



Scan online to view this article

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

### Expression System

Matin Kayyal<sup>1</sup>, Azam Bolhassani<sup>2\*</sup>, Zahra Noormohammadi<sup>1</sup>, Majid Sadeghizadeh<sup>3</sup>

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 oncprotein 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 *Eco*RI/ *Hind*III 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 پلی‌پپتید نوترکیب

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

متین کیال<sup>۱</sup>، اعظم بوالحسنی<sup>۲\*</sup>، زهرا نورمحمدی<sup>۱</sup>، مجید صادقی زاده<sup>۳</sup>

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

۲. بخش هپاتیت و ایدز، ائیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

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

## چکیده

**سابقه و هدف:** ویروس‌های پاپیلومای انسانی (HPV) بهویژه انواع ۱۶ و ۱۸ مهم‌ترین عامل سرطان دهانه رحم محسوب می‌شوند که شایع‌ترین آن‌ها، دو نوع ۱۶ و ۱۸ هستند. از بین انواع پروتئین‌های مرتبط با HPV، پروتئین‌های کپسیدی L1 و L2 و نیز انکوپروتئین E7 به عنوان آنتی‌زن‌های هدف برای طراحی واکسن مطرح هستند. در سال‌های اخیر، واکسن‌های نوترکیب پلی‌پپتیدی چند اپی‌توبی مورد توجه قرار گرفته‌اند. هدف از این مطالعه طراحی سازه فیوژنی L1-L2-E7 و ارزیابی بیان آن در سیستم بیانی باکتری است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی مختلف، اپی‌توب‌های ایمنوژنیک و حفاظت شده از پروتئین‌های L1، L2 و E7 ویروس‌های پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ و ۱۸ انتخاب شدند. پس از سنتز توالی فیوژن طراحی شده L1-L2-E7 در وکتور کلونینگ pUC57، ساپ کلون کردند آن در وکتور بیان پروکاریوتی (+) pET24a(+) توسط آنزیم‌های محدودالاثر EcoRI/HindIII انجام شد. بیان پلی‌پپتید چند اپی‌توبی نوترکیب در سویه باکتری *E. coli* Rosetta IPTG توسط القاگر SDS-PAGE و سترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد دنباله هیستیدینی صورت گرفت. بهینه‌سازی بیان تحت شرایط مختلف جذب (در طول موج ۶۰۰ نانومتر)، دما و زمان پس از القا و غلظت IPTG انجام شد.

**یافته‌ها:** ساپ کلون کردند 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 پلی‌پپتید L1-L2-E7 در باکتری، حضور باند حدود ۲۰ کیلو Dalton را روی ژل SDS-PAGE و سترن بلات آشکار کرد. بهترین شرایط برای بیان پلی‌پپتید نوترکیب در دمای ۳۷ درجه، جذب حدود ۰/۷ تا ۰/۸ میلی‌مolar و زمان ۱۶ ساعت پس از القا بود.

**نتیجه‌گیری:** بیان موفق سازه پلی‌پپتید چند اپی‌توبی L1-L2-E7 در سیستم باکتری انجام شد. تخلیص پلی‌پپتید نوترکیب به عنوان کاندید واکسن در مراحل بعدی صورت خواهد گرفت.

**واژگان کلیدی:** ویروس پاپیلومای انسانی ۱۶ و ۱۸، پروتئین‌های کپسید، پروتئین‌انکوژن E7، سیستم بیانی باکتری، Iau .Science

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

## مقدمه

نویسنده مسئول:  
بخش هپاتیت و ایدز، ائیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران  
پست الکترونیکی: A\_bolhasani@pasteur.ac.ir  
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۲  
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵

استراتژی اپی‌توب‌های ایمنوزنیک و حفاظت شده با هم در ساختار DNA ایی یا محصول بیان شده آن یعنی واکسن پلی-پیتید چند اپی‌توبی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از مزایای عمدۀ این استراتژی تمرکز سیستم ایمنی روی اپی‌توب‌های 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 پیتیدی چند اپی‌توبی نوترکیب پاسخ‌های آلرژنی را حذف می‌کنند و ایمن هستند.<sup>(۱۵,۱۸)</sup>

هدف از این مطالعه، طراحی یک ساختار DNA ایی چند اپی-توبی و ارزیابی بیان آن بهصورت پلی‌پیتید چند اپی‌توبی نوترکیب در سیستم بیانی باکتری است.

## مواد و روش‌ها

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

در مطالعه سابق گروه ما، از آنالیزهای بیوانفورماتیکی برای پیشگویی اپی‌توب‌های ایمنوزنیک پروتئین‌های L1، L2 و E7 از ویروس‌های نوع ۱۶ و ۱۸ استفاده شد.<sup>(۱۹,۲۰)</sup> بهطور خلاصه، اطلاعات توالی ژن‌های L1، L2 و E7، سویه‌های پر خطر نوع ۱۶ و ۱۸ از پایگاه داده‌های UniProt، NCBI و PaVE و UniProt اطلاعات فراوانی آل‌های MHC-I و MHC-II در جمعیت ایران و دنیا از پایگاه داده <https://pave.niaid.nih.gov> و <http://www.allelefrequencies.net> به دست آمد. پیش‌بینی اتصال اپی‌توب‌های L1، L2 و E7 به MHC-I و MHC-II با استفاده از نرم‌افزار آنلاین MoleculePanorama<sup>(۱)</sup> و NetMHCpan4 و NetMHCIIpan برای هر پروتئین، پیتیدهایی با بالاترین میزان اتصال انتخاب شدند. سپس خاصیت ایمنی‌زایی و آلرژی‌زا بودن اپی‌توب‌های کاندید با استفاده از پایگاه داده‌های IE3DB محاسبه گردید. در مرحله بعد، پوشش جمعیتی به تفکیک برای هر اپی‌توب در جهان برآورد شد. پس از آن، از سورس GalaxyPepDock برای پیش‌بینی امتیاز اتصال بین آل‌های MHC و پیتیدها استفاده شد. در این مطالعه، اتصال اپی‌توب‌های ایمنوزنیک و حفاظت شده با بالاترین امتیاز با ترتیب L1-L2-E7 بهصورت نمایش داده شده در شکل ۱ انجام شد. سپس ترجمه توالی موردنظر پیتیدی به DNA توسط ابزار ترجمه معکوس امینواسیدی

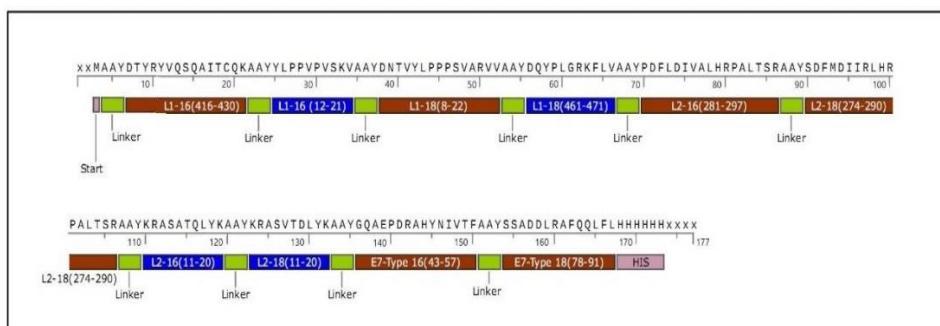
رمزکننده (NCCR) و نواحی رمزکننده اولیه (Early) و ثانویه (Late) است. پروتئین‌های تنظیم‌کننده E1-E2، E4-E5-E7- E6 در بیان ژن‌ها، تکثیر و پاتوزن نقش دارند و توسط نواحی اولیه کد می‌شوند. در حالی که دو پروتئین ساختاری L1 و L2 که به‌وسیله نواحی ثانویه رمزگذاری می‌شوند مسئول ساخت کپسید ویروس هستند.<sup>(۲۱)</sup> 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 پر خطر (HR) و کم خطر (LR) تقسیم می‌شود.<sup>(۳)</sup> انواع پر خطر HPV ۱۸، ۱۶، ۲۶، ۳۱، ۴۵، ۳۹، ۳۵، ۵۲، ۵۱، ۴۴، ۴۲، ۴۳، ۵۴، ۶۱، ۷۲، ۸۱ عامل ایجاد زگیل‌های خوش‌خیم تناسلی هستند.<sup>(۴)</sup> سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع در زنان است بهطوری‌که ۶۸۳،۰۰۰ مورد جدید و ۳۲۹،۰۰۰ مرگ و میر در سال ۲۰۱۸ گزارش شده است. 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.<sup>(۵,۶)</sup> بنابراین، تولید واکسن HPV پیشگیرانه یا درمانی در این موارد بسیار مفید خواهد بود.<sup>(۷)</sup> 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.<sup>(۸)</sup> بنابراین، بهدلیل شیوع بالای عفونت‌های HPV، تولید واکسن درمانی مؤثر ضروری است.<sup>(۹,۱۰)</sup> تاکنون، چندین واکسن درمانی مبتنی بر آنکوپروتئین‌های ویروسی به عنوان اهداف ایده‌آل تولید شده است از جمله واکسن‌های مبتنی بر ناقل زنده، واکسن‌های مبتنی بر ناقلين باکتریایی یا ویروسی، واکسن‌های مبتنی بر ناقلين RNA و DNA و واکسن‌های مبتنی بر پیتید و پروتئین. با این حال، هر استراتژی مزایا و معایبی را نشان داد.<sup>(۱۱)</sup> بنابراین، مهم است که روش‌های مؤثر و ایمن در طراحی واکسن درمانی (به عنوان مثال، افزایش ایمنی‌زایی آن‌ها) در نظر گرفته شوند.<sup>(۱۲-۱۴)</sup> یک واکسن B-پیتیدی ارزشمند باید از اپی‌توب غالب ایمنی سلول‌های T تشکیل شده باشد که پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی اختصاصی را القا کند.<sup>(۱۵)</sup> با این حال، معایبی نظری ایمنی‌زایی پایین و محدودیت HLA برای واکسن‌های پروتئینی و پیتیدی مطرح است.<sup>(۱۶,۱۷)</sup> استفاده از تکنولوژی DNA چند اپی‌توبی نوترکیب یکی از روش‌های کاهش این معایب است. در این

(فرمانتاز) از وکتور pUC57 EcoRI/HindIII وکتور خطی شده (+) pET-24a (T4 DNA) توسط آنزیم ligase (سیگما) الحاق شد. سپس ترانسفورماسیون سوبیه باکتری (DH5α) با محصول الحاق انجام شد. بعد از آن، پلاسمید نوترکیب pET24a-L1-L2-E7 از کشت تک کلونی با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (FavorGen, FavorPrep Taiwan) تخلیص شد. تأیید پلاسمید نوترکیب توسط هضم آنزیمی و الکتروفورز آن روی ژل آگارز یک درصد صورت گرفت.

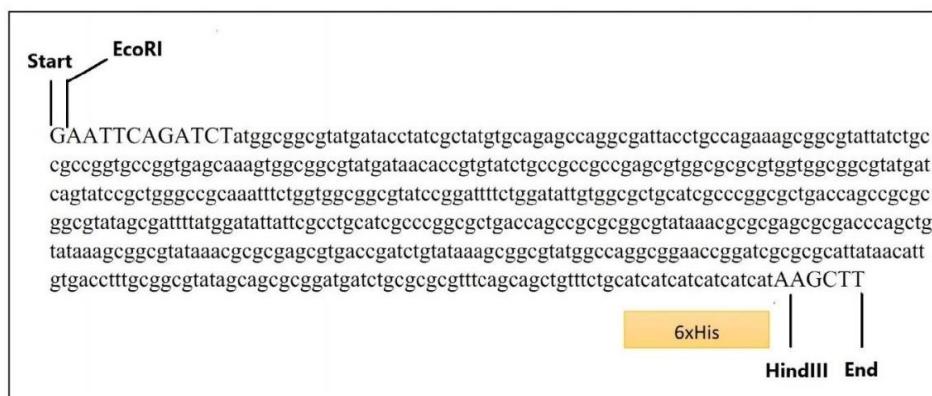
([http://www.bioinformatics.org/sms2/rev\\_trans.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html)) صورت گرفت (شکل ۲).

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

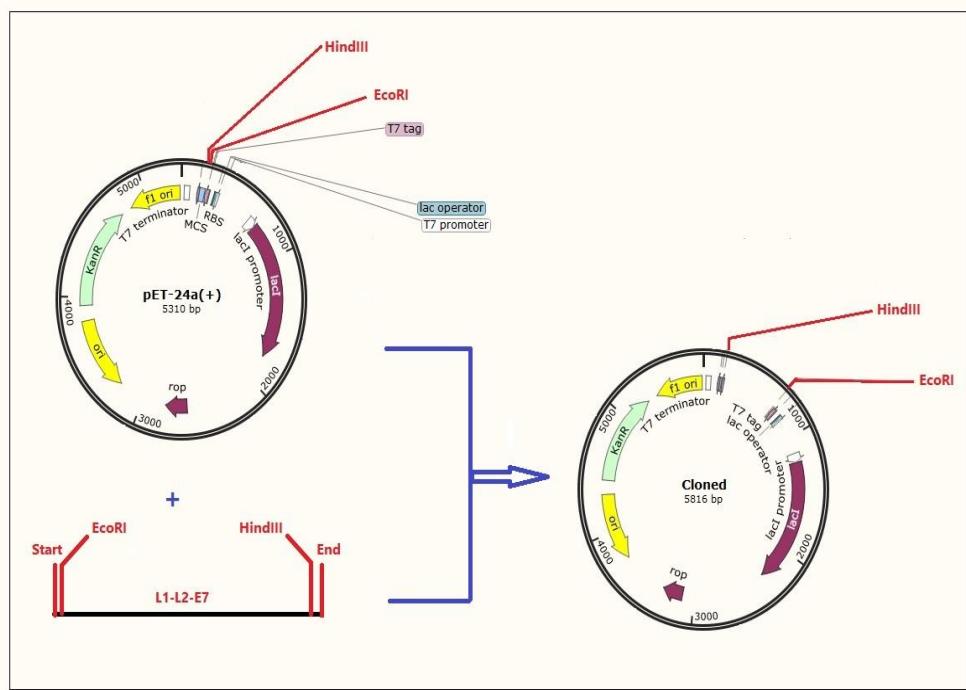
پس از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی، فیوژن L1-L2-E7 در وکتور کلونینگ pUC57 توسط شرکت Bio Magic Gene سنتز شد. ساختار ژنی L1-L2-E7 در وکتور بیانی پروکاریوتی (+) pET-24a ساب کلون شد. بدین منظور، هضم آنزیمی فیوژن L1-L2-E7 با آنزیم‌های محدودالاثر



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 محدودالاثر



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

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

### یافته‌ها

**طراحی و ساخت سازه DNA بی‌حامل فیوژن L1-L2-E7**  
 با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، پپتیدهای غیرحساسیت‌زا، حفاظت شده و اینمی‌زای مشتق از پروتئین‌های L1، L2 و E7 از دو فرم پرخطر HPV16/18 انتخاب شدند و سازه پپتیدی AAY فیوژن طراحی شد بهطوری که پپتیدها توسط لینکر آلانین-آلانین-تیروزین بهم متصل شدند. پپتیدها شامل نواحی آمینواسیدی (43-57)، E7(11-20)، L2(11-20)، E7(461-471)، L2(11-20)، E7(78-91) از HPV16 و L1(8-22)، L2(274-430)، L2(281-297) از HPV18 برای MHC-I و شامل نواحی آمینواسیدی L1(416-420) از HPV18 برای MHC-II بودند (شکل ۱). ترجمه ساختار پپتیدی به ساختار ژنی انجام شد و نواحی آنزیم‌های محدودالاشر بهمنظور ساب کلون کردن در وکتور بیان باکتری در نظر گرفته شدند (شکل ۲).

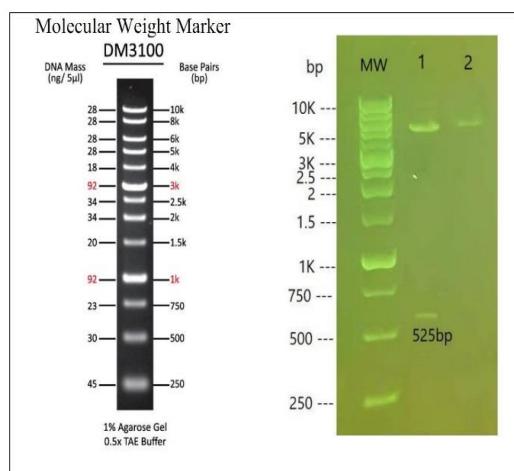
**تائید ساب کلون کردن فیوژن L1-L2-E7 در وکتور بیانی pET24a (+)**

### بیان پلی‌پپتید چند اپی‌توپی نوترکیب L1-L2-E7 و بهینه‌سازی آن

بهمنظور بیان پلی‌پپتید چند اپی‌توپی نوترکیب L1-L2-E7 سویه E.coli (Rosetta) با پلاسمید نوترکیب L2-E7 توسط روش شوک حرارتی تنسفورم 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 تیوگالاكتوپیرانوزید (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) شد زمانی که جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر بهمیزان مشخصی رسید. در این راستا، از دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار استفاده شد. بهعلاوه میزان جذب در رنج‌های ۰/۷-۰/۸-۰/۹-۰/۱ در نظر گرفته شد. بیان پلی‌پپتید نوترکیب در زمان‌های مختلف انکوباسیون یعنی ۲، ۴، ۱۶ ساعته بعد از القا در دو دمای ۳۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. رسوبات سلولی برداشت شدند و توسط الکتروفورز روی ۱۲/۵ (sodium dodecyl sulfate-) SDS-PAGE درصد polyacrylamide gel electrophoresis) آنالیز شدند. به علاوه، بیان پلی‌پپتید چند اپی‌توپی نوترکیب 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 کردن 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

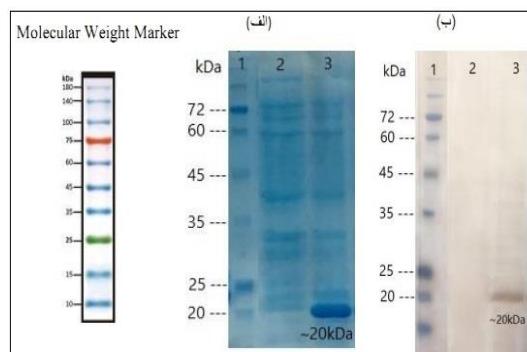


شکل ۴- تأیید پلاسمید pET24a-L1-L2-E7: ستون ۱) هضم آنزیمی پلاسمید-*EcoRI/HindIII* روی ژل مشاهده شد؛ ستون ۲) پلاسمید تخلیص شده MW مارکر اندازه مولکولی است (فرمتوz).

یک میلی‌مولار و زمان ۱۶ ساعت پس از القا نشان داد. آنالیز SDS-PAGE حضور باند حدود ۲۰ کیلو Daltonی 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 سوبه باکتری Rosetta به طور موفقیت‌آمیزی انجام شد. پلی‌پپتید نوترکیب بهترین بیان را در جذب ۷/۰ تا ۸/۰ 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 کیلو Dalton، فرمتوz)، 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 ایندیکاتور آن ها القا پاسخ ایمنی Th1 را نشان داد (۲۰).

گروه ما در گذشته اپیتوب‌های ایمنوژنیک 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). بعلاوه اپیتوب‌های ایمنوژنیک انکوپروتئین‌های E5، E6 و E7 از ویروس‌های پرخطر با استفاده از یک روش ایمنونفورماتیک دو مرحله‌ای توسط گروه ما شناسایی شد (۲۰). در این مطالعه، ما اپیتوب‌های ایمنوژنیک 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 پیتیدی چند اپیتوبی L1-L2-E7 طراحی کردیم که می‌تواند در آینده به عنوان واکسن‌های پیشگیری کننده و درمانی مطرح گردد. به این منظور، توالی نوکلئوتیدی فیوژن L1-L2-E7 سنتر شد و در وکتور بیانی L1-L2-E7 با اندازه حدود ۵۲۵ نوکلئوتیدی تهیه و تأیید شد و به منظور بیان در سویه باکتری Rosetta توسط الفاگر IPTG مورد استفاده قرار گرفت. بیان پلی‌پیتید نوترکیب در دمای ۳۷ درجه و ۱۶ ساعت پس از القا توسط آنالیز SDS-PAGE تأیید شد. حضور باند حدود ۲۰ کیلودالتون مربوط به پلی‌پیتید نوترکیب چند اپیتوبی L1-L2-E7 توسط آنتی‌بادی ضد His-tag و سوبستراتی DAB روی کاغذ وسترن بلاط آشکار شد. طراحی و تولید این ساختار پلی‌پیتیدی برای اولین بار صورت گرفته است که مراحل تخلیص و بررسی توانایی آن به عنوان یک کاندید واکسن در آینده انجام خواهد شد.

## نتیجه‌گیری

ساخت موفقیت‌آمیز پلasmid 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 پلی‌پیتید نوترکیب L1-L2-E7 با اندازه حدود ۲۰ کیلودالتون به طور موفقیت‌آمیز توسط آنالیزهای SDS-PAGE و وسترن بلاط در دما و زمان مشخص تأیید شد. در مرحله بعد، پلی‌پیتید بیان شده پس از تخلیص به عنوان 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 پاپلوومای 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 پاپلوومای انسانی به عنوان ویروس پاتوژن مهم عامل اصلی سرطان دهانه رحم است (۲۶). به تازگی، واکسن‌های درمانی یک استراتژی مؤثری هستند تا سیستم ایمنی را در برابر سرطان‌های مرتبط با نوع پرخطر HPV تحیرک کنند. واکسن‌های ویروسی (۱۲)، واکسن‌های DNA پروتئینی (۲۷)، واکسن‌های پیتیدی (۲۸) و واکسن‌های اپی (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 پیتید به عنوان انتخاب مورد توجهی جهت درمان بدخیمی‌های مرتبط با HPV مطرح شده‌اند (۳۰). اتصال پیتیدها به لیپیدها و استفاده از چند اپیتوب مختلف ایمنوژن، استفاده از اپیتوب‌های آگونیست و استفاده از ادجوانات‌های مختلف از جمله راهکارهای هستند که برای افایش ایمنی زایی واکسن‌های پیتیدی پیشنهاد شده است (۳۱، ۳۲).

مطالعه‌های متعددی روی ایمنوژنیستی اپیتوب‌های L1، L2 و E7 در واکسن‌های براساس پیتید انجام شده است برای مثال، Feltkamp و همکاران توالي<sup>۴۹</sup> RAHYNIVTF<sup>۵۷</sup> را به عنوان یک اپیتوب مهم HPV16 E7 متصل به MHC<sub>I</sub> تعیین کردند که پاسخ‌های مرتبط با لمفوسيت‌های T سيتوتوكسيک را القا می‌کند (۳۳، ۳۴). بعلاوه، حدود ۵ سال بعد، و Kawana و همکاران پیتید VEETSFIDAGAP<sup>۱۲۰</sup><sup>۱۰۸</sup> را به عنوان یک اپیتوب بهمیزان بالا ایمنوژنیک HPV16 L2 معرفی کردند In vivo و Namvar. In silico<sup>۳۵</sup> و همکاران با آناليزهای DNA ای از اپیتوب‌های نشان دادند که ترکیب ساختارهای L1 و L2 از اپیتوب‌های HPV غالباً ایمنی مشتق از پروتئین‌های L1 و L2 از این نوع پرخطر پاسخ‌های ایمنی را بهطور مؤثر 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). و Namvar و همکاران با استفاده از آناليزهای بیوانفورماتیکی دو سازه مجزا حامل اپیتوب‌های E5 و E7 از چهار نوع پرخطر HPV را

## منابع

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. *Intervirology.* 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, Bieblová 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.

سازمان اسناد و کتابخانه ملی  
جمهوری اسلامی ایران



17. Melfi 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, BarriónuevoRosas 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.