و in vitro برای پلاسمید pFAR کد کننده ژن گزارشگر لوسیفراز، افزایش بیان در سلول‌های عضلانی، پوست و تومور موش را گزارش نموده است (۳۵). تزریق داخل جلدی پلاسمید pFAR کد کننده ژن گزارشگر لوسیفراز بواسطه‌ی الکتروپوراسیون نشان داده است که فعالیت لوسیفراز اندازه‌گیری شده در مقایسه با ناقل‌های بیان معمولی در عرض سه هفته پس از انتقال بسیار پایدارتر از پلاسمیدهای متداول بیانی است. بنابراین، پلاسمیدهای pFAR خانواده جدیدی از وکتورهای بیان یوکاریوتی ایمن هستند که برای ژن درمانی و یا واکسن مناسب خواهند بود (۳۷، ۳۸).

سیستم دیگری که بر همین اساس عمل می‌نماید سیستم pCOR (یا plasmid with conditional origin of replication) می‌باشد که علاوه بر مزیت کاهش ساینز پلاسمید و حذف ژن مقاومت به آنتی بیوتیک با داشتن جایگاه همانندسازی شرطی، از انتقال پلاسمید به باکتری‌های دیگر جلوگیری به‌عمل می‌آورد. سیستم به یک سویه میزبان نیاز دارد که یک پروتئین آغازگر ترانس فعال بنام پی (π) را توسط ژن انتقال داده شده به‌داخل

کروموزوم باکتری (*pir gene*) کد می‌نماید. جایگاه همانند سازی پلاسمید برای شروع تکثیر به این پروتئین نیاز دارد و در صورتی که باکتری به میزبان فاقد پروتئین پی (π) انتقال یابد قادر به همانند سازی نخواهد بود (۳۹، ۴۰).

۲-۲. پلاسمیدهای مبتنی بر سیستم تیتراسیون اپراتور-رپرسور (*pORT*)

سیستم *pORT* (Operator-Repressor Titration) بر پایه تیتراسیون رپرسور متکی است. تیتراسیون اپراتور رپرسور به یک سویه باکتری اصلاح شده نیاز دارد که در آن ژن ضروری کد کننده تتراید رودیپیکولینات-N- سوکسینیل ترانسفراز (*dapD*) که در سنتز دیواره سلولی دخیل است و رشد سلولی را فراهم می‌کند، تحت کنترل اپراتور ژن *lac* قرار دارد و با رپرسور *lacI* تنظیم می‌شود. این در حالی است که چندین قطعه اپراتور ژن *lac* بر روی پلاسمید قرار داده شده است و در صورتی که وارد سلول شود، اپراتور تیتراسیون می‌شود. به عبارت بهتر با ورود پلاسمید به داخل سلول موقعیت اتصال برای رپرسور در سلول افزایش می‌یابد، در نتیجه فشار از روی اپراتور ژن برداشته می‌شود و امکان بیان ژن ضروری *dapD* ایجاد می‌گردد. فناوری *pORT* در برخی از مطالعات پیش بالینی و بالینی واکسن DNA برای HIV-1 و همچنین برای تثبیت پلاسمید در سالمونلا انتریکا برای تولید واکسن های باکتریایی زنده استفاده شده است (۴۴ - ۴۱).

۲-۳. پلاسمیدهای مبتنی بر سیستم برهم‌کنش RNA/RNA

سیستم های جدیدتر امروزه از برهم‌کنش RNA/RNA جهت حذف ژن مقاومت به آنتی بیوتیک در ساختار پلاسمید استفاده می‌کنند که به کاهش اندازه پلاسمید نیز کمک فراوان می‌نماید. این رویکردها بر یک سویه باکتری مهندسی شده ژنتیکی و یک تنظیم کننده *anti-sense RNA* کد گذاری شده توسط

پلاسمید که رشد سلول را تضمین می‌کند، تکیه دارند. یکی از این سیستم ها، سیستم RNA-OUT است. در این سیستم باکتری به گونه ای دست ورزی شده است که آنزیمی به نام لوان سوکراز تولید می‌کند که در شرایط حضور سوکروز آن را به یک متابولیت کشنده تبدیل می‌نماید. mRNA این آنزیم همراه با RNA کوچک RNA-IN در ناحیه ۵' سنتز می‌شود. پلاسمیدی که ترمیم کننده این سیستم است واجد ژنی است که RNA کوچک کوچکی بنام RNA-OUT کد می‌نماید که مکمل RNA-IN می‌باشد. در صورتی که پلاسمید نو ترکیب وارد سلول باکتری شود، با تولید RNA-OUT و اتصال آن به RNA-IN بیان آنزیم لوان سوکراز مختل می‌شود و سلول زنده می‌ماند. در این سیستم ادامه کشت و تکثیر سلول به جای آنتی بیوتیک فقط در حضور سوکروز و مقادیر ناچیزی آنتی بیوتیک کلرآمفنیکول صورت می‌گیرد (۴۵).

یکی از انواع پلاسمیدهایی که از این سیستم در حال حاضر استفاده می‌کند نانو پلاسمید است که علاوه بر حذف ژن مقاومت به آنتی بیوتیک، تنها بخش ضروری برای همانند سازی از جایگاه همانند سازی پلاسمید pUC را که حدود ۳۰۰ جفت باز است کد می‌نماید. در مجموع ناحیه پروکاریوتی در این پلاسمید به حداقل ممکن (کمتر از ۵۰۰ bp) کاهش داده شده است که به کاهش سایز پلاسمید تا ۱۷۰۰ bp کمک نموده است. این پلاسمید از جدیدترین نسل پلاسمید ها است که نه تنها فاقد ژن مقاومت به آنتی بیوتیک بوده و سایز بسیار کوچکی دارد، بلکه به علت کوچک شدن ناحیه پروکاریوتی بیان ژن تا حدود ۱۰ برابر نسبت به نسل اول پلاسمیدها افزایش یافته است. این پلاسمید از نظر توالی به گونه ای طراحی شد که با کاهش هومولوژی با کروموزوم انسان، احتمال نو ترکیبی به حداقل برسد. نکته حائز اهمیت تر این که بیان ژن تا مدت طولانی تری ادامه می‌یابد. این مسئله در ارتباط با عفونت هایی که برای حفظ ایمنی نیاز به بیان بلند مدت آنتی ژن در بدن دارند (نظیر عفونت لیشرمانیا) می‌تواند

کمک مؤثری نماید. این پلاسمید علاوه بر تغییراتی که در ناحیه پروکاریوتی دارد حاوی پروموتور سایتوگالوویروس (CMV) با عوامل مکمل برای افزایش رونویسی است و همین مسأله به افزایش بیان ژن کمک زیادی می‌نماید (۴۹-۴۶). اخیراً Suschak و همکاران داده‌هایی را از نانوپلاسمیدهای کدکننده آنتی‌ژن VEEV و ویروس ابولا که به عنوان واکسن استفاده می‌شوند، منتشر کرده‌اند. آن‌ها سلول‌های COS-7 را با پلاسمید نسل اول pWRG7077 کدکننده آنتی‌ژن‌های مختص ویروس VEEV و ویروس ابولا به موازات غلظت‌های مساوی از نانوپلاسمیدهای کدکننده پروتئین‌های مشابه، ترانسفکت کردند. سطح بیان آنتی‌ژن در سلول‌های ترانسفکت شده با نانوپلاسمید حتی پس از گذشت ۲۰۰ ساعت از ترانسفکشن به‌طور معنی‌داری بالاتر از پلاسمید pWRG7077 گزارش شد. نتایج واکسیناسیون نشان داد که علی‌رغم سطوح قابل مقایسه پاسخ ایمنی در گروه‌های واکسینه شده با نانوپلاسمیدها یا پلاسمید معمولی pWRG7077، میزان بقا به‌طور قابل توجهی در برابر چالش عفونی ویروس VEEV یا ابولا در گروه‌های واکسینه شده با نانوپلاسمید بهبود می‌یابد (۵۰). این مطالعه نشان داده است که عناصر ایمنی تحریک کننده اضافه شده روی ناحیه پروکاریوتی نانوپلاسمیدها مانند توالی‌های CpG و یا RNA‌های کوچک ایمنی تحریک کننده می‌توانند ایمنی‌زایی نانوپلاسمیدها را به‌عنوان ناقل واکسن غیر ویروسی بهبود بخشند (۵۱). در مطالعه دیگری که اخیراً توسط جاها نیا و همکاران انجام شد مشخص گردید که توالی‌های تحریک کننده ایمنی بر روی سازه‌های نانوپلاسمیدی از اهمیت برخوردار است. این موضوع در مقایسه واکسن DNA کدکننده ژن آپیراز در دو پلاسمید pcDNA و نانوپلاسمید و بر علیه عفونت لیشماتیا تروپیکا بررسی شد (۵۲).

اخیراً واکسن مبتنی بر نانوپلاسمید بر علیه SARS-Cov-2 با نام تجاری Covigenix VAX-001 وارد مراحل کارآزمایی بالینی شده است (NCT04591184). در این

طراحی، نانوپلاسمید بیان کننده پروتئین کامل spike ویروس به‌همراه توالی CpG و فعال کننده گیرنده RIG-1 در داخل سامانه‌های دارو رسان پروتئولپیدی بصورت درون عضلانی تزریق خواهد شد. این در حالی است که تعداد مطالعات مبتنی بر نانوپلاسمید با اهداف درمانی طبق گزارشات موجود در سامانه‌های کارآزمایی‌های بالینی نظیر <https://www.clinicaltrials.gov>، در ارتباط با موارد ابتلا به سرطان (NCT04515043)، حساسیت‌های آلرژیک (NCT01707069) و بیماری‌های عفونی خطرناک (ACTRN12615000094572) به‌مراتب بیش‌تر است.

رویکرد دیگر استفاده از یک RNA تنظیم کننده است (RNA-I) که به‌طور طبیعی بر روی جایگاه همانندسازی پلاسمید pUC19 کدگذاری می‌شود و برای مهار رپرسور ژن ضروری *mur A* (کدکننده یوریدین دی فسفات N-استیل گلوکوزامین انول پیرویل ترانسفراز برای مونتاژ پپتیدو گلیکان دیواره) در سویه‌های murselect استفاده می‌شود. ژن ضروری *mur A* تحت کنترل رپرسوری قرار دارد که mRNA آن به‌همراه RNA کوچکی در سمت ۵' سنتز می‌شود (RNA-II). هنگام ورود پلاسمید به سلول باکتری، با تولید RNA-I و اتصال آن به RNA-II که در ابتدای ژن رپرسور قرار دارد، تولید پروتئین رپرسور متوقف می‌شود و با فعالیت ژن *mur A* سلول زنده می‌ماند. مزیت اصلی این سیستم کاهش ساین ناحیه پروکاریوتی به کم‌تر از سیستم RNA-OUT است، چون RNA-I در داخل خود جایگاه همانند سازی کد می‌شود (۱۵، ۵۳).

بحث

واکسن‌های DNA، علی‌رغم مزایای قابل توجه برای دفاع در برابر بیماری‌های عفونی، برای استفاده انسانی توسط سازمان‌های نظارتی محدود شده‌اند. نگرانی اصلی بخش پروکاریوتی موجود بر روی پلاسمیدهای نسل اول می‌باشد که حاوی ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک و جایگاه همانندسازی بوده و

برای تکثیر و انتخاب پلاسمیدهای نو ترکیب در مرحله آزمایشگاهی به کار می‌روند. انتقال افقی ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک در بدن میزبان به سایر باکتری‌ها از جمله مهم‌ترین نگرانی‌های زیستی این نوع پلاسمیدها می‌باشد. علاوه بر نگرانی‌های ایمنی، برخی مشکلات تکنیکی ذاتی سازه‌های DNA، استفاده عمومی در جمعیت انسانی را با مشکل مواجه کرده است. مهم‌تر از همه، اندازه بزرگ پلاسمیدهای نسل اول است که کارایی انتقال موثر به درون سلول‌ها و سپس مهاجرت به سمت هسته را کاهش می‌دهد (۲۵، ۲۶، ۵۴). در حال حاضر تکنولوژی‌های جدید که در این مقاله توضیح داده شد، به جایگزینی ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک با سیستم‌های کاملاً ایمن غیر وابسته به آنتی بیوتیک منجر شده است. این نوع تکنولوژی‌ها علاوه بر حذف نگرانی انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی به باکتری‌های دیگر به ویژه باکتری‌های همزیست با انسان، به کاهش اندازه پلاسمیدها نیز کمک شایانی نموده‌اند. برای دستیابی به بیان، یک پلاسمید باید از سیتوپلاسم عبور نماید تا در نهایت به هسته برسد. انتشار DNA از سیتوپلاسم که مملو از مولکول‌های مختلف است تا هسته سلول‌ها به شدت وابسته به اندازه پلاسمید می‌باشد به گونه‌ای که DNA های بزرگ‌تر از ۲۰۰۰ جفت باز با سرعت کم‌تر به هسته انتشار می‌یابند و این مسئله زمان تولید پروتئین نو ترکیب در سلول را به تعویق می‌اندازد (۲۱). به طور کلی، به نظر می‌رسد که کاهش اندازه DNA پلاسمید برای انتقال سریع‌تر بسیار مفید است و بنابراین راندمان بیان را به مراتب افزایش می‌دهد. این موضوع در ارتباط با واکسن‌های چند ظرفیتی پروتئینی که اندازه بسیار بزرگی دارند حائز اهمیت است ولی مطالعه چندان در این زمینه وجود ندارد.

سازه‌های DNA نسل جدید در حال حاضر جزو بهترین گزینه‌ها برای جایگزینی سازه‌های نسل اول محسوب می‌شوند تا واکسن‌های DNA را به سطح استفاده انسانی با ایمنی کافی و بدون نگرانی ارتقاء

دهند. اما هم‌چنان نکاتی وجود دارد که نیازمند بررسی‌های بیش‌تر است. یکی از این موارد کاهش خاصیت خودادجوانی سازه‌های DNA پس از حذف یا کاهش اندازه‌ی نواحی پروکاریوتی است. دی نوکلئوتیدهای سیتوزین-فسفات-گوانین یک موتیف CpG متمرکز است که در ژنوم باکتری به صورت غیر متیله وجود دارد. سکانس CpG غیر متیله حداقل چهار برابر بیش‌تر در DNA پروکاریوتی نسبت به DNA یوکاریوتی وجود دارد و از دسته "الگوهای مولکولی مرتبط با باکتری پاتوژن" یا PAMP ها محسوب می‌شوند که با تحریک سلول‌های دندریتیک حاوی TLR-9 پاسخ ایمنی ذاتی را تحریک می‌کنند (۵۸-۵۵). بنابراین، بسیاری از وکتورهای پلاسمیدی حاوی محرک داخلی ایمنی هستند که می‌تواند برای واکسیناسیون DNA ارزشمند باشد در حالی که کاهش ناحیه پروکاریوتی می‌تواند به این ویژگی لطمه وارد کند. لزوم افزودن مولکول‌های ادجوانت به سازه‌های تقلیل یافته DNA از موارد مهمی است که نیاز به بررسی‌های بیش‌تر دارد.

آینده طراحی پلاسمید در توسعه واکسن و ایمونوتراپی، فراتر از پلاسمیدهای باکتریایی نسل اول، به سمت نسل جدیدی از ناقل‌های DNA مصنوعی، کوچک شده و چند کاره در حال حرکت است. این نوآوری‌ها، همراه با سیستم‌های دارو رسانی پیشرفته، آماده ایجاد تحول هم در زمینه درمان‌های قوی‌تر، بادوام‌تر و ایمن‌تر برای طیف وسیعی از بیماری‌های ژنتیکی و سرطان‌ها خواهند بود و هم به پیشگیری از بسیاری از بیماری‌های عفونی پیچیده که مقابله با آن‌ها نیازمند پاسخ‌های ایمنی سلولی است منجر خواهد شد.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل طرح شماره ۱۲۰۳ مصوب انستیتو پاستور ایران است که بدین وسیله از انستیتو پاستور ایران قدردانی می‌گردد.

References

- 1- Pizza M, Pecetta S, Rappuoli R. Vaccines 2020: The era of the digital vaccine is here. *Sci Transl Med* 2021;13(624):eabm3249. PMID: 34910549
- 2- Bottomley MJ, Rappuoli R, Finco O. Vaccine design in the 21st century. In: *The vaccine book*. Elsevier; 2016. p. 45-65.
- 3- Volpedo G, Bhattacharya P, Gannavaram S, Pacheco-Fernandez T, Oljuskina T, Dey R, et al. The history of live attenuated centrin gene-deleted *Leishmania* vaccine candidates. *Pathogens* 2022;11(4):431. PMID: 35456106.
- 4- Teng M, Yao Y, Nair V, Luo J. Latest advances of virology research using CRISPR/Cas9-based gene-editing technology and its application to vaccine development. *Viruses* 2021;13(5):779. PMID: 33924851
- 5- Liu MA. A comparison of plasmid DNA and mRNA as vaccine technologies. *Vaccines* 2019;7(2):37. PMID: 31022829
- 6- Seyed N, Taheri T, Rafati S. Live attenuated-nonpathogenic *Leishmania* and DNA structures as promising vaccine platforms against leishmaniasis: innovations can make waves. *Front Microbiol* 2024;15:1326369. PMID: 38633699
- 7- Lee J, Arun Kumar S, Jhan YY, Bishop CJ. Engineering DNA vaccines against infectious diseases. *Acta Biomater* 2018;80:31-47. PMID: 30172933
- 8- Gary EN, Weiner DB. DNA vaccines: prime time is now. *Curr Opin Immunol* 2020;65:21-27. PMID: 32259744
- 9- Kozak M, Hu J. DNA vaccines: their formulations, engineering and delivery. *Vaccines* 2024;12(1):71. PMID: 38250884
- 10- Ghaffarifar F. Plasmid DNA vaccines: where are we now? *Drugs Today* 2018;54(5):315-333. PMID: 29911696
- 11- Redding L, Weiner DB. DNA vaccines in veterinary use. *Expert Rev Vaccines* 2009;8(9):1251-1276. PMID: 19722897.
- 12- Lopes A, Vandermeulen G, Preat V. Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38(1):146. PMID: 30953535.
- 13- Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev* 2011;239(1):62-84. PMID: 21198665
- 14- Myhr AI. DNA vaccines: regulatory considerations and safety aspects. *Curr Issues Mol Biol* 2017;22:79-88. PMID: 27705898.
- 15- Williams JA. Vector design for improved DNA vaccine efficacy, safety and production. *Vaccines (Basel)* 2013;1(3):225-249. PMID: 26344110.
- 16- Mairhofer J, Cserjan-Puschmann M, Striedner G, Nobauer K, Razzazi-Fazeli E, Grabherr R. Marker-free plasmids for gene therapeutic applications--lack of antibiotic resistance gene substantially improves the manufacturing process. *J Biotechnol* 2010;146(3):130-137. PMID: 20138928.
- 17- Sousa Â. DNA vaccines. Humana Press; 2021.
- 18- Rozkov A, Avignone-Rossa CA, Ertl PF, Jones P, O'Kennedy RD, Smith JJ, et al. Characterization of the metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnol Bioeng* 2004;88(7):909-915. PMID: 15532038.

- 19- Gracey Maniar LE, Maniar JM, Chen ZY, Lu J, Fire AZ, Kay MA. Minicircle DNA vectors achieve sustained expression reflected by active chromatin and transcriptional level. *Mol Ther* 2013;21(1):131-138. PMID: 23183534.
- 20- Lu J, Zhang F, Xu S, Fire AZ, Kay MA. The extragenic spacer length between the 5' and 3' ends of the transgene expression cassette affects transgene silencing from plasmid-based vectors. *Mol Ther* 2012;20(11):2111-2119. PMID: 22565847.
- 21- Yin W, Xiang P, Li Q. Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system. *Anal Biochem* 2005;346(2):289-294. PMID: 16213455.
- 22- Rosazza C, Escoffre JM, Zumbusch A, Rols MP. The actin cytoskeleton has an active role in the electrotransfer of plasmid DNA in mammalian cells. *Mol Ther* 2011;19(5):913-921. PMID: 21343915
- 23- Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, Verkman AS. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 2000;275(3):1625-1629. PMID: 10636854.
- 24- Marie C, Scherman D. Antibiotic-free gene vectors: a 25-year journey to clinical trials. *Genes* 2024;15(3):261. PMID: 38540320
- 25- Oliveira PH, Mairhofer J. Marker-free plasmids for biotechnological applications - implications and perspectives. *Trends Biotechnol* 2013;31(9):539-547. PMID: 23830144.
- 26- Mignon C, Sodoyer R, Werle B. Antibiotic-free selection in biotherapeutics: now and forever. *Pathogens* 2015;4(2):157-181. PMID: 25854922.
- 27- Hardee CL, Arevalo-Soliz LM, Hornstein BD, Zechiedrich L. Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy. *Genes* 2017;8(2):65. PMID: 28208635.
- 28- Darquet AM, Cameron B, Wils P, Scherman D, Crouzet J. A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Ther* 1997;4(12):1341-1349. PMID: 9472558.
- 29- Pang X, Ma F, Zhang P, Zhong Y, Zhang J, Wang T, et al. Treatment of human B-cell lymphomas using minicircle DNA vector expressing anti-CD3/CD20 in a mouse model. *Hum Gene Ther* 2017;28(2):216-225. PMID: 27802782.
- 30- Li F, Cheng L, Murphy CM, Reszka-Blanco NJ, Wu Y, Chi L, et al. Minicircle HBV cccDNA with a Gaussia luciferase reporter for investigating HBV cccDNA biology and developing cccDNA-targeting drugs. *Sci Rep* 2016;6:36483. PMID: 27819342
- 31- Wang Q, Jiang W, Chen Y, Liu P, Sheng C, Chen S, et al. In vivo electroporation of minicircle DNA as a novel method of vaccine delivery to enhance HIV-1-specific immune responses. *J Virol* 2014;88(4):1924-1934. PMID: 24284319
- 32- Jiang Y, Gao X, Xu K, Wang J, Huang H, Shi C, et al. A novel Cre recombinase-mediated in vivo minicircle DNA (CRIM) vaccine provides partial protection against Newcastle disease virus. *Appl Environ Microbiol* 2019;85(14): :e00407-419. PMID: 31053588
- 33- Dietz WM, Skinner NE, Hamilton SE, Jund MD, Heitfeld SM, Litterman AJ, et al. Minicircle DNA is superior to plasmid DNA in eliciting antigen-specific CD8+ T-cell responses. *Mol Ther* 2013;21(8):1526-1535. PMID: 23689601
- 34- Munye MM, Tagalakakis AD, Barnes JL, Brown RE, McAnulty RJ, Howe SJ, et al.

- Minicircle DNA provides enhanced and prolonged transgene expression following airway gene transfer. *Sci Rep* 2016;6:23125. PMID: 26975732.
- 35- Marie C, Vandermeulen G, Quiviger M, Richard M, Preat V, Scherman D. pFARs, plasmids free of antibiotic resistance markers, display high-level transgene expression in muscle, skin and tumour cells. *J Gene Med* 2010;12(4):323-332. PMID: 20209487
- 36- Prommersberger S, Reiser M, Beckmann J, Danhof S, Amberger M, Quade-Lyssy P, et al. CARAMBA: a first-in-human clinical trial with SLAMF7 CAR-T cells prepared by virus-free Sleeping Beauty gene transfer to treat multiple myeloma. *Gene Ther* 2021;28(9):560-571. PMID: 33846552
- 37- Marie C, Richard M, Vandermeulen G, Quiviger M, Pr  at V, Scherman D. pFAR plasmids: new eukaryotic expression vectors for gene therapy, devoid of antibiotic resistance markers. *Nature Precedings* 2008.
- 38- Bakker NAM, de Boer R, Marie C, Scherman D, Haanen J, Beijnen JH, et al. Small-scale GMP production of plasmid DNA using a simplified and fully disposable production method. *J Biotechnol* 2019;306S:100007. PMID: 34112376
- 39- Soubrier F, Cameron B, Manse B, Somarriba S, Dubertret C, Jaslin G, et al. pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy. *Gene Ther* 1999;6(8):1482-1488. PMID: 10467373.
- 40- Soubrier F, Laborderie B, Cameron B. Improvement of pCOR plasmid copy number for pharmaceutical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;66(6):683-688. PMID: 15349701.
- 41- Kamensek U, Rencelj A, Jesenko T, Remic T, Sersa G, Cemazar M. Maintenance and gene electrotransfer efficiency of antibiotic resistance gene-free plasmids encoding mouse, canine and human interleukin-12 orthologues. *Heliyon* 2022;8(2):e08879. PMID: 35265755.
- 42- Cranenburgh RM, Hanak JA, Williams SG, Sherratt DJ. Escherichia coli strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic Acids Res* 2001;29(5):E26. PMID: 11222777
- 43- Mwau M, Cebere I, Sutton J, Chikoti P, Winstone N, Wee EG, et al. A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J Gen Virol* 2004;85(Pt 4):911-919. PMID: 15039533.
- 44- Ramos I, Alonso A, Peris A, Marcen JM, Abengozar MA, Alcolea PJ, et al. Antibiotic resistance-free plasmid DNA expressing LACK protein leads towards a protective Th1 response against Leishmania infantum infection. *Vaccine* 2009;27(48):6695-6703. PMID: 19747996.
- 45- Luke J, Carnes AE, Hodgson CP, Williams JA. Improved antibiotic-free DNA vaccine vectors utilizing a novel RNA-based plasmid selection system. *Vaccine* 2009;27(46):6454-6459. PMID: 19559109.
- 46- Seyed N, Zahedifard F, Habibzadeh S, Yousefi R, Lajevardi MS, Gholami E, et al. Antibiotic-free nanoplastids as promising alternatives for conventional DNA vectors. *Vaccines* 2022;10(10):1710. PMID: 36298575

- 47- Williams JA, Paez PA. Improving cell and gene therapy safety and performance using next-generation nanoplasmid vectors. *Mol Ther Nucleic Acids* 2023;32:494-503. PMID: 37346980
- 48- Mitdank H, Troger M, Sonntag A, Shirazi NA, Woith E, Fuchs H, et al. Suicide nanoplasמידs coding for ribosome-inactivating proteins. *Eur J Pharm Sci* 2022;170:106107.
- 49- Chowdhury IH, Lokugamage N, Garg NJ. Experimental nanovaccine offers protection against repeat exposures to *Trypanosoma cruzi* through activation of polyfunctional T cell response. *Front Immunol* 2020;11:595039. PMID: 33414785
- 50- Suschak JJ, Dupuy LC, Shoemaker CJ, Six C, Kwilas SA, Spik KW, et al. Nanoplasmid vectors co-expressing innate immune agonists enhance DNA vaccines for Venezuelan equine encephalitis virus and Ebola virus. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2020;17:810-821. PMID: 32296729
- 51- Suschak JJ, Williams JA, Schmaljohn CS. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother* 2017;13(12):2837-2848. PMID: 28604157
- 52- Hosseinpour Jahednia S, Rezvan H, Sarvnaz H, Habibzadeh S, Taheri T, Seyed N, et al. Evaluating the effect of immunization with DNA encoding *Phlebotomus sergenti* apyrase protein (PsSP42) against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mouse model. *Parasit Vectors* 2026;19(1):163. PMID: 41803904
- 53- Pfaffenzeller I, Mairhofer J, Striedner G, Bayer K, Grabherr R. Using ColE1-derived RNA I for suppression of a bacterially encoded gene: implication for a novel plasmid addiction system. *Biotechnol J* 2006;1(6):675-681. PMID: 16892316
- 54- Hardee CL, Arevalo-Soliz LM, Hornstein BD, Zechiedrich L. Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy. *Genes (Basel)* 2017;8(2):65. PMID: 28208635
- 55- Wojciechowski M, Czapinska H, Bochtler M. CpG underrepresentation and the bacterial CpG-specific DNA methyltransferase M.MpeI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(1):105-110. PMID: 23248272
- 56- Zhou W, Liang G, Molloy PL, Jones PA. DNA methylation enables transposable element-driven genome expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117(32):19359-19366. PMID: 32719115
- 57- Krieg AM. From A to Z on CpG. *Trends Immunol* 2002;23(2):64-65. PMID: 11929127
- 58- Ruan M, Thorn K, Liu S, Li S, Yang W, Zhang C, et al. The secretion of IL-6 by CpG-ODN-treated cancer cells promotes T-cell immune responses partly through the TLR-9/AP-1 pathway in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2014;44(6):2103-2110.