



Cloning and Expression of the Recombinant HPV16/18 L1-L2-E7 Polypeptide in Bacterial

Expression System

Matin Kayyal¹, Azam Bolhassani^{2*}, Zahra Noormohammadi¹, Majid Sadeghizadeh³

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

3. Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Human papillomaviruses (HPVs) especially types 16 and 18 are known as the major causes of cervical cancer. Among HPV proteins, L1 and L2 capsid proteins, and also E7 oncoprotein are proposed as target antigens for vaccine design. In the recent years, the recombinant multiepitope polypeptides have attracted a special interest. The goal of this study is the design of L1-L2-E7 fusion construct and evaluation of its expression in bacterial expression system.

Materials and Methods: In this study, the immunogenic and conserved epitopes of HPV16/18 L1, L2 and E7 proteins were selected using different bioinformatics analyses. After synthesis of the designed L1-L2-E7 fusion sequence in pUC57 cloning vector, its subcloning was performed in pET24a (+) prokaryotic expression vector using *EcoRI*/*HindIII* restriction enzymes. The expression of the recombinant multiepitope polypeptide was done in *E.coli* Rosetta strain using IPTG inducer, and confirmed by SDS-PAGE and western blotting using anti-His-tag antibody. The expression was optimized under different conditions such as optical density (OD in wavelength of 600 nm), temperature and time after induction, and IPTG concentration.

Results: The recombinant pET-L1-L2-E7 vector was confirmed by the presence of a clear band (~525 bp) related to the L1-L2-E7 gene on agarose gel after enzyme digestion. The expression of L1-L2-E7 polypeptide in bacteria showed the presence of a clear band (~20 kDa) in SDS-PAGE and western blotting. The best conditions for expression of the recombinant polypeptide were at temperature of 37°C, optical density of 0.7-0.8, IPTG concentration of 1mM, and time of 16 h after induction.

Conclusion: The successful expression of the L1-L2-E7 multiepitope polypeptide was performed in bacterial system. In the next step, the recombinant polypeptide will be purified to use as a vaccine candidate.

Keywords: Human papillomavirus 16/18, Capsid proteins, oncogene protein E7, Bacterial expression system, Iau Science.

Corresponding author:

Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Email: A_bolhasani@pasteur.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

کلونینگ و بیان پلی پپتید نو ترکیب

HPV16 / 18 L1-L2-E7 در سیستم بیانی باکتری

متین کیال^۱، اعظم بوالحسنی^{۲*}، زهرا نورمحمدی^۱، مجید صادقی زاده^۳

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. بخش هیپاتیت و ایدز، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۳. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: ویروس های پاپیلومای انسانی (HPV) به ویژه انواع ۱۶ و ۱۸ مهم ترین عامل سرطان دهانه رحم محسوب می شوند که شایع ترین آن ها، دو نوع ۱۶ و ۱۸ هستند. از بین انواع پروتئین های مرتبط با HPV، پروتئین های کپسیدی L1 و L2 و نیز انکو پروتئین E7 به عنوان آنتی ژن های هدف برای طراحی واکسن مطرح هستند. در سال های اخیر، واکسن های نو ترکیب پلی پپتیدی چند اپی توپی مورد توجه قرار گرفته اند. هدف از این مطالعه طراحی سازه فیوژنی L1-L2-E7 و ارزیابی بیان آن در سیستم بیانی باکتری است.

مواد و روش ها: در این مطالعه، با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی مختلف، اپی توپ های ایمونوژنیک و حفاظت شده از پروتئین های L1، L2 و E7 ویروس های پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ و ۱۸ انتخاب شدند. پس از سنتز توالی فیوژن طراحی شده L1-L2-E7 در وکتور کلونینگ pUC57، ساب کلون کردن آن در وکتور بیان پروکاریوتی pET24a(+) توسط آنزیم های محدودالایر *EcoRI* / *HindIII* انجام شد. بیان پلی پپتید چند اپی توپی نو ترکیب در سویه باکتری *E. coli* Rosetta توسط القاگر IPTG انجام و تأیید آن توسط آنالیزهای SDS-PAGE و وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی ضد دنباله هیستیدینی صورت گرفت. بهینه سازی بیان تحت شرایط مختلف جذب (در طول موج ۶۰۰ نانومتر)، دما و زمان پس از القا و غلظت IPTG انجام شد.

یافته ها: ساب کلون کردن سازه ژنی L1-L2-E7 در وکتور pET توسط حضور باند حدود ۵۲۵ جفت باز روی ژل آگارز بعد از هضم آنزیمی تأیید شد. نتیجه بیان پلی پپتید L1-L2-E7 در باکتری، حضور باند حدود ۲۰ کیلودالتون را روی ژل SDS-PAGE و وسترن بلات آشکار کرد. بهترین شرایط برای بیان پلی پپتید نو ترکیب در دمای ۳۷ درجه، جذب حدود ۰/۷ تا ۰/۸، غلظت IPTG یک میلی مولار و زمان ۱۶ ساعت پس از القا بود.

نتیجه گیری: بیان موفق سازه پلی پپتید چند اپی توپی L1-L2-E7 در سیستم باکتری انجام شد. تخلیص پلی پپتید نو ترکیب به عنوان کاندید واکسن در مراحل بعدی صورت خواهد گرفت.

واژگان کلیدی: ویروس پاپیلومای انسانی ۱۶ و ۱۸، پروتئین های کپسید، پروتئین انکوژن E7، سیستم بیانی باکتری، Iau Science

ویروس پاپیلومای انسانی گروه کوچکی از ویروس های بدون پوشش متعلق به خانواده پاپیلوما ویریده (Papillomaviridae) و بسیار شبیه به ویروس پلیوما (polyoma) هستند. ژنوم آن، DNA دو رشته ای حلقوی شامل یک ناحیه کنترلی غیر

مقدمه

نویسنده مسئول:

بخش هیپاتیت و ایدز، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پست الکترونیکی: A_bolhasani@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵

استراتژی اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک و حفاظت شده با هم در ساختار DNA ایی یا محصول بیان شده آن یعنی واکسن پلی-پپتید چند اپی‌تویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از مزایای عمده این استراتژی تمرکز سیستم ایمنی روی اپی‌توپ‌های حفاظت شده مهم است که تمام جمعیت‌های انسانی و تیپ‌های مختلف ویروس را پوشش می‌دهد و برای القای ایمنی همورال یا سلولی یا هر دو آن‌ها استفاده می‌شوند. واکسن‌های پپتیدی چند اپی‌تویی نو ترکیب پاسخ‌های آلرژنی را حذف می‌کنند و ایمن هستند (۱۵،۱۸).

هدف از این مطالعه، طراحی یک ساختار DNA ایی چند اپی-تویی و ارزیابی بیان آن به صورت پلی‌پپتید چند اپی‌تویی نو ترکیب در سیستم بیانی باکتری است.

مواد و روش‌ها

طراحی و ساخت سازه ژنی چند اپی‌تویی مشتق از پروتئین‌های L1/L2/E7 ویروس‌های پاپیلوما‌ی انسانی نوع ۱۶ و ۱۸

در مطالعه سابق گروه ما، از آنالیزهای بیوانفورماتیکی برای پیشگویی اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک پروتئین‌های L1، L2 و E7 از ویروس‌های نوع ۱۶ و ۱۸ استفاده شد (۱۹،۲۰). به طور خلاصه، اطلاعات توالی ژن‌های L1، L2 و E7 سویه‌های پر خطر نوع ۱۶ و ۱۸ از پایگاه داده‌های PaVE، NCBI و UniProt (https://pave.niaid.nih.gov) جمع‌آوری شد. هم‌چنین اطلاعات فراوانی آلل‌های MHC-I و MHC-II در جمعیت ایران و دنیا از پایگاه داده <http://www.allele frequencies.net> به دست آمد. پیش‌بینی اتصال اپی‌توپ‌های L1، L2 و E7 به مولکول‌های MHC-I و MHC-II با استفاده از نرم‌افزار آنلاین IEDB و NetMHCpan4 و NetMHCIIpan آنالیز شدند و برای هر پروتئین، پپتیدهایی با بالاترین میزان اتصال انتخاب شدند. سپس خاصیت ایمنی‌زایی و آلرژنی بودن اپی‌توپ‌های کاندید با استفاده از پایگاه داده‌های IEDB محاسبه گردید. در مرحله بعد، پوشش جمعیتی به تفکیک برای هر اپی‌توپ در جهان برآورد شد. پس از آن، از سرور GalaxyPepDock برای پیش‌بینی امتیاز اتصال بین آلل‌های MHC و پپتیدها استفاده شد. در این مطالعه، اتصال اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک و حفاظت شده با بالاترین امتیاز با ترتیب L1-L2-E7 به صورت نمایش داده شده در شکل ۱ انجام شد. سپس ترجمه توالی موردنظر پپتیدی به DNA توسط ابزار ترجمه معکوس امینواسیدی

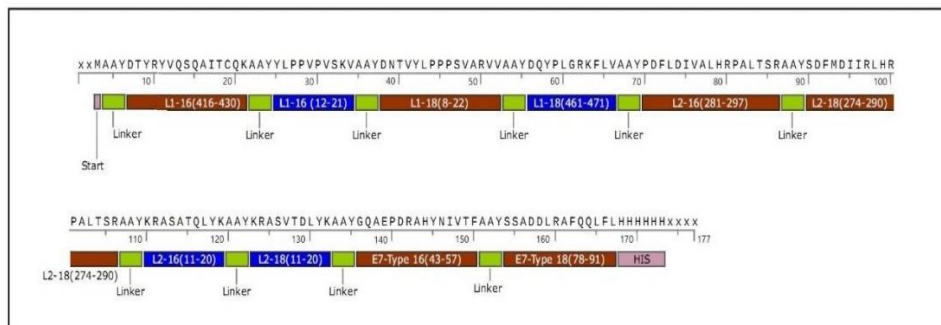
رمزکننده (NCCR) و نواحی رمزکننده اولیه (Early) و ثانویه (Late) است. پروتئین‌های تنظیم‌کننده E1-E2، E4-E5-E7-E6 در بیان ژن‌ها، تکثیر و پاتوژنز نقش دارند و توسط نواحی اولیه کد می‌شوند. در حالی که دو پروتئین ساختاری L1 و L2 که به وسیله نواحی ثانویه رمزگذاری می‌شوند مسئول ساخت کپسید ویروس هستند (۲،۱). پاپیلوما ویروس عامل ایجاد کننده انواع تومورهای خوش‌خیم و بدخیم در پوست (HPV پوستی) و بافت‌های مخاطی (HPV مخاطی) انسان است که به دو نوع پرخطر (HR) و کم‌خطر (LR) تقسیم می‌شود (۳). انواع پرخطر HPV ۱۶، ۱۸، ۲۶، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۳، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶، ۶۸، ۷۳، ۸۲ مرتبط با سرطان‌های سرویکس، واژن، مقعد و آلت تناسلی و سر و گردن و انواع کم‌خطر HPV ۶، ۱۱، ۴۰، ۴۳، ۴۴، ۴۶، ۵۴، ۶۱، ۷۲، ۸۱ عامل ایجاد زگیل‌های خوش‌خیم تناسلی هستند (۴). سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع در زنان است به طوری که ۶۸۳،۰۰۰ مورد جدید و ۳۲۹،۰۰۰ مرگ و میر در سال ۲۰۱۸ گزارش شده است. HPV عامل ۹۹٪ از سرطان‌های دهانه رحم است که از میان انواع آن، نوع ۱۶ و ۱۸ مسئول ۷۰٪ از سرطان‌های سرویکس در کل جهان هستند (۵،۶). بنابراین، تولید واکسن HPV پیشگیرانه یا درمانی در این موارد بسیار مفید خواهد بود (۷). در حال حاضر، سه واکسن پیشگیرانه HPV تجاری موجود است، اما هیچ‌یک از آن‌ها اثر درمانی بر عفونت HPV موجود و سرطان‌های مربوطه نشان نمی‌دهد (۸). بنابراین، به دلیل شیوع بالای عفونت‌های HPV، تولید واکسن درمانی مؤثر ضروری است (۹،۱۰). تاکنون، چندین واکسن درمانی مبتنی بر آنکو پروتئین‌های ویروسی به-عنوان اهداف ایده‌آل تولید شده است از جمله واکسن‌های مبتنی بر ناقل زنده، واکسن‌های مبتنی بر ناقلین باکتریایی یا ویروسی، واکسن‌های مبتنی بر ناقلین DNA و RNA، واکسن-های مبتنی بر پپتید و پروتئین. با این حال، هر استراتژی مزایا و معایبی را نشان داد (۱۱). بنابراین، مهم است که روش‌های مؤثر و ایمن در طراحی واکسن درمانی (به‌عنوان مثال، افزایش ایمنی‌زایی آن‌ها) در نظر گرفته شوند (۱۴-۱۲). یک واکسن پپتیدی ارزشمند باید از اپی‌توپ غالب ایمنی سلول‌های B و T تشکیل شده باشد که پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی اختصاصی را القا کند (۱۵). با این حال، معایبی نظیر ایمنی‌زایی پایین و محدودیت HLA برای واکسن‌های پروتئینی و پپتیدی مطرح است (۱۶،۱۷). استفاده از تکنولوژی DNA چند اپی‌تویی نو ترکیب یکی از روش‌های کاهش این معایب است. در این

(http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html)
 (صورت گرفت (شکل ۲).

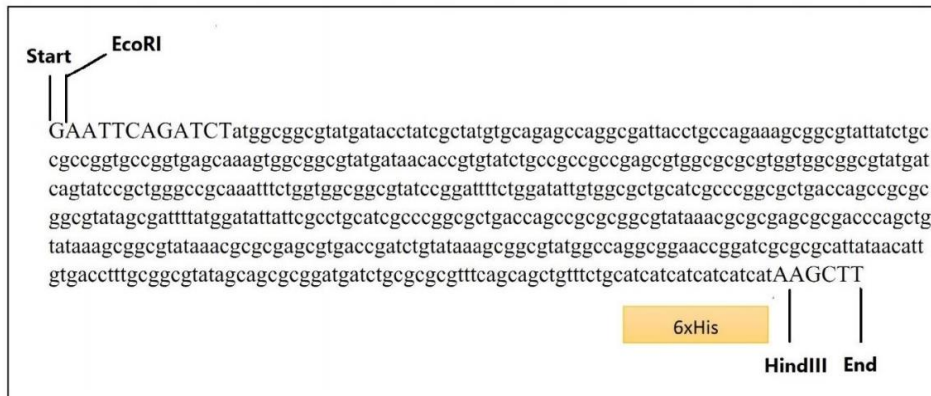
ساب کلون کردن فیوژن L1-L2-E7 در وکتور بیانی باکتری

پس از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی، فیوژن L1-L2-E7 در وکتور کلونینگ pUC57 توسط شرکت Bio Magic Gene سنتز شد. ساختار ژنی L1-L2-E7 در وکتور بیان پروکاریوتی (+) pET-24a ساب کلون شد. بدین منظور، هضم آنزیمی فیوژن L1-L2-E7 با آنزیمهای محدودالاندر

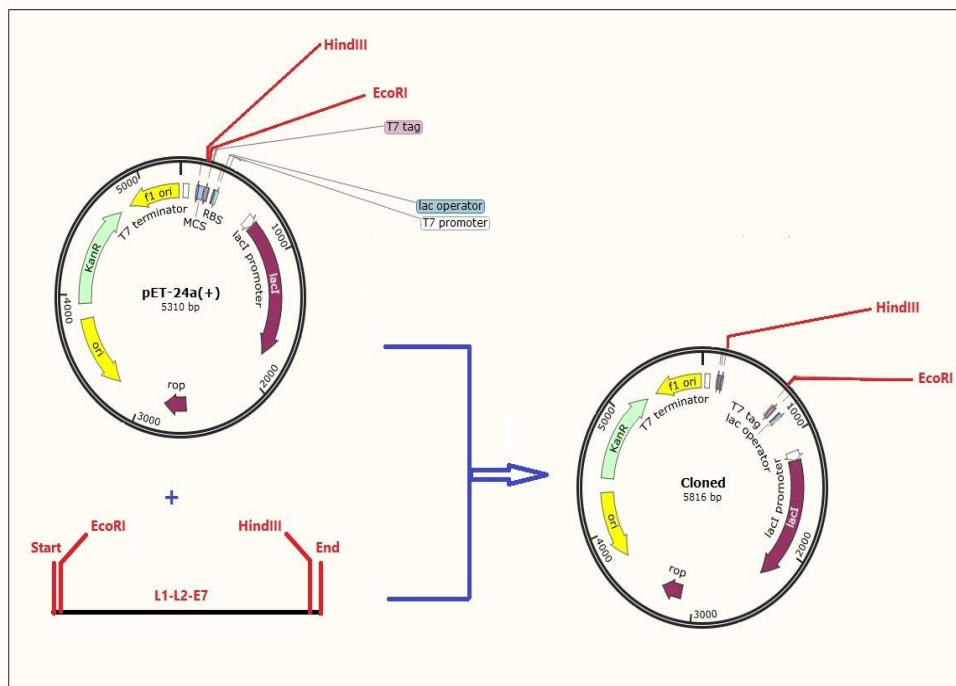
EcoRI/HindIII (فرمنتاز) از وکتور pUC57 انجام شد و به وکتور خطی شده (+) pET-24a توسط آنزیم T4 DNA ligase (سیگما) الحاق شد. سپس ترانسفورماسیون سویه باکتری *E. coli* (DH5 α) با محصول الحاق انجام شد. بعد از آن، پلاسمید نو ترکیب pET24a-L1-L2-E7 از کشت تک کلونی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (FavorGen, FavorPrep (Taiwan) تخلیص شد. تأیید پلاسمید نو ترکیب توسط هضم آنزیمی و الکتروفورز آن روی ژل آگارز یک درصد صورت گرفت.



شکل ۱- طراحی ساختار پپتیدی L1-L2-E7 مشتق از پروتئینهای ویروسهای پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ و ۱۸ با آنالیزهای بیوانفورماتیکی



شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی ساختار طراحی شده L1-L2-E7 به همراه آنزیمهای محدودالاندر



شکل ۳- طرح کلی ساب کلون کردن فیوژن L1-L2-E7 در وکتور pET24a(+) توسط آنزیم‌های محدودالتر EcoRI/HindIII

پراکسیداز (Abcam) و سوبسترای دی‌آمینو بنزیدین (DAB/ H_2O_2 ; Sigma) تأیید شد.

یافته‌ها

طراحی و ساخت سازه DNA بی حامل فیوژن L1-L2-E7
با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، پپتیدهای غیرحساسیت-زا، حفاظت شده و ایمنی‌زای مشتق از پروتئین‌های L1، L2 و E7 از دو فرم پرخطر HPV16/18 انتخاب شدند و سازه پپتیدی فیوژن طراحی شد به طوری که پپتیدها توسط لینکر AAY (آلانین - آلانین - تیروزین) به هم متصل شدند. پپتیدها شامل نواحی آمینواسیدی L1(12-21), L2(11-20), E7(43-57) از HPV16 و L1(461-471), L2(11-20), E7(78-91) از HPV18 برای MHC-I و شامل نواحی آمینواسیدی- L1(416-430), L2(274-297) از HPV16 و L1(8-22), L2(281-297) از HPV18 برای MHC-II بودند (۱۹,۲۰) (شکل ۱). ترجمه ساختار پپتیدی به ساختار ژنی انجام شد و نواحی آنزیم-های محدودالتر به منظور ساب کلون کردن در وکتور بیان باکتری در نظر گرفته شدند (شکل ۲).

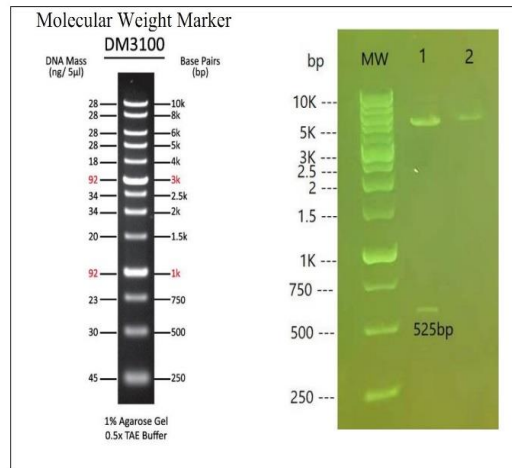
تأیید ساب کلون کردن فیوژن L1-L2-E7 در وکتور بیانی pET24a (+)

بیان پلی‌پپتید چند اپی‌توپی نو ترکیب L1-L2-E7 و بهینه‌سازی آن

به منظور بیان پلی‌پپتید چند اپی‌توپی نو ترکیب L1-L2-E7، سویه *E. coli* (Rosetta) با پلاسمید نو ترکیب pET24a-L1-L2-E7 توسط روش شوک حرارتی ترانسفورم شد. سپس تک کلونی در محیط کشت مایع باکتری (LB, Quelab, Canada) برای ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه کشت داده شد. بعد از آن، باکتری رشد یافته به محیط Ty2x در غلظت ۱ درصد (v/v) اضافه شد و توسط ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوزید (-isopropyl-β-D-1-) thiogalactopyranoside یا IPTG، شرکت سیناکلون) القا شد زمانی که جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر به میزان مشخصی رسید. در این راستا، از دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار IPTG استفاده شد. به علاوه میزان جذب در رنج‌های ۰/۸-۰/۷، ۰/۶-۰/۷ و ۰/۵-۰/۶ در نظر گرفته شد. بیان پلی‌پپتید نو ترکیب در زمان‌های مختلف آنکوباسیون یعنی ۲، ۳، ۴ و ۱۶ ساعته بعد از القا در دو دمای ۳۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. رسوبات سلولی برداشت شدند و توسط الکتروفورز روی ژل ۱۲/۵ درصد (sodium dodecyl sulfate- SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) آنالیز شدند. به علاوه، بیان پلی‌پپتید چند اپی‌توپی نو ترکیب توسط آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد دنباله هیستیدینی کونژوگه به

آنزیمی با آنزیم‌های *EcoRI/HindIII* و الکتروفورز روی ژل آگارز به صورت باند حدود ۵۲۵ جفت بازی مشاهده شد (شکل ۴).

ساب کلون ساختار ژنی L1-L2-E7 در وکتور بیانی pET24a (+) به طور موفقیت‌آمیزی انجام شد (شکل ۳). حضور فیوژن L1-L2-E7 در وکتور (+) pET-24a توسط هضم

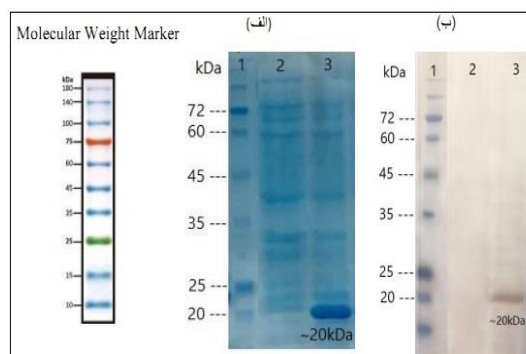


شکل ۴- تأیید پلاسمید pET24a-L1-L2-E7 توسط هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودالایر *EcoRI/HindIII*: ستون ۱) هضم آنزیمی پلاسمید pET24a-L1-L2-E7؛ حضور باند حدود ۵۲۵ جفت بازی مربوط به فیوژن L1-L2-E7 روی ژل مشاهده شد؛ ستون ۲) پلاسمید تخلیص شده pET24a-L1-L2-E7؛ MW مارکر اندازه مولکولی است (فرمنتاز).

یک میلی‌مولار و زمان ۱۶ ساعت پس از القا نشان داد. آنالیز SDS-PAGE حضور باند حدود ۲۰ کیلودالتونی مربوط به بیان پلی‌پپتید را تأیید کرد (شکل ۵-الف). به علاوه، هویت پلی‌پپتید نوترکیب توسط آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد دنباله هیستیدینی تأیید شد (شکل ۵-ب).

بیان پلی‌پپتید نوترکیب L1-L2-E7 در سیستم بیانی باکتری

بیان پلی‌پپتید نوترکیب در سویه باکتری Rosetta به طور موفقیت‌آمیزی انجام شد. پلی‌پپتید نوترکیب بهترین بیان را در جذب ۰/۷ تا ۰/۸، دمای ۳۷ درجه پس از القا، غلظت IPTG



شکل ۵- آنالیز بیان پلی‌پپتید نوترکیب توسط الکتروفورز SDS-PAGE (الف) و وسترن بلات (ب) تحت شرایط بهینه شده: ستون ۱) مارکر وزن مولکولی پروتئین (۱۰-۱۸۰ کیلودالتون، فرمنتاز)، ستون ۲) قبل از القای پلی‌پپتید، ستون ۳) بعد از القای پلی‌پپتید توسط القاگر IPTG

عفونت‌ها مسئول ۲۰-۲۵٪ تمام سرطان‌ها در جهان هستند (۲۱). به طوری که تخمین زده شده است که نزدیک به ۱۵٪ از

بحث

طراحی کردند. نتایج ایمنی‌زایی آن‌ها القا پاسخ ایمنی Th1 را نشان داد (۲۰).

گروه ما در گذشته اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک و حفاظت شده پروتئین‌های L1 و L2 را در میان انواع HPV پرخطر با درصد پوشش جمعیتی ۹۵/۵۵ درصد و ۹۶/۳۳ درصد به ترتیب در جهان شناسایی کردند (۱۹). به‌علاوه اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک انکوپروتئین‌های E5، E6 و E7 از ویروس‌های پرخطر با استفاده از یک روش ایمونوفورماتیک دو مرحله‌ای توسط گروه ما شناسایی شد (۲۰). در این مطالعه، ما اپی‌توپ‌های ایمونوژنیک و حفاظت شده با امتیاز بالا از دو مطالعه سابق را استفاده کرده و برخلاف مطالعه Namvar و همکاران (۱۹،۲۰) در این پژوهش ما برای اولین بار یک ساختار فیوژن پپتیدی چند اپی‌توپ L1-E7 طراحی کردیم که می‌تواند در آینده به‌عنوان واکسن‌های پیشگیری کننده و درمانی مطرح گردد. به این منظور، توالی نوکلئوتیدی فیوژن L1-L2-E7 سنتز شد و در وکتور بیانی باکتری ساب کلون شد. پلاسمید نوترکیب حامل فیوژن L1-E7 با اندازه حدود ۵۲۵ نوکلئوتیدی تهیه و تأیید شد و به‌منظور بیان در سویه باکتری Rosetta توسط القاگر IPTG مورد استفاده قرار گرفت. بیان پلی‌پپتید نوترکیب در دمای ۳۷ درجه و ۱۶ ساعت پس از القا توسط آنالیز SDS-PAGE تأیید شد. حضور باند حدود ۲۰ کیلودالتون مربوط به پلی‌پپتید نوترکیب چند اپی‌توپ L1-L2-E7 توسط آنتی‌بادی ضد His-tag و سوبسترای DAB روی کاغذ وسترن بلات آشکار شد. طراحی و تولید این ساختار پلی‌پپتیدی برای اولین بار صورت گرفته است که مراحل تخلیص و بررسی توانایی آن به‌عنوان یک کاندید واکسن در آینده انجام خواهد شد.

نتیجه‌گیری

ساخت موفقیت‌آمیز پلاسمید فیوژن نوترکیب pET-L1-L2-E7 توسط مشاهده باند حدود ۵۲۵ جفت بازی مربوط به L1-L2-E7 در الکتروفورز روی ژل آگارز تأیید شد. همچنین بیان پلی‌پپتید نوترکیب L1-L2-E7 با اندازه حدود ۲۰ کیلودالتون به‌طور موفقیت‌آمیزی توسط آنالیزهای SDS-PAGE و وسترن بلات در دما و زمان مشخص تأیید شد. در مرحله بعد، پلی‌پپتید بیان شده پس از تخلیص به‌عنوان کاندید واکسن در مقابل HPV مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

سرطان‌های انسانی با عفونت‌های ویروسی در ارتباط هستند (۲۲،۲۳). در این زمینه ویروس‌های مختلفی در چندین مرحله از فرآیندهای سرطان‌زایی شرکت دارند. از میان انواع ویروس‌ها، ویروس پاپیلوما انسانی عامل ۳۰٪ از سرطان‌های وابسته به عوامل عفونی است که این ویروس عفونی قابلیت انتقال از طریق تماس جنسی را دارد (۲۴،۲۵). ویروس پاپیلوما انسانی به‌عنوان ویروس پاتوژن مهم عامل اصلی سرطان دهانه رحم است (۲۶). به‌تازگی، واکسن‌های درمانی یک استراتژی مؤثری هستند تا سیستم ایمنی را در برابر سرطان‌های مرتبط با نوع پرخطر HPV تحریک کنند. واکسن‌های ویروسی (۱۲)، واکسن‌های پروتئینی (۲۷)، واکسن‌های پپتیدی (۲۸) و واکسن‌های DNA ای (۲۹) انواعی از واکسن‌های درمانی هستند که با توجه به این که واکسن‌های درمانی موجب کاهش تعداد افراد عفونی و میزان انتقال عفونت می‌شوند، در نتیجه نقش پیشگیرانه نیز خواهند داشت. در میان این نوع واکسن‌ها، واکسن‌های براساس پپتید به‌عنوان انتخاب مورد توجهی جهت درمان بدخیمی‌های مرتبط با HPV مطرح شده‌اند (۳۰). اتصال پپتیدها به لیپیدها و استفاده از چند اپی‌توپ مختلف ایمونوژن، استفاده از اپی‌توپ‌های آگونیست و استفاده از ادجوانت‌های مختلف از جمله راهکارهایی هستند که برای افزایش ایمنی‌زایی واکسن‌های پپتیدی پیشنهاد شده است (۳۱،۳۲).

مطالعه‌های متعددی روی ایمونوژنیسیته اپی‌توپ‌های L1، L2 و E7 در واکسن‌های براساس پپتید انجام شده است برای مثال، Felkamp و همکاران توالی ⁵⁷RAHYNIVTF⁴⁹ را به‌عنوان یک اپی‌توپ مهم HPV16 E7 متصل به MHC I تعیین کردند که پاسخ‌های مرتبط با لمفوسیت‌های T سیتوتوکسیک را القا می‌کند (۳۳،۳۴). به‌علاوه، حدود ده سال بعد، Kawana و همکاران پپتید ¹⁰⁸VEETSFDAGAP¹⁰⁸ را به‌عنوان یک اپی‌توپ به‌میزان بالا ایمونوژنیک HPV16 L2 معرفی کردند (۳۵). Namvar و همکاران با آنالیزهای *In vivo* و *In silico* نشان دادند که ترکیب ساختارهای DNA ای از اپی‌توپ‌های غالب ایمنی مشتق از پروتئین‌های L1 و L2 انواع پرخطر HPV پاسخ‌های ایمنی را به‌طور مؤثری القا می‌کند و از موش‌ها در برابر سلول‌های توموری C3 محافظت می‌نماید. بنابراین، طراحی ساختارهای DNA براساس پروتئین‌های L1 و L2 می‌تواند برای توسعه واکسن HPV امیدوار کننده باشد (۱۹). Namvar و همکاران با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی دو سازه مجزا حامل اپی‌توپ‌های E5 و E7 از چهار نوع پرخطر HPV را

1. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews cancer*. 2002;2(5):342-50.
2. Dalianis T. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy. *International journal of oncology*. 2014;44(6):1799-805.
3. Tommasino M, editor *The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis*. Seminars in cancer biology; 2014: Elsevier.
4. Pimenta JM, Galindo C, Jenkins D, Taylor SM. Estimate of the global burden of cervical adenocarcinoma and potential impact of prophylactic human papillomavirus vaccination. *BMC cancer*. 2013;13(1):553.
5. Wang R, Pan W, Jin L, Huang W, Li Y, Wu D, et al. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge. *Cancer Letters*. 2020;471:88-102.
6. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015;136(5):E359-E86.
7. Wakabayashi MT, Da Silva DM, Potkul RK, Kast WM. Comparison of human papillomavirus type 16 L1 chimeric virus-like particles versus L1/L2 chimeric virus-like particles in tumor prevention. *Intervirolgy*. 2002;45(4-6):300-7.
8. Joura EA, Giuliano AR, Iversen O-E, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, et al. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(8):711-23.
9. Hoppe-Seyler K, Bossler F, Braun JA, Herrmann AL, Hoppe-Seyler F. The HPV E6/E7 oncogenes: key factors for viral carcinogenesis and therapeutic targets. *Trends in microbiology*. 2018;26(2):158-68.
10. Graham SV. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future microbiology*. 2010;5(10):1493-506.
11. Yang A, Farmer E, Wu TC, Hung C-F. Perspectives for therapeutic HPV vaccine development. *Journal of biomedical science*. 2016;23(1):75.
12. Gomez-Gutierrez JG, Elpek KG, de Oca-Luna RM, Shirwan H, Zhou HS, McMasters KM. Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2007;56(7):997-1007.
13. Cassetti MC, McElhiney SP, Shahabi V, Pullen JK, Le Poole IC, Eiben GL, et al. Antitumor efficacy of Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles encoding mutated HPV16 E6 and E7 genes. *Vaccine*. 2004;22(3-4):520-7.
14. Reinis M, Stepanek I, Simova J, Bieblova J, Pribylova H, Indrova M, et al. Induction of protective immunity against MHC class I-deficient, HPV16-associated tumours with peptide and dendritic cell-based vaccines. *International journal of oncology*. 2010;36(3):545-51.
15. Li W, Joshi MD, Singhania S, Ramsey KH, Murthy AK. Peptide vaccine: progress and challenges. *Vaccines*. 2014;2(3):515-36.
16. Purcell AW, McCluskey J, Rossjohn J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nature reviews Drug discovery*. 2007;6(5):404-14.

17. Melief CJ, Van Der Burg SH. Immunotherapy of established (pre) malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nature Reviews Cancer*. 2008;8(5):351-60.
18. Rosa DS, Ribeiro SP, Fonseca SG, Almeida RR, Santana VC, Apostolico JdS, et al. Multiple approaches for increasing the immunogenicity of an epitope-based anti-HIV vaccine. *AIDS research and human retroviruses*. 2015;31(11):1077-88.
19. Namvar A, Bolhassani A, Javadi G, Noormohammadi Z. In silico/In vivo analysis of high-risk papillomavirus L1 and L2 conserved sequences for development of cross-subtype prophylactic vaccine. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-22.
20. Namvar A, Panahi HA, Agi E, Bolhassani A. Development of HPV 16, 18, 31, 45 E5 and E7 peptides-based vaccines predicted by immunoinformatics tools. *Biotechnology Letters*. 2020;42(3):403-18.
21. Damania B. A virological perspective on cancer. *PLoS pathogens*. 2016;12(2):e1005326.
22. Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell host & microbe*. 2014;15(3):266-82.
23. Zapatka M, Borozan I, Brewer DS, Iskar M, Grundhoff A, Alawi M, et al. The landscape of viral associations in human cancers. *Nature genetics*. 2020;52(3):320-30.
24. Bravo IG, de Sanjosé S, Gottschling M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. *Trends in microbiology*. 2010;18(10):432-8.
25. Bruni L, BarrionuevoRosas L, Albero G. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 2015 04 08. HPV information center; 2014.
26. Koliopoulos G, Nyaga VN, Santesso N, Bryant A, Martin-Hirsch PP, Mustafa RA, et al. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane database of systematic reviews*. 2017(8).
27. Li J, Chen S, Ge J, Lu F, Ren S, Zhao Z, et al. A novel therapeutic vaccine composed of a rearranged human papillomavirus type 16 E6/E7 fusion protein and Fms-like tyrosine kinase-3 ligand induces CD8+ T cell responses and antitumor effect. *Vaccine*. 2017;35(47):6459-67.
28. Manuri PR, Nehete B, Nehete PN, Reisenauer R, Wardell S, Courtney AN, et al. Intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to the E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus type 16 induces systemic and mucosal cellular immune responses and tumor protection. *Vaccine*. 2007;25(17):3302-10.
29. Peng S, Trimble C, Alvarez RD, Huh WK, Lin Z, Monie A, et al. Cluster intradermal DNA vaccination rapidly induces E7-specific CD8+ T-cell immune responses leading to therapeutic antitumor effects. *Gene therapy*. 2008;15(16):1156-66.
30. Vici P, Pizzuti L, Mariani L, Zampa G, Santini D, Di Lauro L, et al. Targeting immune response with therapeutic vaccines in premalignant lesions and cervical cancer: hope or reality from clinical studies. *Expert review of vaccines*. 2016;15(10):1327-36.
31. Liu T-Y, M Hussein W, Toth I, Skwarczynski M. Advances in peptide-based human papillomavirus therapeutic vaccines. *Current topics in medicinal chemistry*. 2012;12(14):1581-92.
32. Zhang TT. LAH4: A novel cell-penetrating peptide for application in tumor immunotherapy: The Johns Hopkins University; 2011.

33. Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, De Jongh BM, Drijfhout JW, et al. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *European journal of immunology*. 1993;23(9):2242-9.

34. Feltkamp MC, Vreugdenhil GR, Vierboom MP, Ras E, van der Burg SH, Schegget JT, et al. Cytotoxic T lymphocytes raised against a subdominant epitope offered as a synthetic peptide eradicate human papillomavirus type 16-induced tumors. *European journal of immunology*. 1995;25(9):2638-42.

35. Kawana K, Yasugi T, Kanda T, Kino N, Oda K, Okada S, et al. Safety and immunogenicity of a peptide containing the cross-neutralization epitope of HPV16 L2 administered nasally in healthy volunteers. *Vaccine*. 2003;21(27-30):4256-60.