

核酸（DNA）疫苗

呂俊毅

一、前言

核酸疫苗是一種新的疫苗技術，也可以說是疫苗發展史上一個重要的進展。傳統的疫苗都是將完整的微生物或微生物的一部分成份加以處理製造而成，其中最重要的抗原成份就是微生物的蛋白質。微生物的蛋白質成分，在人體內誘發免疫反應，產生抵抗力。核酸疫苗則是將微生物的遺傳物質-基因，也就是去氧核糖核酸（DNA）片段，直接接種至動物或人體身上，這個DNA片段隨後在接種者的體內表現成為蛋白質，而後引起接種者的免疫反應。除了DNA以外，也有人用RNA做成疫苗，這類以微生物的DNA或RNA做成的疫苗，統稱為核酸疫苗，也可以稱為基因疫苗（genetic vaccine）。現有關於核酸疫苗的研究，仍然是以DNA疫苗為主。本文將以DNA疫苗這個名稱來代表這一類的疫苗，並就DNA疫苗的歷史、原理、優缺點、以及應用等方面作一簡單的介紹。

二、歷史背景

長久以來，科學家一直有利用DNA注射到人或動物體內來誘發免疫反應的想法。早在40多年前，Atanasiu 等人已經發現，將

polyoma virus DNA注射到天竺鼠（hamster）體內，不但可以使其產生腫瘤，也可以誘發抗體產生[1]。這可以說是DNA疫苗的濫觴。從今天的角度來看，將質體（plasmid）轉殖（transfect）至真核細胞（eukaryotes）中，使該質體所帶有的基因在細胞中表現，並製造出蛋白質產物，可以說是分子生物學的基本技術之一。此時，如果此蛋白質產物具有抗原性，它便有機會誘發免疫反應。不過，早年的專家普遍認為，外來的裸露DNA（naked DNA）是很不穩定的，它們不像病毒的核酸有蛋白外套的保護，在進到體內以後，很快便會被破壞掉，所以十分懷疑外來的DNA可以在體內表現，也因此認為DNA疫苗很難有實際上的用途。

1990年，Wolff等人發現，直接將含有chloramphenicol acetyltransferase（CAT）或Lactase基因的質體，經由肌肉細胞注射至老鼠的四頭肌（quadriceps）後，可以在肌肉細胞中找到CAT蛋白或Lactase的表現，並維持一段相當長的時間[2]。在1992年，Tang 等人利用基因槍（gene gun）將生長激素基因打入人體皮膚，成功地產生對抗生長激素的抗體[3]。這些證據，終於讓科學家相信：外來的DNA可以在體內表現出蛋白質，並誘發免疫反應。也激起科學家對這項技術在醫學上的應用，產生極大的興趣。相關的研究和討論如雨後春筍般冒出。

Ulmer等人在1993年所發表的報告，可以說是最早利用DNA疫苗預防傳染病的實驗。他們將表現流感病毒nucleoprotein的DNA疫苗，以肌肉注射的方式成功地預防了實驗老鼠感染流行性感冒[4]。隨後，Wang等人證明DNA疫苗可以誘發針對HIV的免疫反應[5]。到今天，已經有許多實驗證明了DNA疫苗可以有效誘發保護力對抗許多病毒、細菌、或寄生蟲。到2007年，至少已經有兩種動物用的DNA疫苗已經獲得上市的許可：一個是用在馬的西尼羅河病毒（West Nile virus）DNA疫苗，一種是用

在鮭魚(salmon)的感染性造血壞死病(Infected Hematopoietic Necrosis) DNA疫苗[6]。

三、DNA疫苗的優點

疫苗的種類與型式很多，各有各的優缺點〈表一〉。相較於傳統的疫苗技術，DNA疫苗有什麼優點？而除了學術上的興趣，它又有什麼值得大力研究或臨床應用的地方？

儘管生物技術的發展，已經使疫苗的開發有顯著的進步，但仍面臨許多困難。主要的困難是：活性疫苗的製造不易，使用上又有安全顧慮；去活性的疫苗又是以誘發體液性免疫反應為主(humoral immunity)，部分的微生物具有細胞內生長的特性，光是體液性免疫，也就是只有抗體反應，並不足以有效預防致病原感染。即使是使用體外重組製造的抗原蛋白質用作疫苗，也可能無法產生有效的第一型MHC(MHC-I)限制的細胞毒殺性T細胞(MHC-I restricted cytotoxic cell)反應，所能提供的保護效果終究有限。

一個好的疫苗最好能夠同時引發體液性及細胞性免疫反應(cellular immunity)。體液性免疫反應主要是經由抗原呈獻細

表一、各類疫苗的比較

| | 減毒活性疫苗 | 死菌或成份疫苗 | DNA疫苗 |
|------|----------------------|---------|---------------------------|
| 安全性 | 有致病的風險 免疫功能不全者不適用 | 高 | 高，但是有致癌 或其他未知風險 的疑慮 |
| 抗體反應 | 強 | 強 | 較弱 |
| 細胞反應 | 強 | 無 | 有 |
| 製造 | 需要嚴格品管 | 較簡單 | 簡單 |
| 儲存 | 低溫 | 低溫 | 室溫 |
| 製造成本 | 高 | 高 | 較便宜 |

胞（antigen presenting cell, APC）吞噬外來的抗原，經由吞噬、分解後與第二型MHC（MHC-II）分子結合，表現在抗原呈獻細胞的細胞表面上，然後藉由與CD4陽性的T細胞上的T細胞接受器（T-cell receptor）結合，活化CD4陽性T細胞。被活化的CD4陽性T細胞則可以活化B細胞，促使其製造與分泌抗體，利用抗體來中和病原菌。因為抗原為細胞外的物質，而非細胞本身合成的，所以此呈獻途徑稱為外生性途徑（exogenous pathway）。體液性免疫反應主要由B細胞產生抗體，來對抗病原體的侵略。其缺點是效果侷限於對抗細胞外的致病菌，因為抗體對於已經進入細胞內的病原菌並無多大作用。相對地，細胞性免疫反應則有不同的機轉：細胞內病原菌在有核細胞內合成的蛋白質，經由proteosome分解成胜肽（peptides）片段，並藉由antigen peptide transporters（TAP1, TAP2）等的協助，將胜肽送入內質網（endoplasmic reticulum, ER）中，與MHC-I分子結合，再送到細胞表面。同樣地藉由與T細胞接受器結合，可以活化CD8陽性的T細胞。被活化的CD8陽性T細胞，部分具有毒殺細胞的功能，故又稱為細胞毒殺性T細胞（cytotoxic T lymphocyte）。這些毒殺細胞可以殺死被病原菌感染的細胞，對抗細胞內病原菌的感染，對於消滅細胞內的病原體非常的重要。此抗原呈獻途徑稱為內生性途徑（endogenous pathway）。傳統的疫苗大多是利用外來的蛋白質抗原，所以大部分的抗原都是經由外生性途徑活化免疫系統，產生的免疫反應以抗體為主，無法進入內生性途徑，不能刺激細胞毒殺性T細胞，對於存在細胞內的微生物感染，保護效果也就有限。

DNA疫苗提供我們一個新的選擇，因為DNA質體可以進入細胞內，在體內長期表現其錄製的蛋白質，這些蛋白能夠在細胞內與第一型MHC分子結合，刺激CD8陽性的細胞毒殺性T細胞。這樣的過程，與病毒自然感染時所經的途徑較為接近，可以產生

全面性的免疫反應，其中包括了體液性及細胞性免疫反應。這是DNA疫苗主要的優點之一。

除此之外，DNA疫苗還有許多優點。首先，它不含有微生物體。不論是在製作過程或是在使用過程，都不必擔心會有意外感染的情形。也不會有其他疫苗成分干擾免疫效果，或導致不良的免疫反應的問題。所以，無直接的安全顧慮是DNA疫苗的另一個優點。再者，許多病原菌的表面抗原會進行快速且頻繁的突變，而一再抗原突變的結果，將使得體內所產生的中和抗體無法辨識新生成的抗原。DNA疫苗的製造，相對地比較容易，可以輕易製造出同時具有數個基因的DNA疫苗，用來同時預防數種血清型，甚至數種致病原的感染。此外，也是由於DNA疫苗的製備，相對來說比較容易，也就比較容易爭取時效，對於製造疫苗來預防新興(emerging)或再浮現性(re-emerging)感染症，可以有及時的效果。除了病原的基因以外，還可以加上免疫佐劑的基因，加強免疫效果。除此之外，DNA疫苗的製造費用較低。而且，因為DNA疫苗在室溫下很穩定，不必考慮冷鏈(cold chain)的問題，儲存及運送較容易，尤其適用於第三世界國家。

四、DNA疫苗的設計

DNA疫苗的基本設計並不複雜。通常是將我們想要預防的病原菌的某個基因，接在適當的驅動子(promoter)之後，再利用適當的載體(vector)送入體內。CMV promoter是最常用的驅動子，因為它可以在哺乳類動物細胞內驅動表現出大量的蛋白產物。其他有關病原菌基因的設計，還牽涉有許多分子生物的技術。科學家至今已經了解有許多特別的技術，可以使DNA疫苗產生較好的效果。以下舉例說明。

（一）序列最佳化（**optimization**）

雖然自然界所有物種的蛋白質DNA密碼是一樣的（同樣的DNA序列表現出同樣的胜肽鏈），但由於不同物種的tRNA數量有所不同，所以不同DNA密碼的轉譯效率也有所差異。微生物的DNA序列不一定最適合於人體內表現，所以要將微生物的基因做成疫苗用在人體，必須先將該DNA序列最佳化，成為適用於人體內的表現。

同樣地，RNA也有最佳化的問題。RNA序列中若有過高的G/C含量，則容易產生二級結構，阻礙蛋白的轉譯。或者有些RNA序列中有cis-acting elements。會受到其他其他基因產物的調控。例如HIV的gag蛋白有rev-responsive element，如果缺乏rev蛋白，gag不會大量表現，也會一直陷在細胞核內。若把這個部分去掉rev，就可以大量表現，此時拿來當作疫苗成功的機會較大[7]。

（二）**CpG** 序列

DNA本身的一些特性可以決定該DNA疫苗是否會引發好的免疫反應。大腸桿菌單股DNA容易引起B細胞多發性活化（polyclonal activation）的現象，若經DNase處理過，則此現象即會消失。有趣的是，若改用哺乳動物的DNA（如牛胸腺DNA），則無此種現象[8]。顯然低等生物的DNA與高等生物DNA之間存在著些許差異，造成在哺乳動物引發免疫反應的程度有明顯不同。1995年首先有人發現，細菌DNA特別容易引起免疫反應的原因主要是在細菌DNA中，CpG雙核苷酸的位置通常沒有甲基化，而哺乳動物則有[9]。此表示哺乳動物的免疫系統會針對沒有甲基化的CpG產生多發性活化的反應。這樣的CpG結構小段（CpG motif），也稱作免疫刺激序列（immunostimulatory sequence, ISS），可以激發非特異性免疫系統，產生一系列的細胞激素，包

括IL-6、IL-12、以及IFN- α 、IFN- β 等等，在DNA疫苗的免疫機轉上，佔有重要的地位[10-12]。加入CpG motif，有可能可以提高DNA疫苗的免疫效果。

（三）不表現的DNA序列

許多微生物的基因當中，含有5端或3端的不表現序列（UTR, untranslated region）。這些序列雖然不表現，但可以調控微生物基因的表現。把這些序列加到DNA疫苗中，也有可能可以增加微生物基因的表現效率與疫苗的效果。同樣的道理，一般mRNA所擁有的poly-A tail，可以增加mRNA的穩定度。有研究發現，B型肝炎的DNA疫苗若加入poly A tail，確實可以增加抗原的表現與抗體的產生[13]。

五、DNA疫苗載體

目前比較常用的DNA疫苗載體有以下數種：

（一）質體（plasmid）載體

DNA疫苗最常用的設計是利用雙股環狀的質體（plasmid）來當作載體。一般是將微生物具有抗原性的蛋白基因放入質體中。為使該質體可以大量表現該基因，產生大量的蛋白質產物，該質體必須具有一個很強的驅動子（promoter）。這也是DNA疫苗的先決條件。不同的驅動子，有不同的蛋白質表現量。表現量高而穩定的病毒驅動子，例如CMV（cytomegalovirus）或RSV（Rous sarcoma virus）驅動子，是目前最常用的兩種DNA疫苗驅動子。除此之外，質體中尚必須有複製起始點以及抗藥性基因，以便可以在細菌中大量製造及篩選。

而DNA疫苗最簡易的使用方法是將此含有微生物DNA的質體，溶於生理食鹽水或其它的溶液，然後以肌肉注射的方式送入

肌肉細胞內。肌肉注射以後，肌細胞會自動將此質體帶入細胞內，並進行轉錄及轉譯的工作。

DNA疫苗除了本身的設計以外，溶解DNA所用的溶液、質體的形式及投予的路徑等因素都會影響質體DNA在體內表現的程度。除了肌肉注射，DNA疫苗也可以用皮下或皮內注射投予。另外，基因槍是將質體DNA附著在金質的小珠（gold beads）上，再利用物理的力量直接打入細胞內。利用基因槍可以減少DNA疫苗的注射量，或者獲得較佳的免疫反應，因為基因槍可以把DNA疫苗直接送入細胞內，效率較高[14]。除此之外，也有人嘗試以靜脈注射、口服後經由胃黏膜吸收、甚至經由鼻黏膜或氣管內投予。不過這些實驗大多是使用reporter gene的表現情形來判定，是否能引發免疫反應必須更進一步的研究。將DNA與微脂體（liposome）或lipofectin混合在一起，也可達到以靜脈注射、腹腔注射、或其他途徑給予的目的[15]。不同的施打方式，產生的免疫反應可能會有所不同。目前的研究顯示，肌肉注射應該是一個理想的注射方式，因為它使用最方便，也可以引起足夠的免疫反應。此外，肌肉注射的結果主要是以TH-1反應為主；相對的，以基因槍施打的核酸疫苗，則主要是誘發TH-2反應[16]。

（二）病毒載體

利用病毒會感染宿主細胞的特性，可以將DNA疫苗帶入體內。經過適當的設計以後，製造出會感染人或動物體，卻不會致病的病毒載體。將DNA疫苗插入到這類病毒載體的基因體之中，當病毒感染人或動物體時，便會順便將設計好的DNA疫苗一起帶入體內，並在體內表現成抗原，引起宿主的免疫反應。

常用的病毒載體有反轉錄病毒（retrovirus）及腺相關病毒（adeno-associated virus）等等。利用病毒載體的主要問題是，病

毒載體的製備及純化過程較為複雜，並且病毒載體也有可能誘發宿主的免疫反應，甚至有安全性的顧慮，這些問題限制了它的應用。不過病毒載體的應用在DNA疫苗，甚至更廣泛的基因治療領域內，仍有十分值得重視的角色。

（三）細菌載體

某些細菌會在人或動物體的細胞內繁殖，我們可以利用基因工程的技術，設計製造出一些會感染人體但是不會致病的減毒細菌（attenuated bacteria），再將抗原的DNA插入到其基因體之中。使其在感染人或動物體的同時，順便將該DNA帶入體內，達到體內表現並誘發免疫反應的目的。最早的實驗可能是 Sizemore 等人於1995年，利用志賀氏菌（*Shigella*）攜帶大腸桿菌的 β -galactosidase基因經由鼻腔（intranasal）送入老鼠體內，發現可以產生 β -galactosidase的抗體及淋巴增生反應[17]。此外，也有人使用低致病性的沙門桿菌（*Salmonella typhimurium*）來攜帶李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）的基因，製成口服的疫苗[18]。

六、DNA疫苗引發免疫反應的可能分子機制

一般相信，DNA疫苗的基本原理是，當DNA疫苗注射進入體內以後，便會利用宿主體內的工具與材料進行轉錄及轉譯的工作，產生蛋白質。此蛋白質產物再進一步誘發宿主體內的免疫反應。然而這當中仍有許多細節值得探討。除了經由傳統的蛋白質表現途徑，是否有其他新的表現途徑可以引發免疫細胞的活化，至今沒有確定的答案。DNA疫苗在肌細胞內的產物量很低，可能只有picogram或nanogram的量。動物實驗觀察到的免疫反應，卻遠大於這樣微量的蛋白質可以誘發的程度。而且，肌細胞本身並不是一種好的抗原呈獻細胞，雖然利用組織切片染色的方

式可以證明蛋白質可以由肌肉細胞產生，但是無論是在肌肉母細胞（myoblast）或是肌肉小束（myotube），它們表現MHC-I及MHC-II分子的能力並不好，而表現其他附著分子（adhesion molecule）的能力也不好。更難以說明DNA疫苗免疫反應的機制。可能的解釋包括：DNA可能直接進入骨髓衍生的抗原呈獻細胞中，但更可能的是DNA由肌肉細胞所吸收，再將產生的蛋白質（或DNA本身）傳給專業性抗原呈獻細胞，而由此細胞產生MHC-I或MHC-II限制的T細胞反應。從這個角度來思考，很可能有一些效率較佳的抗原呈獻細胞參予在DNA疫苗的免疫反應中。

目前已有實驗證明，若先在試管中使流行性感冒病毒的核蛋白（nucleoprotein）DNA疫苗在肌肉細胞中表現，只要再將這些細胞打入未受感染naive老鼠的四頭肌中，該老鼠即可產生很好的抗感冒病毒的免疫力。更進一步，利用不同H-2 haplotype的老鼠建立出混種老鼠（chimera mice）。此老鼠先經放射線照射而後植入另一品系老鼠的骨髓細胞，使混種老鼠的肌肉細胞表現原來的H-2 haplotype，但骨髓衍生的（bone marrow derived）抗原呈獻細胞卻表現另一H-2 haplotype。由此實驗結果得知，引發細胞毒殺T細胞反應（CTL）是來自骨髓衍生的抗原呈獻細胞（APC）而非肌肉細胞本身。這與我們一般所了解的抗原呈獻的途徑相當的不同。究竟肌肉細胞如何將合成好的蛋白質或是質體由肌肉細胞中直接分泌出來，而交由抗原呈獻細胞的MHC-I分子呈獻給細胞毒殺T細胞認識，目前尚不清楚。

至於注射入的DNA疫苗，在體內可以持續表現多久的時間，則受許多因素影響[19]。在Wolff的研究中，打入pRSV-L質體，可以在老鼠的肌肉細胞中表現出Luciferase活性的時間，長達19個月以上[20]。由此可以推測，DNA的表現可以維持老鼠的一生，因為19個月對老鼠來說，已經接近自然死亡的時間。

七、調節DNA疫苗免疫反應的方法

DNA疫苗並非用在各種疾病的預防上，都能奏效。有時還需要有免疫佐劑（adjuvant）或其他輔助刺激分子的幫忙，才能產生較好的免疫反應。有一個例子是在施打DNA疫苗前先在肌肉同一位置打入cardiotoxin。Cardiotoxin是由蛇毒中萃取出來的成份，可以引發肌肉纖維的再生，但不會破壞血管的組織，也不會傷害到附近負責肌肉細胞再生的衛星細胞（satellite cells）。經由cardiotoxin預先破壞肌肉細胞的處理後，抗B型肝炎表面抗體（HBsAg）的濃度很快就上升了。相對的，不先打cardiotoxin而只打DNA疫苗，則晚10天才測到抗B型肝炎表面抗體，並且抗體的量低了很多[21]。細胞激素（cytokine）也可當作DNA疫苗的佐劑。若同時打入IL-2或GM-CSF的質體和欲表現蛋白質的質體，即可大大的增加對抗該蛋白質的抗體和細胞毒殺性T細胞（CTL）反應。不同的細胞激素也有不同的免疫效果；例如IL-4質體可以使免疫反應往Th-2的形式發展。反之，IL-2質體則可以往Th-1發展。Chow等人曾經利用同時注射表現IL-12及IFN- γ 的質體，使B型肝炎病毒DNA疫苗誘發的免疫反應偏重Th1反應[22]。而在過敏疾病的治療上，若在肺黏膜進行IFN- γ 基因殖入的方法，則可以抑制老鼠的肺部過敏反應。由此可知，細胞激素質體不但可增進免疫反應，同時可以調節免疫反應的形式，使由Th-1轉變成Th-2，或相反的使Th-2轉變成Th-1。

熱休克蛋白（heat shock protein, HSP）是一群結構互相類似，而且普遍存在於各種生物的蛋白質。它們的功能主要是和細胞內蛋白質的摺疊（folding）及運輸（transportation）有關。當生物體處在壓力（stress）底下時，它們的表現量會增加。這種現象不論是在真核生物或是原核生物都是一樣的。有越來越多的研究顯示，熱休克蛋白實際上是許多病原菌的重要抗原[23]。一

個合理的解釋是，病原菌在感染宿主的過程中，因為受到宿主免疫反應的壓力，而大量表現出熱休克蛋白。這些大量表現的熱休克蛋白，誘發了宿主對它們產生了抗體等免疫反應。事實上，在一些細菌、原蟲、或線蟲的感染中，都會產生熱休克蛋白65及70（HSP65, HSP70）的抗體及T細胞反應[24]。這些針對熱休克蛋白的免疫力並不具備物種特異性，這些特性剛好讓它可以拿來作為疫苗的成分或免疫佐劑使用。已經有一些實驗証實，利用熱休克蛋白65及70與病原菌抗原的融合蛋白，可以加強具特異性的免疫反應，包括體液性與細胞性免疫反應[25]。

另外有些腫瘤的DNA疫苗（如CEA plasmid），若加上輔助刺激分子（costimulator）的質體（如B7-I），則可以使抗癌能力大大提升。因癌症之所以能逃避免疫系統，一個重要的原因是其輔助刺激分子的表現量很低，將輔助刺激分子和腫瘤抗原質體一起打人體內，即可增加抗癌的免疫力了[26]。

Sun等人的研究發現結合昆蟲的DNA與未甲基化的CpG可以作為很好的免疫佐劑，其效果甚至於比Freund佐劑更好[27]。Sparwasser等人的研究顯示，CpG可以刺激樹突細胞（dendritic cell）成熟並活化[28]，由此除了進一步證實CpG結構小段可以幫助DNA疫苗誘發免疫反應以外，更可以推測樹突細胞在DNA疫苗的作用機轉中扮演重要的角色。1997年，Chu等人更進一步發現，CpG結構小段可以使老鼠對雞蛋lysozyme蛋白的免疫反應，由Th2轉變為以Th1反應為主[29]。

由此看來，DNA疫苗打入人體後，其誘發免疫反應的機制應分兩個成份來考慮：第一是轉訊單位（transcription unit），即該質體製造出的蛋白質量；另一方面則是佐劑單位（adjuvant unit）。此乃指質體的骨架中是否含有特別的核酸序列，可以刺激抗原呈獻細胞或體細胞產生高量IFN及IL-12。換個角度來說，就

是DNA疫苗本身可以作為它自己的佐劑。我們現在仍不十分清楚轉訊單位和佐劑單位各佔有多大的角色，以及它們是如何相互作用的，包括佐劑單位的數量及處在質體中的確實位置及其如何影響免疫反應的表現。這些都需要更進一步的研究才能回答。

八、DNA疫苗預防傳染病的應用

DNA疫苗應用的領域很廣，至今已經被用在預防至少數十種傳染病的實驗上[30-32]。部分已經用在動物的養殖業上[33,34]，其中包括病毒、細菌及原蟲等各種型式微生物的感染症。也有人把DNA疫苗用在部分傳染病的治療上。此外它也被用在某些癌症的預防或治療上[35]。

(一) B型肝炎

B型肝炎病毒(HBV)的DNA疫苗是目前被研究得最詳細的DNA疫苗之一。現行B型肝炎疫苗的成分是以基因工程技術合成的表面抗原製成。一般而言，這種疫苗的效果相當不錯。但是免疫力正常的年輕人仍有少於5%的人無法產生足夠的抗體。研究發現，利用肌肉注射B型肝炎病毒DNA疫苗即可產生較好的免疫保護：同時產生抗HBV的抗體及細胞毒殺性T細胞反應[36]。在B型肝炎病毒DNA疫苗中，CpG結構小段是很好的免疫刺激劑，它加強了B型肝炎病毒DNA疫苗的免疫反應[37]。除了動物實驗，B型肝炎病毒DNA疫苗的人體實驗，包括用在預防及治療，都已經展開。對於一部份在接受傳統疫苗注射之後，無法產生足夠保護力的個體，DNA疫苗也有不錯的效果[38,39]。不過在黑猩猩的實驗顯示，B型肝炎病毒DNA疫苗的效果，依賴的DNA量很大，而且必須一再的追加注射才能維持長期的免疫力[40]。這似乎限制了B肝DNA疫苗的實用性。

除了用在預防B型肝炎病毒感染，也有人利用B型肝炎病毒DNA疫苗來治療B型肝炎。在一個B型肝炎病毒轉殖鼠的研究當中，B型肝炎病毒DNA疫苗成功地誘發了B型肝炎病毒表面抗體，不但清除了血液中的B型肝炎病毒表面抗原，肝細胞中B型肝炎病毒的mRNA也消失，同時並不會對肝細胞本身造成傷害，表示具有B型肝炎病毒特異性的T細胞也參與其中的反應[41]。除了B型肝炎以外，也有許多人研究DNA疫苗在C型肝炎的應用[42]。

（二）流行性感冒病毒（Influenza）

流行性感冒病毒的一個重要特徵是它會不斷的突變，主要是其hemagglutinin 及neuraminidase兩個表面蛋白會不斷變異，出現新的病毒株，進而導致大規模的流行。流行性感冒病毒的核蛋白（nucleoproteins, NP），相對地比較不會有變異，可能可以產生跨種病毒的保護力。可惜在自然感染下，核蛋白本身並不足以產生足夠的免疫力，保護宿主免於感染。

近年來H5N1等禽流感（avian flu）的威脅，更讓專家們急於找到一種可以快速生產效果又可靠的流感疫苗。現行的去活性疫苗注射，必須每年預測當年可能流行的病毒株，然後再進行疫苗的製造。現有流感疫苗是在雞的胚胎中製造，製造的過程加上各種測試，以及運送至全球各地，至少需要六到九個月的時間。每年流感疫苗的注射時間都很緊迫，若遇到突發的大流行，現有的疫苗製造往往緩不濟急。一旦疫苗工廠出現品管的問題，連季節性流感都可能出現沒有疫苗可用的窘境。另外，如果流行的流感病毒株預測錯誤，或有全新的病毒株出現，則現有的流感疫苗可能無效。就這些角度來看，DNA疫苗確實提供了許多優勢，因為流感病的hemagglutinin基因可以很輕易的以分子生物學的技術複製與放大（cloned and amplified），解決了時間上的急迫性。

事實上，流行性感冒病毒是DNA疫苗最早的實驗對象之一。很早就有人成功地利用流行性感冒病毒的hemagglutinin (H7) 基因，在雞身上產生保護力[43]。流感的DNA疫苗，也已經被證明可以有效的在靈長動物誘發足夠的免疫反應[44]。雖然早年的實驗顯示，DNA疫苗在人體可能不能產生足夠的抗體反應，最近的研究發現，使用基因槍 (gene gun) 可以有效提高了人體產生流感病毒抗體的情況[45]。可惜，抗體產生需要大約兩個月的時間，這又顯得緩不濟急。也有部分的研究發現，流感病毒的核蛋白基因的DNA疫苗，並不能提供足夠的保護力[46]。可見這方面仍存在許多不確定性，也需要更多的研究。此外，針對流行性感冒病毒會不斷突變的問題，曾經有人利用含有流行性感冒病毒核蛋白基因的DNA疫苗，在老鼠體內誘發出針對不同種 (發生了 antigenic drift) 的A型流行性感冒病毒的保護力[47]。這樣的結果若證明能應用在人體身上，將是流感的預防工作上一個很重要的突破，因為解決了流感病毒經常突變的問題。

(三) 人類免疫不全病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV)

雖然抗愛滋病藥物的研發，近年來愛滋病的治療已經有許多進展。但是，抗病毒藥物的副作用很大；愛滋病毒會出現抗藥性；既使藥物控制良好，一旦停藥，病毒又將增生，甚至發病；再加上藥物的費用很昂貴，大部分愛滋病盛行的國家都負擔不起。這些因素加在一起，使得發展一種有效的愛滋病毒疫苗，仍然是值得努力而且有可能奏效的方向。

愛滋病毒疫苗的研發至今已經有許多進展，但是，愛滋病毒疫苗的研發也面對其它許多難以解決的難題。首先，活性減毒疫苗的危險性極高，很少人相信可以製造出一種安全有效的活性愛

滋病毒疫苗。其次，愛滋病毒破壞的對象就是宿主的免疫系統本身，即使是自然感染，愛滋病毒也不會產生免疫力；而且，愛滋病毒會一再突變、它還可以把基因插入（integrate）到宿主的基因體中、自然界中可供研究的動物模式又不多或不方便使用等等。至今，有關病毒成份疫苗（subunit vaccine）的研究非常多，可惜幾乎所有的愛滋病毒疫苗都未能有效預防愛滋病毒感染[48]。所以，即使愛滋病毒可以說是人類有史以來研究得最透徹的病毒之一，專家們仍然找不出一個有效的方法，包括各種傳統的疫苗技術，來預防它的感染[49]。DNA疫苗的進展，給愛滋病毒感染的預防帶來許多希望[50]。

利用DNA疫苗的技術，可以把愛滋病毒致病的關鍵基因剔除，而取其結構蛋白基因（例如gag, env）製成疫苗。現有的研究，確實也有部分令人興奮的結果。例如，在一些以恆河猴（rhesus macaque）作為實驗對象的研究中，以愛滋病毒的gp160基因為主成份的DNA疫苗，可以保護恆河猴，使其免於被人類免疫不全病毒（human immunodeficiency virus, HIV）-猿類免疫不全病毒（simian immunodeficiency virus, SIV）混種病毒（chimeric virus of HIV and SIV, SHIV）的感染[51]。另一個實驗中，黑猩猩（chimpanzee）在接受以人類免疫不全病毒的gp160及gag-pol基因製成的DNA疫苗以後，獲得了免受其他型人類免疫不全病毒感染的免疫力[52]。類似的實驗很多，可惜結果並不一致。主要的關鍵在於DNA疫苗所使用的策略，以及所選擇的病毒株有關。其中，這類實驗面臨的一個困難是，人類免疫不全病毒（HIV）幾乎不會感染恆河猴，會感染猿類動物的是猿類免疫不全病毒（SIV），但是一開始卻不可能用人類來做這類的實驗，所以只好以小動物來做實驗[53]。比較好的動物實驗模式可能是用猿類免疫不全病毒（SIV）搭配非人類靈長類動物，或用人類

免疫不全病毒(HIV)與猿類免疫不全病毒(SIV)的混種病毒(SHIV)搭配非人類靈長類動物的動物模式，來代替實際的人類免疫不全病毒(HIV) / 人類模式。然而，這樣的動物模式難免失真，是否可以代表人類受到愛滋病毒感染的實際情形，其實仍有疑問。事實上，近年來愛滋病毒DNA疫苗的人體實驗已經展開，若干個初步的實驗已經證實了愛滋病毒DNA疫苗的安全性[54]。卻也有部分實驗證明愛滋病毒會一再突變，最終躲過DNA疫苗所誘發的細胞性免疫力，導致疫苗失敗[55]。

和用在預防其他的傳染病一樣，愛滋病毒DNA疫苗的效果也可以用細胞激素來加強。在一個實驗中，同時施打IL-2的基因，可以讓愛滋病毒gag及env基因的DNA疫苗效果加強，產生更好的抗體及細胞毒殺性T細胞反應，並且避免愛滋病症狀的出現[56]。

(四) 結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)

結核病至今仍是全世界最重要的傳染性疾病之一，尤其在愛滋病及其他免疫力缺陷病患的數目增加以後，結核病的重要性又逐漸提高。抗藥性結核菌的出現及逐漸普遍，也使得預防結核菌感染日形重要。卡介苗(bacille Calmette-Guérin, BCG)是目前最常用來預防肺結核的疫苗，但有關卡介苗效果的研究，有的是完全無效，有的則有80%的保護力。目前普遍接受的觀念是，卡介苗可以預防嚴重的結核菌感染，例如結核菌腦膜炎或彌散性結核菌感染，但是並不能預防所有的結核菌感染。另外一方面，卡介苗的施打有一個明顯的壞處，那就是使得往後的結核菌素皮膚測驗(PPD skin test)變得難以判讀。所以，發展更好的結核菌疫苗有很高的必要性。

在結核菌的慢性感染中，結核菌通常會表現出一些感染晚期特有的蛋白，例如19-kDa抗原、PhoS、及熱休克蛋白10、65、70

等等[25]。這些抗原可以引起強烈的免疫反應[57]，可能可以用作DNA疫苗的主要成份。動物實驗已經證實，含有熱休克蛋白65的DNA疫苗，施打在老鼠身上以後，可以減少感染後的結核菌量[58]。Th1細胞反應在結核菌感染的控制上非常重要，而DNA疫苗可以誘發強烈的Th1細胞反應，應是可以減少隨後感染後細菌量的主要原因。除了預防，也有人把DNA疫苗用在結核菌感染的治療上。Lowrie DB等人的研究顯示，含有HSP65的DNA疫苗用在感染後的動物，可以減少動物體內的結核菌量，並增強抗結核菌藥物的療效，使得治療的時間可以縮短[59]。這樣的結果有很高的臨床價值，因為結核菌的治療曠日費時，治療不完全又容易導致抗藥性結核菌的產生，若能藉由DNA疫苗來提昇治療的效果，並縮短治療所需的時程，將可以克服這些問題。

結核菌的DNA疫苗，雖然目前已經有一些不錯的實驗結果，但與全面成功仍有極大距離。為達到有效的保護力，光靠DNA疫苗似乎有所不足，仍需搭配傳統的蛋白質疫苗（例如傳統的卡介苗）作為追加（booster）[60]。其他可能的應用方式，還包括結合結核菌的DNA疫苗或細胞激素如IL-12等，合併或系列使用[61]，有可能達到比單獨施打卡介苗更好的保護力。

（五）瘧疾（Malaria）

雖然臺灣地區已經沒有本土性的瘧疾，但以全球的角度觀之，瘧疾仍是今天人類健康最大的威脅之一。非洲、南亞等熱帶地區，瘧疾仍然十分猖獗。同樣的，近年來抗藥性瘧疾的浮現及普遍化，也使得瘧疾的預防不再可以輕忽。

雖然抗瘧疾抗體也有一定的角色，瘧疾的預防還是要靠細胞性免疫。瘧疾的DNA疫苗已經有許多成功的老鼠及靈長類動物實驗。1998年更有一個人體實驗證明，瘧疾的DNA疫苗可以在人體產生具特異性的毒殺細胞反應（CTL）[62]。接受過DNA疫苗的

人在受到抗原刺激以後，會出現免疫增強的現象[63]。

(六) 人類乳突瘤病毒(HPV)感染與子宮頸癌

除了用做預防，DNA疫苗也被用在某些疾病的治療上。子宮頸癌的DNA疫苗是一個最好的例子。子宮頸癌是人類重要的癌症之一，就發生率來說它是全球女性前幾名的癌症。絕大部分的子宮頸癌與人類乳突瘤病毒(HPV)的感染有關[64]，預防人類乳突瘤病毒(HPV)的感染就可以預防子宮頸癌的發生。目前已經有兩種人類乳突瘤病毒(HPV)的感染疫苗可以使用(Gardasil與Cervarix)，它們都是利用HPV的L1蛋白來誘發人體的免疫反應。不過這些子宮頸癌疫苗成本昂貴，需要反覆注射，只針對特定的HPV種類有效，尤其對於已經感染HPV的人甚至已經形成子宮頸癌的病患，都不適用。所以，即使今天已經有子宮頸癌疫苗可以使用，子宮頸癌的DNA疫苗研究，一直沒有中斷。

絕大部份子宮頸癌組織裡，都有人類乳突瘤病毒的E6與E7蛋白表現，利用針對這些蛋白而製造的DNA疫苗，可以誘發人體對這兩個蛋白的免疫反應，尤其是T細胞免疫反應，進一步誘導人體免疫系統攻擊癌細胞，達到治療的效果。這樣的概念，為子宮頸癌或其他癌症的治療提供了新的方向，但是E6或E7本身會使細胞癌化，如何讓這些蛋白在表現之後可以誘發免疫反應，但是不會導致細胞癌化，是一個非常重要的課題。這部分可以藉由修改E6或E7的DNA，使其失去致癌能力[65]。子宮頸癌的DNA疫苗概念性研究，已經陸陸續續被驗證，大部分都呈現有潛力的結果[66]。不過最常遇到的問題還是DNA疫苗誘發的免疫反應較弱。目前也已經有許多研究，探討如何增強DNA疫苗的免疫反應。舉例來說，如何增加呈現抗原的樹突細胞(dendritic cells)、促進樹突細胞的抗原呈現功能、以及如何強化樹突細胞與T細胞的交互作用等等[67]。

九、DNA疫苗的副作用及毒性

進入體內的質體DNA會不會插入宿主的染色體中？如果可以，會不會恰巧活化某個致癌基因（**oncogene**）？或抑制了某個腫瘤抑制基因（**tumor suppressor gene**）而導致細胞的癌化？事實上，這樣的機會是很低的。分析發現，打入老鼠四頭肌（**quadriceps**）的質體只存在其四頭肌及腿後腓肌（**hamstrings**）中，在其它器官或組織並無法偵測到質體的存在。而且大部分打入的質體DNA都很快就被破壞掉。此外，質體存在的方式為游離態的形式（**episomal form**），非插入染色體的形式（**integral form**）。事實上，在不分裂的細胞中，質體並沒有機會插入染色體中。據估計，由於DNA疫苗注射造成插入，而使宿主細胞產生突變的機會，遠遠小於自然突變機會一千倍[68]。這些實驗的結果，雖不完全排除潛在的危險性，但是提供了我們對DNA疫苗未來臨床應用的更多信心與期待。

另外一個重要的問題是：DNA疫苗是否會在體內產生大量的抗DNA抗體，而造成自體免疫疾病？哺乳動物本身的DNA，並不會產生抗DNA抗體。但是在正常人類血清中，可以測到抗細菌DNA抗體。雖然細菌DNA在哺乳動物體內會造成抗DNA抗體的產生，但是在正常老鼠中此抗細菌DNA抗體，卻不會與哺乳動物的DNA產生交叉反應（**cross reaction**）。所以在正常老鼠並不會造成自體免疫性疾病。令人興奮的是，若有自體免疫傾向的NZB/WFI老鼠，打人大腸桿菌的DNA，則會產生「好」的抗DNA抗體。此抗體不但不會導致自體免疫疾病，它甚至可以減緩疾病產生的蛋白尿，並且可以降低死亡率。換句話說，現有的研究顯示，DNA疫苗在哺乳動物體內，雖會產生抗細菌DNA抗體，但是卻不曾造成自體免疫疾病，甚至在自體免疫疾病的老鼠的發病過程中，可以扮演治療的角色[69]。

另外一個可能的問題是，如果外來的抗原長期在體內表現，有沒有可能會導致免疫耐受性（immune tolerance）產生？反而阻礙了宿主自然的免疫反應。還好到目前為止，除了luciferase reporter gene以外，並沒有任何DNA疫苗的動物模式研究顯示會有這種現象。Luciferase可能因為是免疫性特別低，才可以幾乎無限期地表現，導致出現免疫耐受性的現象。

疫苗的施打，一般是在學齡前的兒童身上進行。但最近研究發現將瘧疾的DNA疫苗注射到剛出生2~5天的老鼠身上，會造成老鼠無法產生抗瘧疾抗體。但此現象在蛋白質疫苗中並不會發生。由此可知DNA疫苗與傳統的疫苗相當不同。在更進一步分析其抗體的抗原決定位種類（epitope type）時發現，DNA疫苗在成鼠所造成的免疫反應；其所認識的抗原決定位（epitope）與由蛋白質疫苗所產生的不同。此研究在DNA疫苗的應用中相當的重要，更進一步去探討是否DNA疫苗會導致免疫癱瘓，是相當重要的。

十、結 論

DNA疫苗是一個很有潛力的疫苗技術。但是，至今對於其免疫機制，臨床效果，以及可能導致的副作用，仍然存有許多疑問，需要更多的研究及長期仔細的評估。部分人體實驗也顯示DNA疫苗在人體的免疫效果，似乎不如在動物體內的顯著，使得DNA疫苗的臨床廣泛使用蒙上一層陰影。雖然如此，此項新的疫苗方式畢竟突破了傳統疫苗相當多的限制，提供了一個新的領域。對於至今仍然盛行卻缺乏有效疫苗的傳染病，DNA疫苗的巧妙應用，有機會有效預防或者治療傳染病，DNA疫苗仍然是一個值得研究發展的方向。

【作者簡介】

呂俊毅

◎現職

臺大醫院小兒部主治醫師

◎學歷

臺大醫學院臨床醫學研究所博士

中國醫藥學院醫學系

◎經歷

臺大醫院小兒部住院醫師

國衛院傳染病臨床與研究訓練班

美國國家衛生研究院（NIH）過敏與感染研究所（NIAID）分子病毒實驗室研博士 後研究員



【參考文獻】

1. Atanasiu P, Orth G, Rebiere JP, Boiron M, Paoletti C. [Production of tumors in the hamster by inoculation of desoxyribonucleic acid extracted from tissue cultures infected with polyoma virus.]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences*. 1962; 254: 4228-30.
2. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* (New York, NY. 1990; 247 (4949 Pt 1) : 1465-8.
3. Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*. 1992; 356 (6365) : 152-4.
4. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* (New York, NY. 1993; 259 (5102) : 1745-9.
5. Wang B, Ugen KE, Srikantan V, Agadjanyan MG, Dang K, Refaeli Y, et al. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90 (9) : 4156-60.
6. Laddy DJ, Weiner DB. From plasmids to protection: a review of DNA vaccines against infectious diseases. *International reviews of immunology*. 2006; 25 (3-4) : 99-123.
7. Qiu JT, Song R, Dettenhofer M, Tian C, August T, Felber BK, et al. Evaluation of novel human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA vaccines for protein expression in mammalian cells and induction of immune responses. *Journal of virology*. 1999; 73 (11) : 9145-52.
8. Shimada S, Yano O, Tokunaga T. In vivo augmentation of natural killer cell activity with a deoxyribonucleic acid fraction of BCG. *Jpn J Cancer Res*. 1986; 77 (8) : 808-16.
9. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995; 374 (6522) : 546-9.

10. Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, et al. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* (New York, NY. 1996; 273 (5273) : 352-4.
11. Kojima Y, Xin KQ, Ooki T, Hamajima K, Oikawa T, Shinoda K, et al. Adjuvant effect of multi-CpG motifs on an HIV-1 DNA vaccine. *Vaccine*. 2002; 20 (23-24) : 2857-65.
12. Klinman DM, Yamshchikov G, Ishigatsubo Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J Immunol*. 1997; 158 (8) : 3635-9.
13. Zinckgraf JW, Silbart LK. Modulating gene expression using DNA vaccines with different 3'-UTRs influences antibody titer, seroconversion and cytokine profiles. *Vaccine*. 2003; 21 (15) : 1640-9.
14. Han R, Reed CA, Cladel NM, Christensen ND. Immunization of rabbits with cottontail rabbit papillomavirus E1 and E2 genes: protective immunity induced by gene gun-mediated intracutaneous delivery but not by intramuscular injection. *Vaccine*. 2000; 18 (26) : 2937-44.
15. McCluskie MJ, Brazolot Millan CL, Gramzinski RA, Robinson HL, Santoro JC, Fuller JT, et al. Route and method of delivery of DNA vaccine influence immune responses in mice and non-human primates. *Molecular medicine* (Cambridge, Mass. 1999; 5 (5) : 287-300.
16. Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J Immunol*. 1997; 158 (5) : 2278-84.
17. Sizemore DR, Branstrom AA, Sadoff JC. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* (New York, NY. 1995; 270 (5234) : 299-302.
18. Darji A, Guzman CA, Gerstel B, Wachholz P, Timmis KN, Wehland J, et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell*. 1997; 91 (6) : 765-75.
19. Molnar MJ, Gilbert R, Lu Y, Liu AB, Guo A, Larochelle N, et al. Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles. *Mol Ther*. 2004; 10 (3) : 447-55.

20. Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Human molecular genetics*. 1992; 1 (6) : 363-9.
21. Fomsgaard A, Nielsen HV, Nielsen C, Johansson K, Machuca R, Bruun L, et al. Comparisons of DNA-mediated immunization procedures directed against surface glycoproteins of human immunodeficiency virus type-1 and hepatitis B virus. *Apmis*. 1998; 106 (6) : 636-46.
22. Chow YH, Chiang BL, Lee YL, Chi WK, Lin WC, Chen YT, et al. Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *J Immunol*. 1998; 160 (3) : 1320-9.
23. Zugel U, Kaufmann SH. Immune response against heat shock proteins in infectious diseases. *Immunobiology*. 1999; 201 (1) : 22-35.
24. Young RA. Stress proteins and immunology. *Annual review of immunology*. 1990; 8: 401-20.
25. Silva CL. The potential use of heat-shock proteins to vaccinate against mycobacterial infections. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 1999; 1 (6) : 429-35.
26. Conry RM, Widera G, LoBuglio AF, Fuller JT, Moore SE, Barlow DL, et al. Selected strategies to augment polynucleotide immunization. *Gene therapy*. 1996; 3 (1) : 67-74.
27. Sun S, Kishimoto H, Sprent J. DNA as an adjuvant: capacity of insect DNA and synthetic oligodeoxynucleotides to augment T cell responses to specific antigen. *The Journal of experimental medicine*. 1998; 187 (7) : 1145-50.
28. Sparwasser T, Vabulas RM, Villmow B, Lipford GB, Wagner H. Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *European journal of immunology*. 2000; 30 (12) : 3591-7.
29. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *The Journal of experimental medicine*. 1997; 186 (10) : 1623-31.

30. Davis HL, McCluskie MJ. DNA vaccines for viral diseases. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 1999; 1 (1) : 7-21.
31. Chattergoon M, Boyer J, Weiner DB. Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *Faseb J*. 1997; 11 (10) : 753-63.
32. Lowe DB, Shearer MH, Kennedy RC. DNA vaccines: successes and limitations in cancer and infectious disease. *Journal of cellular biochemistry*. 2006; 98 (2) : 235-42.
33. Haygreen L, Davison F, Kaiser P. DNA vaccines for poultry: the jump from theory to practice. *Expert review of vaccines*. 2005; 4 (1) : 51-62.
34. Heppell J, Davis HL. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced drug delivery reviews*. 2000; 43 (1) : 29-43.
35. Lowe DB, Shearer MH, Jumper CA, Kennedy RC. Towards progress on DNA vaccines for cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2007.
36. Geissler M, Tokushige K, Chante CC, Zurawski VR, Jr., Wands JR. Cellular and humoral immune response to hepatitis B virus structural proteins in mice after DNA-based immunization. *Gastroenterology*. 1997; 112 (4) : 1307-20.
37. McCluskie MJ, Davis HL. CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J Immunol*. 1998; 161 (9) : 4463-6.
38. Schirmbeck R, Bohm W, Ando K, Chisari FV, Reimann J. Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. *Journal of virology*. 1995; 69 (10) : 5929-34.
39. Rottinghaus ST, Poland GA, Jacobson RM, Barr LJ, Roy MJ. Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination. *Vaccine*. 2003; 21 (31) : 4604-8.
40. Triyatni M, Jilbert AR, Qiao M, Miller DS, Burrell CJ. Protective efficacy of DNA vaccines against duck hepatitis B virus infection. *Journal of virology*. 1998; 72 (1) : 84-94.
41. Mancini M, Hadchouel M, Davis HL, Whalen RG, Tiollais P, Michel ML. DNA-mediated immunization in a transgenic mouse model of the hepatitis B surface

- antigen chronic carrier state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93 (22) : 12496-501.
42. Duenas-Carrera S. DNA vaccination against hepatitis C. *Current opinion in molecular therapeutics*. 2004; 6 (2) : 146-50.
43. Robinson HL, Hunt LA, Webster RG. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine*. 1993; 11 (9) : 957-60.
44. Liu MA, McClements W, Ulmer JB, Shiver J, Donnelly J. Immunization of non-human primates with DNA vaccines. *Vaccine*. 1997; 15 (8) : 909-12.
45. Drape RJ, Macklin MD, Barr LJ, Jones S, Haynes JR, Dean HJ. Epidermal DNA vaccine for influenza is immunogenic in humans. *Vaccine*. 2006; 24 (21) : 4475-81.
46. Robinson HL, Boyle CA, Feltquate DM, Morin MJ, Santoro JC, Webster RG. DNA immunization for influenza virus: studies using hemagglutinin- and nucleoprotein-expressing DNAs. *The Journal of infectious diseases*. 1997; 176 Suppl 1: S50-5.
47. Donnelly JJ, Friedman A, Martinez D, Montgomery DL, Shiver JW, Motzel SL, et al. Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nature medicine*. 1995; 1 (6) : 583-7.
48. Whitney JB, Ruprecht RM. Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects. *Current opinion in infectious diseases*. 2004; 17 (1) : 17-26.
49. Calarota SA, Weiner DB. Approaches for the design and evaluation of HIV-1 DNA vaccines. *Expert review of vaccines*. 2004; 3 (4 Suppl) : S135-49.
50. Giri M, Ugen KE, Weiner DB. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade. *Clinical microbiology reviews*. 2004; 17 (2) : 370-89.
51. Boyer JD, Wang B, Ugen KE, Agadjanyan M, Javadian A, Frost P, et al. In vivo protective anti-HIV immune responses in non-human primates through DNA immunization. *Journal of medical primatology*. 1996; 25 (3) : 242-50.
52. Boyer JD, Ugen KE, Wang B, Agadjanyan M, Gilbert L, Bagarazzi ML, et al. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nature medicine*. 1997; 3 (5) : 526-32.

53. Lu S, Santoro JC, Fuller DH, Haynes JR, Robinson HL. Use of DNAs expressing HIV-1 Env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice. *Virology*. 1995; 209 (1) : 147-54.
54. MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, et al. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *The Journal of infectious diseases*. 1998; 178 (1) : 92-100.
55. Barouch DH, Kunstman J, Kuroda MJ, Schmitz JE, Santra S, Peyerl FW, et al. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 2002; 415 (6869) : 335-9.
56. Barouch DH, Santra S, Schmitz JE, Kuroda MJ, Fu TM, Wagner W, et al. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* (New York, NY. 2000; 290 (5491) : 486-92.
57. Mehra V, Gong JH, Iyer D, Lin Y, Boylen CT, Bloom BR, et al. Immune response to recombinant mycobacterial proteins in patients with tuberculosis infection and disease. *The Journal of infectious diseases*. 1996; 174 (2) : 431-4.
58. Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine*. 1997; 15 (8) : 834-8.
59. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*. 1999; 400 (6741) : 269-71.
60. Skinner MA, Buddle BM, Wedlock DN, Keen D, de Lisle GW, Tascon RE, et al. A DNA prime-Mycobacterium bovis BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. *Infection and immunity*. 2003; 71 (9) : 4901-7.
61. Li H, Li R, Zhong S, Ren H, Zou Y, Chen X, et al. The immunogenicity and protective efficacy of Mtb8.4/hIL-12 chimeric gene vaccine. *Vaccine*. 2006; 24 (9) : 1315-23.

62. Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y, et al. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* (New York, NY. 1998; 282 (5388) : 476-80.
63. Wang R, Richie TL, Baraceros MF, Rahardjo N, Gay T, Banania JG, et al. Boosting of DNA vaccine-elicited gamma interferon responses in humans by exposure to malaria parasites. *Infection and immunity*. 2005; 73 (5) : 2863-72.
64. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999; 189 (1) : 12-9.
65. Lin K, Doolan K, Hung CF, Wu TC. Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *J Formos Med Assoc*. 2010; 109 (1) : 4-24.
66. Oosterhuis K, Ohlschlager P, van den Berg JH, Toebes M, Gomez R, Schumacher TN, et al. Preclinical development of highly effective and safe DNA vaccines directed against HPV 16 E6 and E7. *Int J Cancer*. 2011.
67. Tsen SW, Paik AH, Hung CF, Wu TC. Enhancing DNA vaccine potency by modifying the properties of antigen-presenting cells. *Expert review of vaccines*. 2007; 6 (2) : 227-39.
68. Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995; 772: 30-9.
69. Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nature medicine*. 1997; 3 (8) : 849-54.