

文章编号: 1004-0374(2013)09-0858-07

核酸疫苗的安全性及其优化策略研究

邱春红¹, 陈开廷¹, 王永堂², 鲁秀敏^{1*}

(1 重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054; 2 第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

摘要: 核酸疫苗是 20 世纪 90 年代兴起的一种新型疫苗, 已在免疫学及预防医学等方面显示出巨大潜能, 迄今已有 10 余种被 FDA 批准进入非临床和临床试验。然而, 目前仍存在许多尚未解决的问题, 如生产工艺、质量标准、制剂和效应, 特别是安全性方面的问题, 它直接关系到核酸疫苗的应用。因此, 解决安全问题是目前核酸疫苗研究的热点和焦点。核酸疫苗的安全隐患主要包括基因整合、免疫学疾病、种属、个体差异性 & 生产带来的一些安全隐患。为此, 对其进行优化设计及生产主要应从表达载体、免疫佐剂、免疫途径及免疫程序等方面进行优化。主要就核酸疫苗的安全性方面问题及有关优化策略作一综述, 希望对核酸疫苗的基础研究与临床应用具有一定的指导意义。

关键词: 核酸疫苗; 安全性; 优化

中图分类号: Q789; R392.11; R967 文献标志码: A

The research on safety of DNA vaccine and its optimization

QIU Chun-Hong¹, CHEN Kai-Ting¹, WANG Yong-Tang², LU Xiu-Min^{1*}

(1 College of Pharmacy and Biological Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;
2 State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Nucleic acid vaccine is a brand-new vaccine sprung up in 1990s, and has shown its tremendous potentials in immunology and preventive medicals. Up to date, more than 10 DNA vaccines have been approved by FDA to conduct clinical and non-clinical experiments. However, there are still some unsolved problems, such as manufacturing techniques, quality standards, preparation and effects. Among the problems, safety is of major importance as it has a direct bearing on the application of DNA vaccine. Therefore, to address the security concern is the hot-spot and focus of current research on DNA vaccine. For the time being, security risks mainly include gene integration, immunologic diseases, difference of species and individuals, risks emerging in manufacturing process. To this end, we are supposed to optimize the designation and manufacturing of it, mainly from aspects such as expression vector, immunoadjuvant, immunization route, and immunization program. This paper aims to give a review on safety of DNA vaccine as well as optimum strategies, and thus be of significance to fundamental and clinical researches.

Key words: nucleic acid vaccine; safety; optimization

核酸疫苗 (nucleic acid vaccine) 是在基因治疗研究领域 & 发展起来的一种全新的免疫防治剂。所

谓核酸疫苗是指将含有编码某种抗原蛋白的基因与表达质粒重组后直接导入人或动物体内, 通过宿主

收稿日期: 2013-03-23; 修回日期: 2013-05-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81101464); 重庆市教委科学技术研究项目 (KJ100804); 重庆理工大学研究生创新基金资助项目 (YCX2012319)

*通信作者: E-mail: luxm@cqut.edu.cn

细胞的转录系统合成抗原蛋白, 诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答反应, 包括体液免疫及细胞免疫, 以达到预防和治疗疾病的目的^[1-3]。与传统疫苗相比, 核酸疫苗具有许多潜在的优势, 它的诞生给基因治疗和免疫学领域带来了不可估量的前景, 开创了疫苗学研究的新纪元, 被誉为第三代疫苗^[3-4]。核酸疫苗包括 DNA 疫苗和 RNA 疫苗两大类, 但目前涉及的主要是 DNA 疫苗。DNA 疫苗是指含有编码抗原基因的真核表达质粒 DNA, 经体内接种后, 可被体细胞摄取, 并转录、翻译、表达相应的抗原, 然后通过不同途径刺激机体产生针对此种抗原的免疫应答。随着多种 DNA 疫苗进入临床实验阶段, 其安全性问题便成为人们关注的焦点。

1 核酸疫苗的安全性问题

核酸疫苗的产生极大地丰富了免疫学的内容, 解决了目前生物制剂存在的诸多问题, 展示了其强大的优越性和生命力; 但是, 核酸疫苗自诞生以来, 安全性一直是人们关心的问题, 也是其日后能否应用于临床的关键^[3]。研究人员一般通过观察实验动物的体重和死亡率来初步评价 DNA 疫苗的安全性问题^[5], 为进一步评价 DNA 疫苗临床前的安全性, 美国 FDA 颁布了核酸疫苗安全性方面的相关文件, 规定主要从系统毒性、基因毒性、生殖毒性、免疫毒性和致癌性等方面对其进行评价。DNA 疫苗临床前的安全性问题主要表现为如下。

1.1 基因整合

目前对 DNA 疫苗接种后其在体内的分布、残留情况及毒理学特性还有待进一步研究, 有可能与宿主细胞基因组发生整合^[6-8]。通常某种药物给药后, 其产生的不良反应大小一般与给药剂量、给药途径等密切相关。同样, 基因整合与核酸疫苗的接种剂量和接种途径等多种因素有关。通常情况下, 人们认为给药剂量越大, 药物在体内的残留量也越大, 即外源 DNA 的残留量越大, 整合的风险就越大; DNA 疫苗的给药途径具有多样性, 可通过肌肉注射、皮下注射、黏膜给药、基因枪、电穿孔等技术途径给药^[3-4,9-10]。不同给药途径, 发生外源基因与机体基因组整合的可能性也有所差异, 其中肌肉注射较为安全。目前检测是否发生基因整合的常用方法有聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)、定量 PCR (quantitative polymerase chain reaction, qPCR)、逆转录 PCR (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 等^[5,11]。

Dolter 等^[11]通过肌肉注射或电穿孔技术给小鼠接种预防 I 型人体免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 的 DNA 疫苗 ADVAX, 7 d 后使用 qPCR 的方法检测血液、骨髓、睾丸/子宫、大脑、脾、肾、肝、心、肺淋巴结、注射部位肌肉中 ADVAX 的残留情况, 结果发现大多数只有在注射部位的皮肤及肌肉组织中能检测到低浓度的质粒, 其余器官组织均检测不到, 提示动物接种核酸疫苗后, 外源基因以 DNA 形式在体内的残留时间短、分布较局限、与宿主基因组整合的概率较小。尽管如此, 整合的可能性仍然存在, 外源基因可能会通过随机整合、同源重组或(和)逆转录病毒插入等方式与机体 DNA 发生基因整合, 从而诱发体内基因组 DNA 的改变, 最终引发一系列疾病。尤为可怕的是可能会激活机体的原癌基因、失活其抑癌基因, 更甚者外源 DNA 本身就携带有活性癌基因而导致有活性的癌基因的插入, 最终导致癌症的发生^[11-12]; 另外, 由于染色体基因发生改变, 使其遗传物质在染色体水平、碱基水平上受到不同程度的损伤, 从而可能造成不可估量的遗传毒性^[5]; 再者, 若外源 DNA 与性细胞染色体发生整合则将导致种系的突变, 产生生殖毒性, 但目前尚没有因为接种 DNA 疫苗后外源质粒整合到生殖系细胞基因组而产生生殖毒性的报道^[3]。Liu 等^[5]用同样剂量的抗犬传染性肝炎病毒 DNA 疫苗 pVAX1-CpG-Loop 肌肉接种免疫 112 只 BALB/c 雌、雄小鼠后, 发现两周龄后代重量与未免疫小鼠后代无差异, 通过 PCR 方法检测不到接种的质粒, 说明外源基因没有整合到种系基因组 DNA 中, 不会遗传给后代, 表明并没有产生生殖方面的毒性。

1.2 免疫学问题

1.2.1 自身免疫性

自身免疫性疾病是机体对自身成分发生免疫应答而导致的疾病状态。DNA 疫苗可以预防某些自身免疫性疾病, 但接种后也可能引起机体的免疫功能紊乱, 产生潜在的抗 DNA 抗体, 持续不断地对外源 DNA 产生免疫反应, 从而诱发自身免疫性疾病^[13-15]。在设计制备 DNA 疫苗时, 为增强其免疫效果往往在构建载体时引入一种未甲基化的六聚核苷酸序列 CpG, 其结构为 5'-嘌呤-嘌呤-CpG-嘧啶-嘧啶-3', 尽管一定程度上能增强细胞免疫, 但同时又具有诱导产生抗 DNA 抗体的缺点, 进而增加了自身免疫性疾病发生的概率^[16-17]。

虽然质粒 DNA 自身没有免疫原性或免疫原性

非常微弱,不足以引起免疫应答,不易产生自身免疫性疾病,而且目前已有研究表明 DNA 疫苗免疫后动物血清中并未检测到抗 DNA 抗体,也不会发生自身免疫性疾病^[3,18],但这种风险不容忽视,因此在 DNA 疫苗的临床试验中,应对接种者进行抗 DNA 抗体检测,以确保其安全性^[19]。

1.2.2 免疫耐受

免疫耐受是指在抗原刺激下,对抗原特异应答的 T 与 B 细胞,不能被激活产生特异免疫效应细胞,从而不能执行正免疫应答效应的现象。DNA 疫苗接种后,在体内通过转录系统表达抗原蛋白,且其在体内免疫持续时间尚未明确,外源蛋白在体内的长期表达就有可能导致免疫病理反应。如果这种表达强度和所持续时间未得到合理控制,使接种者一直都保持一定强度的免疫应答,从而引发免疫耐受,使接种者受到免疫损伤。通常情况下,如果这种表达的程度处于持续低水平状态,那么外源抗原可能会被血液中的中和抗体清除,而不能引起机体足够的免疫应答,最终将导致疫苗失效;相反,如果这种表达的程度处于持续高水平状态,可能诱导机体产生“超免”现象,使机体免疫抑制而易感染其他病原体,最终导致传染病的发生^[19-20]。临床试验表明,志愿者接种疫苗后能发生耐受,但并无明显严重的不良反应^[18]。由于婴幼儿、儿童免疫系统尚不完善,老年人免疫力降低,免疫耐受在此类人群中更易发生。既然免疫耐受有发生的可能,那么应高度重视,注射疫苗后应时刻监测其发生的可能性,及时采取必要的应对措施^[21-22]。

1.2.3 免疫交叉反应

外源质粒 DNA 中的非目的基因也可能在体内编码蛋白而带来不良反应。载体本身一般都带有信号肽系列,它对于编码的蛋白分泌到细胞外环境是必要的,且这种分泌作用较强,有促进疫苗产生较强的免疫应答反应,更好发挥其疗效的作用,但由于信号肽本身也能作为基因疫苗,产生抗原来诱导保护性免疫反应,最终可能会诱导免疫交叉反应^[22]。除此之外,还可能会使接种者发生过敏反应性疾病及超敏反应性疾病等免疫学问题。

1.3 种属、个体免疫效果差异问题

目前,很多研究者都发现核酸疫苗在不同动物个体中免疫效果存在较大差异,有些疫苗在临床前小个体动物中免疫和保护效果较好,但在大个体动物和人中却得不到预想效果,可能是不同个体间使用剂量随重量变化的比例不同、人与动物的免疫系

统有所区别等尚不明确的原因所致^[23]。就目前较常用的接种途径——肌肉注射而言,原因可能与不同个体间的结缔组织有关,因为大个体动物肌间结缔组织较小鼠等小个体动物的结缔组织更为丰富,转染效率较低,导致其免疫和保护效果有所降低。另外,目前对 DNA 疫苗研究进行的实验都是以动物为模型,完全可应用的疫苗仅存在于动物疾病的预防及治疗,应用于人体的都还在进行临床实验阶段,最终应用于人体后是否出现不良反应还有待考证^[24]。

1.4 疫苗生产中带来的安全性问题

疫苗生产过程中的某些因素对人类健康存在直接或间接的危害。目前大多数的核酸疫苗在构建过程中都依赖于抗生素抗性选择标志来筛选含有构建好的外源质粒的菌体,并保证构建的外源质粒能够稳定遗传,问题在于抗生素抗性选择标志在质粒提纯时,难免会残留微量抗生素,这对接种者的体内微环境是不利的^[25];核酸疫苗的生产一般都需借助生产用工程菌,由于菌体中含有内毒素,而且制品在提纯过程中可能会含有内毒素,接种入机体后使机体产生严重的毒性作用;通过某些飞行生物将危害健康的基因传至某些食物中,影响食物的品质^[26],这些都直接影响了机体的健康。核酸疫苗在上市之前要经过一个漫长的实验阶段,这期间,免疫动物和人体内引入的外源质粒可能还有残留,残留的质粒可能通过被接种者的分泌物、排泄物或遗体的腐败物向外界环境转移,进一步与环境中的细菌、病毒或寄生虫基因重组而造成扩散,或在被免疫动物体内与细菌、病毒或寄生虫等基因发生重组向外界扩散^[27-28];载体质粒上常含有抗生素基因,因为质粒可能会转化到接种动物体内的微生物区系,甚至扩散到外界环境微生物系中,从而造成抗性基因扩散,引发微生物系产生新的抗药性和适应性,造成又一种“超级细菌”的产生^[29-30],这些都影响到人类生存的环境,间接影响了人类的健康。

虽然这些仅是一种推测,环境中存在大量的 DNA 酶来降解被排泄到环境中的质粒,对环境产生污染的概率较小,但一旦发生后果将相当严重,因此,应该高度重视,不断监测其发生的可能性。

2 核酸疫苗的优化

目前核酸疫苗在应用方面仍存在一些不足,如何使核酸疫苗更安全有效,将是今后研究的主要方向。如能对其进行适当优化,最大限度克服其带来

的安全性问题, 那么核酸疫苗将在基因治疗领域具有更广泛的应用前景。目前主要在以下几个方面进行优化。

2.1 免疫原基因的选择

免疫原基因即目的基因, 接种疫苗后, 其起真正的预防治疗作用的为药物的有效成分, 因此, 在选用免疫原基因时应该对病原体基因组进行充分的了解, 选择其主要保护性抗原基因或选用其抗原表位所对应的核苷酸序列, 将之克隆入合适的真核表达载体, 使目的基因能够高效地表达抗原蛋白^[23, 31]。目前的常用方法有构建互补 DNA (cDNA) 文库获取、用聚合酶链式反应 (PCR) 方法获取、人工合成候选基因 (利用 DNA 合成仪) 等等。

2.2 真核表达载体的优化

真核表达载体表达抗原蛋白的能力强弱直接关系到其诱导宿主产生免疫应答的能力, 因此, 选择合适的启动子与增强子系统对核酸疫苗蛋白的表达水平至关重要^[32]。可利用较强的启动子、提高启动子的效率、优化密码子、甲基化碱基等方式改造载体骨架^[18, 33-35]或通过添加合适的免疫刺激序列 (immunostimulatory sequence, ISS) 来优化真核表达质粒。在核酸疫苗中, 重组质粒载体不仅发挥抗原的作用, 载体本身中的免疫刺激序列 (ISS) 还可充当免疫佐剂, 提高免疫应答能力, 使机体获得更快、更有效、更持久的免疫作用^[36]。目前, 关于免疫刺激序列的研究主要集中在 CpG 序列上, CpG 寡脱氧核苷酸基序与 Toll 样受体 9 (Toll-like receptor 9, TLR9) 相互作用, 共同刺激机体的先天性免疫和获得性免疫系统, 从而提高疫苗的免疫效果, 在肿瘤及感染性疾病中应用广泛^[35]。另外, 由于载体中的抗性标记基因可能给环境带来危害, 因此, 应尽量选择不含抗性基因的质粒^[25]。

2.3 免疫佐剂的优化

佐剂是一种预先或与抗原同时注入体内, 可增强机体对该抗原的免疫应答或改变免疫应答类型的非特异性免疫增强物, 对于疫苗免疫应答的产生和增强具有重要作用。更好地了解免疫系统并对其进行调控, 可通过改善佐剂, 提高疫苗的免疫原性。常用佐剂如细胞因子佐剂、趋化因子和协同刺激分子佐剂、补体分子佐剂、基因佐剂以及其他一些分子能调控核酸疫苗诱导的免疫应答类型及增强免疫应答强度^[22, 37]。免疫佐剂在与核酸疫苗共同接种时, 常能明显提高体液和细胞免疫反应, 如将抗 HIV-1 的 DNA 疫苗与细胞因子加粒细胞巨噬细胞-集落

刺激因子 (granular cell macrophages-colony stimulating factor, GM-CSF) 共同接种机体, 可以使机体的树突细胞 (dendritic cell, DC) 数量有所增加, 因而能增强机体的细胞及体液免疫^[38]; 但这种免疫佐剂与核酸疫苗共同接种的方式不同, 产生免疫促进作用不同, 且不同的细胞因子经常会产生不同的效果, 有些甚至会产生一些负面效应^[17]。因此, 在选择该使用何种佐剂或是否有必要使用佐剂时, 应该充分考虑各项指标, 指导佐剂的正确选择及使用。

2.4 免疫途径的优化

不同的免疫途径和免疫方式可对抗原 DNA 的吸收、表达和呈递产生影响, 从而诱导出不同强度的免疫反应。常用的免疫途径主要为肌肉注射, 目前还兴起一些新的接种技术, 如电穿孔、纳米粒、基因枪等^[22, 39], 应根据不同的免疫原和宿主类型选择最佳接种方式。在选择免疫途径上, 应该综合考虑转染效率, 接种部位抗原提呈细胞 (antigen presenting cells, APCs) 的抗原提呈能力, 方便性及有效性, 是否对组织产生刺激、毒性等因素, 得到最佳的接种途径。当前比较热门的是电穿孔技术的应用, 使用电穿孔技术介导基因定位给药的方法传递 DNA, 可最大程度提高转染效率而减少药物的使用量^[40]; 再者, 这种技术可以使用不同的接入点, 使机体产生不同的免疫应答反应: 以肌肉为接入点进行电穿孔给药的方式主要是使机体产生细胞免疫; 以皮下为接入点则是引起机体的体液免疫。同时使用这两个接入点能够达到协同提高免疫应答的效应。Lin 等^[41]同时以肌肉及皮肤为接入点使用电穿孔介导技术, 给荷兰猪接种抗流感病毒 (influenza virus H5 hemagglutinin, H5HA) 的 DNA 疫苗, 抗体滴度检测结果发现, 此种接种途径动物产生的抗体滴度显著高于单纯通过肌肉或皮下接种途径所产生的抗体滴度。单纯用一种给药途径给药, 一般情况下生物利用度较低、免疫效果不够理想而需要加大接种的剂量。因此, 通过两种给药途径联用来增强免疫效果而降低剂量, 避免机体的耐受剂量^[42]。

2.5 免疫程序的优化

核酸疫苗的免疫效果与接种剂量和次数成正比, 较高剂量和较多次数接种, 可产生较高水平的抗原蛋白和相应的抗体, 但这种相关性也随着抗原基因的种类不同而发生改变。对于无毒性的表达蛋白, 为了让其能够产生较高水平的表达蛋白和抗体而达到更强的免疫效率, 应该采用较高的接种剂量和较频繁的接种次数; 对于有毒性的表达蛋白, 由

于毒性蛋白大多会改变靶细胞的正常功能,甚至杀死靶细胞而使抗原蛋白无法继续表达,导致因为不能维持正常的免疫刺激而呈现负面效应,因此,要注意不能使这些毒性蛋白有过高的表达^[20]。在这类毒性蛋白中,最好不要设计和应用高表达载体,如插入能引起下游高表达启动子的载体^[4,43]。总之,应该根据实际情况确定最佳的免疫程序。确定最优条件,最大限度地提高效率,同时减少疫苗对组织的损伤,改进质粒在骨骼肌中的分布能增加DNA的表达水平。另外,在接种部位预先注释局部麻醉剂,可不同程度增强机体免疫应答。Pachuk等^[44]在接种肌肉部位注射局部麻醉剂布比卡因(Bupivacaine)后注射核酸疫苗,结果发现通过此种处理方式可明显提高DNA在体内的转染效率、提高表达水平,增强机体的免疫应答能力。

3 展望

除上述提到的有关核酸疫苗安全性及优化策略的一般性问题外,结合本实验室核酸疫苗设计过程的实际,现将认为比较重要或实质关键的方面着重强调一下,希望对核酸疫苗的开发应用有所启示。首先,在免疫原基因的选择方面,应重点选择抗原基因发挥作用的片段,而不应盲目选择整个基因,这样才能做到有的放矢,最大效率地发挥其功能,而且如果是自身抗原基因还可最大限度地降低自身免疫病的发生风险。如果是多个基因多个片段起作用,在实验条件允许的情况下,也可以考虑将它们逐个连接起来,同时用铰链蛋白,如Ala-Ala-Ala或Gly-Ser-Gly将相对应的碱基间隔开来,以便于相对保持各个有效片段的结构,有利于各自功能的有效发挥^[45-47],但在连接多个基因多个有效片段时,特别要注意起始密码子及终止密码子的位置,避免因设计错误而出现阅读框错位。其次,免疫佐剂的选择也非常关键。除前面提到的细胞因子外,目前核酸疫苗最常用的免疫佐剂是脂质体。脂质体具有长效、缓释的特点,对细胞膜具有很好的亲和性,有利于核酸疫苗疗效的发挥;但由于其自身的局限性,如对组织器官特异性差、选择性低及价格昂贵等原因,仍有待于开发新型免疫佐剂,如病毒及新兴的纳米材料等都可以考虑。Zhang等^[46]采用pVax-NOIs核酸疫苗,以痘苗病毒(vaccinia virus)作为载体加强免疫,结果发现痘苗病毒能有效提高核酸疫苗的抗体滴度。我们在实验过程中也发现,以纳米颗粒作为佐剂可以取得与脂质体、弗氏佐剂

相同甚至更好的免疫效果,且能有效克服脂质体、弗氏佐剂的毒副作用^[48]。

核酸疫苗是20世纪90年代发展起来的一项新的生物技术,作为一种新型疫苗,已成为疫苗研究领域的热点之一,具有广泛应用前景。目前美国FDA已批准艾滋病、流感、结核、乙肝等10余种核酸疫苗进行临床试验,其中有的已进入临床II、III期试验阶段,有望在不久的将来安全地应用于人类疫病的防治^[49-50],但有关核酸疫苗在理论上的安全性问题,还需通过长时间的实验加以克服,并不断进行优化,进一步提高其免疫效力,这也是今后核酸疫苗研究的主要方向。

[参 考 文 献]

- [1] Williams JA, Carnes AE, Hodgson CP. Plasmid DNA vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(4): 353-70
- [2] Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev*, 2011, 239(1): 62-84
- [3] Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, et al. Clinical applications of DNA vaccines: current progress. *Clin Infect Dis*, 2011, 53(3): 296-302
- [4] Ingolotti M, Kawalekar O, Shedlock DJ, et al. DNA vaccines for targeting bacterial infections. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9(7): 747-63
- [5] Liu FY, Guo RM, Zheng L, et al. Safety evaluation of a canine hepatitis DNA vaccine. *Vaccine*, 2008, 26(52): 6925-8
- [6] Faurez F, Dory D, Moigne VL, et al. Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine*, 2010, 28(23): 3888-95
- [7] Bråve A, Gudmundsdóttir L, Sandström E, et al. Biodistribution, persistence and lack of integration of a multigene HIV vaccine delivered by needle-free intradermal injection and electroporation. *Vaccine*, 2010, 28(51): 8203-9
- [8] Doukas J, Morrow J, Bellinger D, et al. Nonclinical biodistribution, integration, and toxicology evaluations of an H5N1 pandemic influenza plasmid DNA vaccine formulated with Vaxfectin®. *Vaccine*, 2011, 29(33): 5443-52
- [9] Fioretti D, Iurescia S, Fazio VM, et al. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 174378
- [10] Graham BS, Kines RC, Corbett KS, et al. Mucosal delivery of human papillomavirus pseudovirus-encapsidated plasmids improves the potency of DNA vaccination. *Mucosal Immunol*, 2010, 3(5): 475-86
- [11] Dolter KE, Evans CF, Ellefsen B, et al. Immunogenicity, safety, biodistribution and persistence of ADVAX, a prophylactic DNA vaccine for HIV-1, delivered by *in vivo*

- electroporation. *Vaccine*, 2011, 29(4): 795-803
- [12] Frazer IH. HPV vaccines and the prevention of cervical cancer. *Update on Cancer Therapeutics*, 2008, 3(1): 43-8
- [13] Watanabe N, Nakajima H. Coinhibitory molecules in autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 269756
- [14] Fissolo N, Costa C, Nurtdinov RN, et al. Treatment with MOG-DNA vaccines induces CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells and up-regulates genes with neuroprotective functions in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflamm*, 2012, 9: 139
- [15] Kang Y, Sun Y, Zhang J, et al. Treg cell resistance to apoptosis in DNA vaccination for experimental autoimmune encephalomyelitis treatment. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49994
- [16] Liu CS, Sun Y, Hu YH, et al. Identification and analysis of the immune effects of CpG motifs that protect Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 29(2): 279-85
- [17] Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev*, 2007, 220: 251-69
- [18] Richie TL, Charoenvit Y, Wang R, et al. Clinical trial in healthy malaria-naïve adults to evaluate the safety, tolerability, immunogenicity and efficacy of MuStDO5, a five-gene, sporozoite/hepatic stage *Plasmodium falciparum* DNA vaccine combined with escalating dose human GM-CSF DNA. *Hum Vaccin Immunother*, 2012, 8(11): 1564-84
- [19] Fuller DH, Loudon P, Schmaljohn C. Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods*, 2006, 40(1): 86-97
- [20] 马景霞, 贾红梅, 刘美丽, 等. 核酸疫苗的免疫效果与安全性. *畜牧与兽医*, 2008, 40(6): 100-2
- [21] 侯俊玲, 郑亚东, 骆学农, 等. DNA疫苗安全性的研究进展. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(5): 470-2
- [22] Sardesai NY, Weiner DB. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23(3): 421-9
- [23] Iurescia S, Fioretti D, Fazio VM, et al. Epitope-driven DNA vaccine design employing immunoinformatics against B-cell lymphoma: a biotech's challenge. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(1): 372-83
- [24] Prudhomme PJ. DNA vaccination against tumors. *J Gene Med*, 2005, 7(1): 3-17
- [25] El-Attar LMR, Scott S, Goh S, et al. A pestivirus DNA vaccine based on a non-antibiotic resistance *Escherichia coli* essential gene marker. *Vaccine*, 2012, 30(9): 1702-9
- [26] Warning A, Datta AK. Interdisciplinary engineering approaches to study how pathogenic bacteria interact with fresh produce. *J Food Eng*, 2013, 114(4): 426-48
- [27] Scudellari M. Vaccine contamination prompts safety. *Nat Med*, 2010, 16(5): 493
- [28] Liu MA. Immunologic basis of vaccine vectors. *Immunity*, 2010, 33(4): 504-15
- [29] Montgomery DL, Prather KJ. Design of plasmid DNA constructs for vaccines. *Methods Mol Med*, 2006, 127: 11-22
- [30] Mizukami T, Imai JI, Hamaguchi I, et al. Application of DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety evaluation. *Vaccine*, 2008, 26(18): 2270-83
- [31] Jørgensen Lv, Buchmann K. Cysteine proteases as potential antigens in antiparasitic DNA vaccines. *Vaccine*, 2011, 29(34): 5575-83
- [32] Ge G, Wang S, Han Y, et al. Removing N-terminal sequences in Pre-S1 domain enhanced antibody and B-cell responses by an HBV large surface antigen DNA vaccine. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41573
- [33] Qiu JT, Chang TC, Lin CT, et al. Novel codon-optimized GM-CSF gene as an adjuvant to enhance the immunity of a DNA vaccine against HIV-1 gag. *Vaccine*, 2007, 25(2): 253-63
- [34] Liu L, Wan Y, Wu L, et al. Broader HIV-1 neutralizing antibody responses induced by envelope glycoprotein mutants based on the EIAV attenuated vaccine. *Retrovirology*, 2010, 7: 71
- [35] Hanagata N. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 2181-95
- [36] Sablan BP, Kim DJ, Barzaga NG, et al. Demonstration of safety and enhanced seroprotection against hepatitis B with investigational HBsAg-1018 ISS vaccine compared to a licensed hepatitis B vaccine. *Vaccine*, 2012, 30(16): 2689-96
- [37] Sun J, Hou J, Li D, et al. Enhancement of HIV-1 DNA vaccine immunogenicity by BCG-PSN, a novel adjuvant. *Vaccine*, 2013, 31(3): 472-9
- [38] Mahdavi M, Ebtekar M, Reza H, et al. ELISPOT analysis of a new CTL based DNA vaccine for HIV-1 using GM-CSF in DNA prime/peptide boost strategy: GM-CSF induced long-lived memory responses. *Immunol Lett*, 2011, 140(1-2): 14-20
- [39] Wang S, Zhang C, Zhang L, et al. The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun methods. *Vaccine*, 2008, 26(17): 2100-10
- [40] Li Y, Wang J, Satterle A, et al. Gene transfer to skeletal muscle by site-specific delivery of electroporation and ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(2): 203-7
- [41] Lin F, Shen X, McCoy JR, et al. A novel prototype device for electroporation-enhanced DNA vaccine delivery simultaneously to both skin and muscle. *Vaccine*, 2011, 29(39): 6771-80
- [42] Hallengård D, Bråve A, Isagulians M, et al. A combination of intradermal jet-injection and electroporation overcomes *in vivo* dose restriction of DNA vaccines. *Genet Vaccines Ther*, 2012, 10(1): 5
- [43] 郭永豪, 郭万申, 蒋红丽. DNA疫苗及其在传染病控制中的应用. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(2): 245-7
- [44] Pachuk CJ, Ciccarelli RB, Samuel M, et al. Characterization of a new class of DNA delivery complexes formed by the local anesthetic bupivacaine. *Biochim*

- Biophys Acta, 2000, 1468(1-2): 20-30
- [45] Zhang Y, Hao CG, Hu LQ, et al. Recombinant DNA vaccine against inhibition of neurite outgrowth promotes functional recovery associated with endogenous NGF expression in spinal cord hemisectioned adult rats. *Neurochem Res*, 2009, 34(9): 1635-41
- [46] Zhang L, Ma Q, Yang W, et al. Recombinant DNA vaccine against neurite outgrowth inhibitors attenuates behavioral deficits and decreases A β in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuropharmacology*, 2012, 70: 200-10
- [47] Xu G, Nie DY, Chen JT, et al. Recombinant DNA vaccine encoding multiple domains related to inhibition of neurite outgrowth: a potential strategy for axonal regeneration. *J Neurochem*, 2004, 91(4): 1018-23
- [48] Wang YT, Lu XM, Zhu F, et al. The use of a gold nanoparticle-based adjuvant to improve the therapeutic efficacy of hNgR-Fc protein immunization in spinal cord-injured rats. *Biomaterials*, 2011, 32(31): 7988-98
- [49] 吴庭才, 张春杰. 核酸疫苗的特点、组成及在动物免疫中的应用. *生物学通报*, 2009, 44(5): 5-7
- [50] Klinman DM, Klaschikb S, Tross D, et al. FDA guidance on prophylactic DNA vaccines: analysis and recommendations. *Vaccine*, 2010, 28(16): 2801-5