Original Article

Designing & producing polytope DNA vaccine containing HBsAg gene for the induction of protective immunity against hepatitis C

Memarnejadian A[1], Roohvand F[1*], Motevalli F[1], Aghasadeghi MR[1]

1-Department of Hepatitis & AIDS, NRGB Lab, Pasteur Institute of Iran

Received December 4, 2008; Accepted December 17, 2009

Abstract:

Background: Considering the immunosuppressive effects and prevalent mutations in some HCV antigens, induction of $CD8^+$ T cell responses is focused on conserved and critical epitopes which as a multi-epitope vaccine can prevent the chronic nature of the disease. **Materials and Methods:** Two immunodominant HLA-A2-restricted human epitopes ($E2_{614-622}$ and $NS3_{1406-1415}$) and two H-2^d-restricted mouse epitopes ($core_{132-142}$ and $E2_{405-414}$) were designed in a sequential tandem, predicted by immunoinformatic analyses. Following the synthesis, related nucleotide sequence was cloned into the pcDNA3.1 vector with and without the fusion of hepatitis B surface antigen (HBsAg). Two constructed plasmids (pcDNA3.1.HPOL and pcDNA3.1.POL, respectively) were evaluated for the protein expression and secretion in Cos-7 cell line. After the vaccination of BALB/c mice (n=6 in each group) with different DNA and peptide immunization regimens, $CD8^+$ T cell activity as well as the type and protective potency of the induced responses were evaluated.
Results: Despite the induction of epitope-specific responses in pcDNA3.1.POL injected mice, the group immunized with pcDNA3.1.HPOL indicated a significant increase in the number and activity of $CD8^+$ T cells ($P<0.05$). Peptide boosting of this group (formulated in two human-compatible adjuvant) still led to the more activation of $CD8^+$ cells, induction of Th1 response and the inhibition of tumor model growth ($P<0.05$).
Conclusion: Fusion of HBsAg as a particle-forming sequence and the source of helper epitopes along the DNA-prime/peptide-boosting immunization regimen are proposed as two promising strategies to improve the CTL multi-epitope vaccines against HCV.

Keywords: Hepatitis C; Vaccines, DNA; Hepatitis B surface antigen; HLA-A0201 antigen; Epitopes

* **Corresponding Author.**
Email: farzin.roohvand@gmail.com
Tel: 0098 21 669 53311
Fax: 0098 21 669 69291

Conflict of Interests: **No**

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, Autumn 2009; Vol 13, No 3, Pages 161-173

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

طراحی و تولید واکسن DNA پلی توپ حاوی ژن HBsAg برای ایجاد ایمنی محافظ علیه ویروس هپاتیت سی

آرش معمارنژادیان [۱]، فرزین روحوند [*۱]، فاطمه متولی [۲]، محمد رضا آقاصادقی [۱]

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به اثر تضعیف کنندگی سیستم ایمنی و موتاسیون‌های شایع در برخی آنتی ژن‌های ویروس هپاتیت سی (HCV)، القاء پاسخ متمرکز سلول‌های +TCD8 بر اپی‌توپ‌های نامتغیر و مهم ویروس در قالب یک واکسن چند اپی توپی می‌تواند مانع از مزمن شدن بیماری گردد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت تجربی صورت گرفت؛ به این ترتیب که دو اپی‌توپ غالب وابسته به HLA-A2 انسانی (شامل $E2_{614-622}$ و $NS3_{1406-1415}$) و دو اپی توپ وابسته به $H\text{-}2^d$ موشی ($E2_{405-414}$ و $core_{132-142}$) در یک ترادف پیش بینی شده توسط آنالیزهای ایمونوانفورماتیکی طراحی شده و توالی نوکلئوتیدی متناظر پس از ساخت به صورت متصل به آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت بی (HBsAg) و نیز جدای از آن در وکتور pcDNA3.1 کلون شد. دو پلاسمید ساخته شده (به ترتیب pcDNA3.1.HPOL و pcDNA3.1.POL) از نظر بیان و ترشح پروتئین در رده سلولی Cos-7 ارزیابی شدند. به دنبال ایمن سازی موش‌های BALB/c (۶ موش در هر گروه) با رژیم‌های مختلف تزریق DNA و پپتید، میزان فعالیت لنفوسیت‌های +TCD8 همچنین نوع و قدرت محافظت پاسخ ایجاد شده، مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت انجام آنالیز آماری از آزمون‌های t و Mann Whitney U و ANOVA استفاده گردید.

نتایج: علی‌رغم ایجاد پاسخ اختصاصی اپی توپ‌ها در موش‌های ایمن شده با پلاسمید pcDNA3.1.POL، گروه دریافت کننده pcDNA3.1.HPOL افزایش معنی داری را در تعداد و فعالیت لنفوسیت‌های +TCD8 نشان داد ($P<0/05$). تزریق یادآور این گروه با پپتید (مخلوط شده با دو اجوانت سازگار در انسان) تقویت بیشتر سلول‌های +CD8، القاء پاسخ Th1 و مهار رشد مدل توموری را به دنبال داشت ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: اتصال HBsAg به عنوان یک توالی سازنده ذره و منبع اپی توپ‌های کمکی در کنار رژیم تزریقی DNA-prime/peptide-boost دو استراتژی امید بخش برای تقویت واکسن‌های CTL چند اپی توپی علیه HCV می باشند.

واژگان کلیدی: هپاتیت سی، واکسن‌های DNA، آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت بی، آنتی ژن HLA-A0201، اپی توپ

۱- استادیار گروه هپاتیت و ایدز انستیتوپاستور ایران

۲- کارشناس ارشد گروه هپاتیت و ایدز انستیتوپاستور ایران

* نویسنده مسوول: فرزین روحوند

آدرس: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز، بانک ژن نوترکیب ایران، کد پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

پست الکترونیک: farzin.roohvand@gmail.com

تلفن: ۵۳۳۱۱ ۶۶۹ ۰۲۱ (داخلی ۲۲۴۱)

دورنویس: ۶۹۲۹۱ ۶۶۹ ۰۲۱

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۱۴

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۸/۶/۲۶

فصلنامه علمی ـ پژوهشی فیض، دوره سیزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، صفحات ۱۷۳-۱۶۱

مقدمه

ویروس هپاتیت C (HCV)، که به عنوان عامل اصلی هپاتیت ویروسی مزمن شناخته می شود، با شیوعی بیش از ٤ برابر عفونت HIV در حدود ۱۲۳ میلیون نفر را در سراسر دنیا آلوده کرده است که از این میان حدود ۸۵-۵۰ درصد از افراد آلوده به هپاتیت مزمن و به دنبال آن پس از چند دهه به سیروز کبد و کارسینومای هپاتوسلولار دچار می شوند [۱]. با توجه به فقدان واکسن پیشگیری کننده و موفقیت ناچیز روش درمانی موجود (تزریق همزمان ریباویرین و اینترفرون α)، تلاش برای دستیابی به واکسن درمانی علیه این عامل ویروسی یک ضرورت اساسی و مهم است [۲]. ژنوم HCV شامل RNA تک رشته‌ای مثبت می‌باشد که سه پروتئین ساختمانی (core، E1 و E2) و شش

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

پروتئین غیر ساختمانی (NS) را کد می‌کند. به دلیل شیوع موتاسیون در ژنوم HCV و ایجاد ژنوتیپ‌ها و زیر گونه‌های متفاوت، آنتی بادی‌های خنثی کننده که علیه نواحی بسیار متغیر گلیکوپروتئین سطحی E2 ایجاد می‌شوند، برای پاکسازی ویروس و جلوگیری از عفونت کافی نمی‌باشند [۳]. در مقابل، مطالعات بالینی نقش موثر ایمنی سلولی را در عفونت‌های حاد خود محدود شونده HCV نشان داده‌اند و البته این پاسخ‌ها در حالت مزمن بیماری، ضعیف یا غیر قابل شناسایی بوده است [۳،۱]. همچنین شواهد حاکی از اهمیت پاسخ لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (CTLs) و ترشح اینترفرون‌γ (IFN-γ) در پاکسازی عفونت HCV می‌باشد [٤،۳،۱]. توانایی واکسن‌های DNA برای تحریک اختصاصی سلول‌های CTL آنها را به عنوان کاندید مناسبی در مقابل عفونت‌های ویروسی مطرح ساخته است [۵]. علی‌رغم اینکه آنتی ژن‌های HCV در مطالعات مختلف به صورت واکسن DNA استفاده شده‌اند [٦]، تاکنون موفقیت چشم‌گیری در جهت ایجاد پاسخ لازم برای محافظت در مقابل ویروس حاصل نشده است. علل این عدم موفقیت را از طرفی می توان در تعداد کم اپی توپ‌های محافظ موجود در یک ناحیه آنتی ژنی جستجو کرد [۸،۷]، که تغییر و موتاسیون در آنها زمینه فرار ویروس از دست سیستم ایمنی را فراهم می‌آورد، و از طرف دیگر می توان آن را ناشی از تضعیف سیستم ایمنی توسط برخی از آنتی ژن‌های HCV دانست که مانع از ایجاد پاسخ مناسب می‌گردند. در این خصوص سرکوب لنفوسیت‌های T، سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و سلول‌های دندریتیک (DC) توسط پروتئین‌های ساختمانی و نیز پروتئین غیر ساختمانی NS3 ویروس به خوبی شناسائی و گزارش شده است [۱۰-۷]. شناسایی اپی‌توپ‌های CTL در پروتئین های مختلف HCV اخیرا امکان طراحی و ساخت واکسن‌های چند اپی توپی را که در آنها اپی‌توپ‌های انتخابی پاتوژن در قالب یک توالی ایمونوژن مصنوعی به صورت خطی و پشت سر هم قرار می‌گیرند، فراهم آورده است. از مزایای این نوع واکسن طراحی مهندسی اپی‌توپ‌ها به منظور افزایش کارائی، تحریک همزمان پاسخ علیه اپی‌توپ‌های بر گرفته از آنتی ژن‌های مختلف، متمرکز ساختن پاسخ ایمنی بر اپی‌توپ‌های مهم و نامتغیر و در نهایت ممانعت از بروز اثرات ناخواسته ناشی از به کار گیری آنتی ژن‌های کامل می‌باشد [۱۲،۱۱]. واکسن‌های پلی توپ در موارد تومورها و بیماری‌های مختلف عفونی [۱۱] و اخیرا با استفاده از اپی توپ‌های برگرفته از پروتئین‌های ساختمانی [۱۳،٤] و غیر ساختمانی HCV [۱۳-۱۵] به کار گرفته شده‌اند. متاسفانه بیان ضعیف پروتئین از جمله محدودیت‌های واکسن‌های DNA می باشد [۵] که عموما مانع از تحریک مناسب سیستم ایمنی می‌گردد. این محدودیت به دلیل ناپایداری پپتیدهای مصنوعی پلی‌توپ و حساسیت آنها به پروتئولیز در مورد واکسن‌های DNA پلی توپ مشهودتر است [۱۷،۱٦،۱٤] و در نتیجه به کارگیری تمهیداتی در جهت افزایش ایمنی‌زایی این نوع واکسن را ضروری می سازد. در این راستا، استراتژی‌های مختلفی مانند واکسیناسیون در قالب ایمونوژن‌های ذره‌ای [۱۹،۱۸] و نیز استفاده از رژیم تزریقی prime/boost [۲۱،۲۰] مورد توجه بوده‌اند. در انواع جدیدی از واکسن‌های DNA با اتصال توالی نوکلئوتیدی آنتی ژن مورد نظر به توالی بیان کننده برخی از پروتئین‌های ساختمانی ویروسی، که قابلیت تشکیل ساختارهای تکراری و ایجاد ذرات شبهه ویروسی (VLP) [۲۲] را دارند، آنتی ژن در داخل سلول به صورت ذره‌ای بیان می شود. مزیت این روش که بنام plasmo-VLP [۱۸] نامیده شده است، بهره‌گیری از سهولت ساخت DNA پلاسمیدی و ایمنی زائی بیشتر ذرات VLP می باشد. آنتی ژن سطحی و آنتی ژن C ویروس هپاتیت بی (HBsAg ,HBcAg)، پروتئین‌های L1 ویروس پاپیلوما و نیز VP2 ویروس پارووِ، از جمله پروتئین‌های ویروسی قادر به تولید ذرات VLP می باشند [۲۲]. هدف از مطالعه حاضر طراحی مهندسی و ساخت واکسن DNA پلی توپ با استفاده از چهار اپی توپ CTL و غالب (Immunodominant) برگرفته از آنتی ژن‌های ساختمانی و غیر ساختمانی HCV می‌باشد. در این تحقیق ضمن اینکه ایجاد پاسخ ایمنی علیه اپی توپ‌های موشی (وابسته به $H\text{-}2^d$) موجود در پلی توپ در موش BALB/c نشان داده می شود، قابلیت ژن HBsAg (به صورت توالی متصل به پلی توپ) و رژیم تزریقی DNA-prime/peptide-boost در افزایش پاسخ ایمنی سلولی و کنترل رشد سلول‌های توموری بیان کننده این پلی توپ نیز به نمایش گذاشته می شود.

مواد و روش‌ها

ساخت و ارزیابی سازه DNA پلی توپ:

ژن بیان کننده توالی مصنوعی پلی توپ متشکل از دو اپی توپ موشی (وابسته به $H2\text{-}D^d$) با نام‌های C (ناحیه ۱٤۲-۱۳۲ پروتئین core، توالی DLMGYIPLVGA) [۲۳] و E_4 (ناحیه ٤۱٤-٤۰۵ پروتئین E_2، توالی SGPSQKIQLV) [۲٤] و دو اپی توپ انسانی (وابسته به HLA-A2.1) با نام‌های E_6 (ناحیه ٦۲۲-٦۱٤ پروتئین E_2، توالی RLWHYPCTI) [۲۵] و N (ناحیه ۱٤۱۵-۱٤۰٦ پروتئین NS_3، توالی KLSGLGLNAV) [۲٦] به طوری که اپی‌توپ‌های مذکور را در ترادف CE_4E_6N بیان کند، طراحی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

و ساخته شد. برای این منظور دو الیگونوکلئوتید ۸۴-۸۰ بازی مرتبط با انتهای ′5 دو رشته مقابل پلی‌توپ (به طول ۱۵۰ باز) که در ۲۱ باز میانی با یکدیگر هم‌پوشانی داشتند، توسط MWG Biotech آلمان ساخته شده و به دنبال همانند سازی و تکمیل ناحیه هم‌پوشان توسط آنزیم *Pfu* پلیمراز توالی کامل ساخته شد. با استفاده از پرایمرهای ′5-taggatccaccatggacctgatgggctac-′3 *Forward*: و ′3-atgaattcttacacggcg-′5 *Reverse*: (محل برش آنزیم‌های محدود الاثر با خط زیر مشخص شده است) توالی پلی توپ CE_4E_6N در یک واکنش PCR تکثیر و به کمک دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI در پلاسمید pcDNA3.1+ (Invitrogen) کلون شد که حاصل آن پلاسمید pcDNA3.1.POL بود (شکل شماره ۱-الف). در قدم بعد با اتصال ژن سازنده پروتئین کوچک سطحی ویروس هپاتیت بی (HBsAg-S، GenBank accession no. X02496: 157-837) به انتهای ′5 ژن CE_4E_6N (با دو آنزیم *Hin*dIII/*Bam*HI) پلاسمید pcDNA3.1.HPOL (بیان کننده پروتئین هیبرید HBs-CE_4E_6N) ساخته شد (شکل شماره ۱-ب). پلاسمید pcDNA3.1.HBs که تنها حاوی ژن HBsAg-S بود نیز به عنوان کنترل ساخته شد. پلاسمیدهای مذکور پس از تائید صحت توالی با استفاده از ستون‌های Endotoxin-free NucleoBond® PC 10000 columns (Macherey-Nagel, Germany) تخلیص شده و برای ایمن سازی استفاده شدند. پس از ترانسفکشن موقت سلول‌های Cos-7 بیان پلاسمیدها با ارزیابی لیزات سلولی به روش‌های وسترن بلات، ایمونوفلورسانس، RT-PCR و دات بلات و قابلیت تشکیل ذره با ارزیابی مایع روئی کشت سلول‌ها به روش الایزا صورت گرفت. سوپ کشت سلول‌ها ابتدا با کمک لوله‌های تغلیظ کننده Vivaspin با cut off 3000 (Sartorius, Germany) تا ۱۰ برابر تغلیظ شده و سپس میزان HBsAg آنها با استفاده از کیت تجاری Hepanostika (Biomérieux, France) اندازه گیری شد. در این آزمایش به منظور یکسان سازی میزان ترانسفکشن سلول‌ها بر اساس روش گزارش شده [۲۷] از ترانسفکشن همزمان پلاسمید pcDNA/*LacZ* با پلاسمیدهای مورد مطالعه و اندازه گیری آنزیم بتا گالاکتوزیداز در لیزات سلول‌ها استفاده شد. پس از اعمال ضریب یکسان سازی، میزان ترشح ذرات HBs-CE_4E_6N در مقایسه با میزان ترشح HBsAg طبیعی (از سلول‌های ترانسفکته با pcDNA3.1.HBs) به صورت درصد محاسبه شد. در این حالت سلول‌های Cos-7 ترانسفکت شده با pcDNA3.1+ به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

پپتیدهای سنتتیک:

پپتیدهای متناظر با اپی توپ‌های C، E_4، پلی توپ CE_4E_6N (حاوی ترادف خطی چهار اپی توپ ارائه شده در شکل شماره ۱-الف) و اپی توپ غیر مرتبط کنترل (ناحیه ۲۵-۱۶ پروتئین core با توالی NRRPQDVKFP) با روش شیمیائی فاز جامد Fmoc در انستیتو بیوشیمی دانشگاه لوزان سوئیس ساخته و با خلوص ۹۷ درصد تهیه شدند.

تهیه مدل توموری بیان کننده پلی توپ:

سلول‌های CT26 که رده سلولی تهیه شده از کارسینومای کلون موش ($H\text{-}2^d$) می باشند، به کمک کیت Lipofectamine LTX (Invitrogen) با پلاسمید pcDNA3.1.POL (حاوی ژن مقاومت به آنتی بیوتیک Geneticin) به صورت پایدار ترانسفکت شده، به مدت ۲ ماه تحت اثر Geneticin (۸۰۰ µg/ml) کشت داده شده و سرانجام تک کلون‌های به دست آمده با روش limiting dilution به وسیله RT-PCR و با استفاده از پرایمرهای ′5-taggatccaccatggacctgatgggctac-′3 و ′3-atgaattcttacacggcg-′5 از نظر بیان ژن CE_4E_6N مورد ارزیابی قرار گرفتند (نتایج نشان داده نشده است).

ایمن سازی موش‌ها:

موش‌های BALB/c ($H\text{-}2^d$) ماده با وزن تقریبی ۲۰ g و سن ۸-۶ هفته از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه شده و مطابق با دستورالعمل‌های کار با حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفتند. گروه‌های حاوی ۶ موش به صورت زیر جلدی یا در ناحیه کف پا توسط ۱۰۰ µg DNA پلاسمیدی (pcDNA3.1.POL یا pcDNA3.1.HPOL) در هفته‌های ۰، ۳ و ۶ و یا در ناحیه قاعده دم توسط ۵۰ µg پپتید سنتتیک CE_4E_6N که با دو اجوانت قابل استفاده در انسان (۵۰ µg از CpG 1826 و ۷۰ درصد از Montanide ISA 720) [۲۸] مخلوط شده بود، در روزهای ۰، ۱۰ و ۲۰ ایمن شدند. ایمن سازی DNA-prime/peptide-boost با انجام دو تزریق DNA و یک تزریق یادآور پپتید (همانند توضیحات فوق) در فواصل زمانی ۳ هفته انجام شد. موش‌های غیر ایمن و نیز گروه‌های تزریق شده با پلاسمیدهای کنترل (pcDNA3.1+ و pcDNA3.1.HBs) به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

جداسازی سلول‌های طحال:

دو هفته پس از آخرین تزریق، طحال موش‌های متعلق به هر گروه با هم مخلوط شده و در هموژنایزر خورد شدند. بعد از حذف گلبول‌های قرمز با محلول ۰/۸۴ درصد NH_4Cl، سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 کامل (غنی شده با ۱۰ درصد

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

FBS، mM ۲ ال-گلوتامین، mg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین و U/ml ۱۰۰ پنی سیلین) شستشو داده شده و به حالت معلق درآمدند.

ارزیابی سلول‌های CTL:

به منظور ارزیابی قابلیت کشندگی سلول‌های CTL ایجاد شده علیه اپی‌توپ‌های وابسته به $H\text{-}2^d$، سلول‌های جدا شده از طحال موش‌های واکسینه با غلظت ۲×۱۰^۶ cells/ml در محیط RPMI 1640 کامل حاوی μM ۵۰ ترکیب 2-ME کشت داده شده و برای مدت ٤ روز در مجاورت μg/ml ۱۰ از هریک از پپتیدهای C و E_4 در دمای ۳۷ °C و CO2 ۵ درصد تحریک شدند. با افزودن U/ml ۱۰ از اینترلوکین ۲ (IL2) نوترکیب (Cedarlane, Canada) و ادامه دادن کشت، در روز هشتم سلول‌ها با سانتریفوژ جدا شده و به عنوان Effector در واکنش اندازه گیری آنزیم LDH به کار گرفته شدند [۲۸]. به طور خلاصه ۶×۱۰^۳ سلول هدف (Target) P815 (وابسته به $H\text{-}2^d$) که قبلا با یکی از پپتیدهای C، E_4 و یا پپتید کنترل غیر مرتبط مجاور شده بودند، به علاوه سلول‌های Effector به نسبت‌های مختلف E:T (شامل ۵۰:۱، ۲۵:۱ و ۱۲/۵:۱) در چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه تقسیم شدند. پس از ٦ ساعت نگهداری در ۳۷ °C میزان LDH در مایع روئی سلول‌ها با استفاده از کیت Cytotox 96 (Promega) اندازه گیری و در صد لیز اختصاصی طبق روش کیت محاسبه شد.

ارزیابی ترشح سایتوکاین‌ها:

سلول‌های جدا شده از مخلوط طحال موش‌ها در یک گروه (۲×۱۰^۶) با پپتید سنتتیک CE_4E_6N (μM ۱۰) به مدت ۷۲ ساعت در ۳۷ °C تحریک شده و پس از این زمان مایع روئی از نظر میزان اینترلوکین ٤ (IL4) و IFN-γ با روش الایزا (U-CyTech, Netherlands) ارزیابی شد.

تست ELISpot:

با استفاده از کیت IFN-γ ELISpot (MabTech, Sweden) سلول‌های طحال که در مقابل اپی توپ های موشی توانائی ترشح اختصاصی IFN-γ را داشتند، به صورت برون تنی و مطابق با دستورالعمل کیت شمارش شدند. به طور خلاصه ۲×۱۰^۵ سلول طحال به همراه U/ml ۱۰ از IL2 نوترکیب و μM ۱۰ از پپتیدهای C یا E_4 یا کنترل به مدت ٤۰ ساعت در چاهک‌های پوشیده شده با آنتی بادی موشی ضد IFN-γ در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. پس از شستشو، چاهک‌ها با μg/ml ۱ آنتی بادی ثانویه کنژوگه با بیوتین (anti-mouse IFN-γ-biotin Ab) به مدت ۲ ساعت و به دنبال آن با استرپت آویدین نشاندار با آنزیم HRP به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. در انتها، پس از افزودن سوبسترای رنگزای TMB نقاط رنگی ظاهر شده (SFC) با کمک میکروسکوپ تشریح شمارش شدند.

چالش موش‌ها با مدل توموری:

سه هفته پس از آخرین تزریق واکسن، ۲×۱۰^۵ سلول توموری (CT26/*polytope*) در حجم μl ۱۰۰ سرم فیزیولوژی به صورت زیر جلدی به پهلوی راست موش‌های واکسینه و غیر واکسینه تزریق شدند. در ادامه تومورهای ایجاد شده سه بار در هفته بوسیله کولیس اندازه گیری شده و حجم تومورها با فرمول طول × عرض × (طول + عرض) تقسیم بر ۲ به دست آمد. موش‌های غیر ایمن و گروهی که دو تزریق پلاسمید pcDNA3.1.HBs و یک تزریق یادآور پپتیدی را دریافت کرده بود، نیز به ترتیب به منظور کنترل رشد تومور و ارزیابی نقش پلاسمید pcDNA3.1.HPOL در تحریک اولیه ایمنی با سلول‌های توموری تزریق شدند.

مطالعات آماری:

کلیه آزمایشات به صورت سه گانه (triplicate) انجام شده و در برخی موارد در سه نوبت تکرار شدند. تفاوت درصد لیز سلول‌ها، سطح ترشح سایتوکاین‌ها، تعداد سلول‌های ترشح کننده اینترفرون و حجم تومور در بین گروه‌های مختلف به کمک نرم افزار GraphPad Prism 4.0 و با آزمون‌های t، Mann-Whitney U یا ANOVA ارزیابی شده و موارد با امکان $p<$ ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

ساخت و آنالیز DNA پلی توپ:

ملاک انتخاب اپی توپ‌های به کار گرفته شده در این تحقیق علاوه بر ایمنی زائی آنها در افراد آلوده به HCV، عبارت بود از یکسان بودن نسبی تمایل اتصال آنها به آلل‌های HLA-A2.1 و $H\text{-}2^d$ (به منظور جلوگیری از پدیده ایمونودومینانس [۲۹])، تشابه توالی اسیدآمینه‌ای آنها در سویه‌های شایع و مقاوم به درمان HCV 1a و 1b) و ارتباط ترجیحی آنها با پاکسازی ویروس [۲٦،۲۳]. به منظور فراهم شدن امکان بررسی پاسخ ایمنی سلولی در حیوان معمول آزمایشگاهی (موش BALB/c) طراحی دو اپی توپ C و E_4 (وابسته به $H2\text{-}D^d$) در کنار اپی توپ‌های انسانی E_6 و N (وابسته به HLA-A2.1) مد نظر قرار گرفت. محل قرار گیری اپی‌توپ‌ها در رشته پلی توپ بر اساس آنالیزهای ایمونوانفورماتیک و با استفاده از الگوریتم های کامپیوتری برنامه-های Rankpep (http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP/) و PAProC (http://paproc.de) که به ترتیب اپی توپ‌های متصل شونده به آلل‌های MHC و محل برش پروتنازوم را

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

شناسائی می‌کنند، صورت گرفت. در این حالت ترادف اپی‌توپ‌ها طوری در نظر گرفته شد که باعث ایجاد کمترین اپی‌توپ‌های بینابینی در محل اتصال هر دو اپی توپ مورد نظر گردد [۱۲]. توالی اسیدآمینه‌ای مربوط به پلی توپ CE_4E_6N در مرحله بعد با توجه به جدول فراوانی کدون‌های مورد استفاده در سلول‌های جانوری [۳۰] به توالی نوکلئوتیدی ترجمه شد. به منظور افزایش بیان، توالی Kozak [۵] نیز به ابتدای ژن پلی توپ افزوده شده و در نهایت کلون کردن توالی نوکلئوتیدی مربوطه در فرودست پروموتر hCMV/IE در ناقل pcDNA3.1+ بیان پپتید ۴۰ اسید آمینه ای CE_4E_6N را توسط پلاسمید pcDNA3.1.POL فراهم آورد (شکل شماره ۱-الف). همچنین از اتصال ژن HBsAg به انتهای ′5 توالی CE_4E_6N پلاسمید pcDNA3.1.HPOL که بیان پروتئین هیبرید HBs-CE_4E_6N را با ۲۶۸ اسید آمینه موجب می‌شد، به دست آمد (شکل شماره ۱-ب). پس از تائید صحت توالی، پلاسمیدهای ساخته شده به داخل سلول‌های Cos-7 ترانسفکت شده و بیان پپتیدهای متناظر با روش‌های وسترن بلات و ایمونوفلورسانس (در مورد pcDNA3.1.HPOL) و نیز RT-PCR و دات بلات (در مورد pcDNA3.1.POL) بررسی شد (نتایج نشان داده نشده است). لازم به ذکر است که علت عدم استفاده از روش‌های وسترن بلات و ایمونوفلوئورسانس جهت pcDNA3.1.POL محدودیت انجام وسترن بلات به دلیل اندازه کوچک پپتید پلی توپ بیان شده (۴۰ اسید آمینه) و نیز فقدان آنتی بادی مونوکلونال تجاری علیه آن بود. همچنین مطابق با گزارشات قبلی [۳۲،۳۱] تشکیل و ترشح ذرات HBs-CE_4E_6N از سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDNA3.1.HPOL با استفاده از روش الایزا به صورت غیر مستقیم نشان داده شد. همان‌طور که در شکل شماره ۱-ج مشاهده می شود، ذرات هیبرید HBs-CE_4E_6N اگرچه در مقایسه با ذرات HBsAg طبیعی به مقدار کمتر (حدود ۳۰ درصد) ترشح شده‌اند، اما در هر حال ترشح آنها به محیط کشت با روش به کار گرفته شده قابل اندازه گیری بوده است. در این آزمایش فقدان ذرات در سوپ سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1+ حاکی از اختصاصی بودن روش بود.

ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی در موش‌های واکسینه:

بدین منظور دو روش CTL assay و IFN-γ ELISpot به کار گرفته شدند. نتایج سیتوتوکسیسیته در گروه‌های واکسینه (شکل شماره ۲- الف و ب) نه تنها حاکی از افزایش معنی دار لیز سلول‌های هدف P815 در مقایسه با گروه‌های کنترل (شکل شماره ۲- ج و د) بود، بلکه برتری پاسخ CTL ایجاد شده را در موش‌های ایمونیزه با pcDNA3.1.HPOL در مقایسه با گروه ایمونیزه با pcDNA3.1.POL نیز نشان داد (میزان لیز اختصاصی ۲۵ درصد در شکل شماره ۲- ب در مقابل ٦ درصد در شکل شماره ۲- الف، $p<0/05$). نتایج ELISpot نیز به طور مشابه تفاوت معنی‌داری را در تعداد سلول‌های ترشح کننده IFN-γ در گروه‌های واکسینه و کنترل نشان داد که همچنان در گروه واکسینه با پلاسمید pcDNA3.1.HPOL بیشتر از گروه دریافت کننده پلاسمید pcDNA3.1.POL بود (شکل شماره ۳- الف و جدول شماره ۱). در هر دو روش فقدان پاسخ قابل اندازه گیری در مقابل پپتید غیر مرتبط ($core_{16-25}$)، اختصاصی بودن پاسخ های ایجاد شده علیه پپتیدهای C، E_4 و CE_4E_6N را نشان داد (شکل شماره ۲- الف و ب، شکل شماره ۳- الف). همان‌طور که در شکل شماره ۳- الف نشان داده شده است مجاورت سلول‌های طحال موش‌های واکسینه با پپتید پلی توپ CE_4E_6N تعداد بیشتری سلول‌های ترشح کننده IFN-γ (SFC) را در مقایسه با سلول‌های تحریک شده با پپتیدهای اپی توپی C و E_4 ایجاد کرد که این امر می‌تواند به دلیل تحریک همزمان لنفوسیت‌های +CD8 و +CD4 توسط پپتید طویل CE_4E_6N باشد و این در حالی است که سلول‌های +CD8 تنها منبع ترشح IFN-γ در هنگام تحریک با پپتیدهای اپی توپی ۱۲-۹ اسید آمینه‌ای هستند [۳۳،۳۱]. لازم به ذکر است که مشاهده القاء پاسخ ایمنی خود تائید کننده بیان پلاسمیدهای ساخته شده می باشد.

ارزیابی پاسخ ناشی از ایمن سازی به روش DNA-prime/peptide-boost:

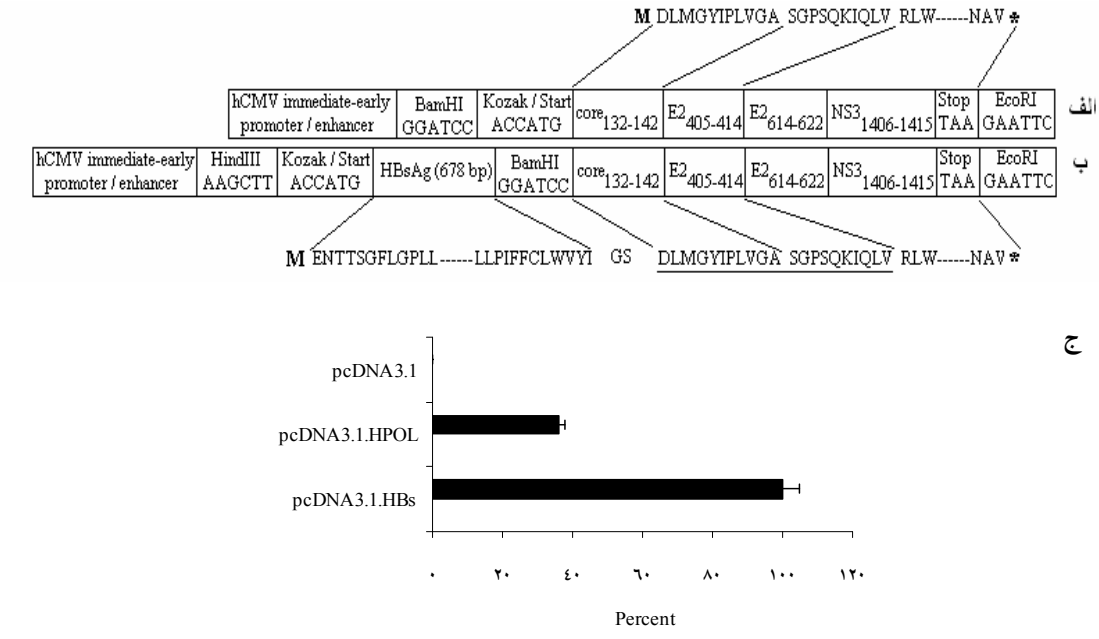
به دنبال القاء پاسخ قوی سلول‌های +CD8 توسط پلاسمید pcDNA3.1.HPOL، کیفیت و کمیت پاسخ ایمنی ایجاد شده در اثر تزریق این پلاسمید و پپتید سنتتیک CE_4E_6N به صورت رژیم‌های مختلف prime/boost نیز بررسی شد. همانطور که در شکل شماره ۳ و جدول شماره ۱ نشان داده شده است، سلول‌های طحال موش‌های واکسینه با پپتید CE_4E_6N (مخلوط شده با اجوانت های CpG و M720) در مقایسه با گروه دریافت کننده DNA (pcDNA3.1.HPOL) به دنبال تحریک درون تنی، توانائی القاء تعداد بیشتر سلول‌های ترشح کننده IFN- γ را داشته (شکل شماره ۳- ب) و میزان IFN-γ و IL4 (به ترتیب به عنوان دو سایتوکاین شاخص پاسخ‌های Th1 و Th2) بیشتری را نیز به محیط کشت ترشح کردند (نسبت IFN-γ/IL4 تقریبا ۱) (شکل شماره ۳- ج). با این وجود تعداد کمتر SFC ایجاد شده در مجاورت پپتیدهای اپی توپی C و E_4 نشانه پاسخ اختصاصی ضعیف علیه اپی توپ‌های CTL گنجانده شده در این گروه بود. در مقابل موش‌های دریافت کننده DNA سلول‌های +CD8

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

اختصاصی اپی‌توپ‌ها و پاسخ قوی Th1 را نشان دادند که با ترشح IFN-γ و تولید مقادیر ناچیز IL4 در مقابل پپتید CE_4E_6N (نسبت IFN-γ/IL4 تقریبا ۲۸:۱) مشخص گشت (شکل شماره ۳- ب و ج). نکته جالب توجه این بود که در گروه دریافت کننده DNA که با رژیم DNA-prime/peptide-boost توسط پپتید نیز تزریق شده بودند، هم تعداد SFC اختصاصی اپی‌توپ‌ها به طور معنی داری بالاتر از دو گروه ایمن شده به صورت تک رژیمی (DNA یا پپتید تنها) بود و هم شاخص نسبت IFN-γ/IL4 (تقریبا ۳:۱) نشان دهنده تورش پاسخ به سمت Th1 بود (شکل شماره ۳- ب و ج).

جدول شماره ۱- نتایج و ارزیابی های آماری گروه‌های مختلف واکسینه شده

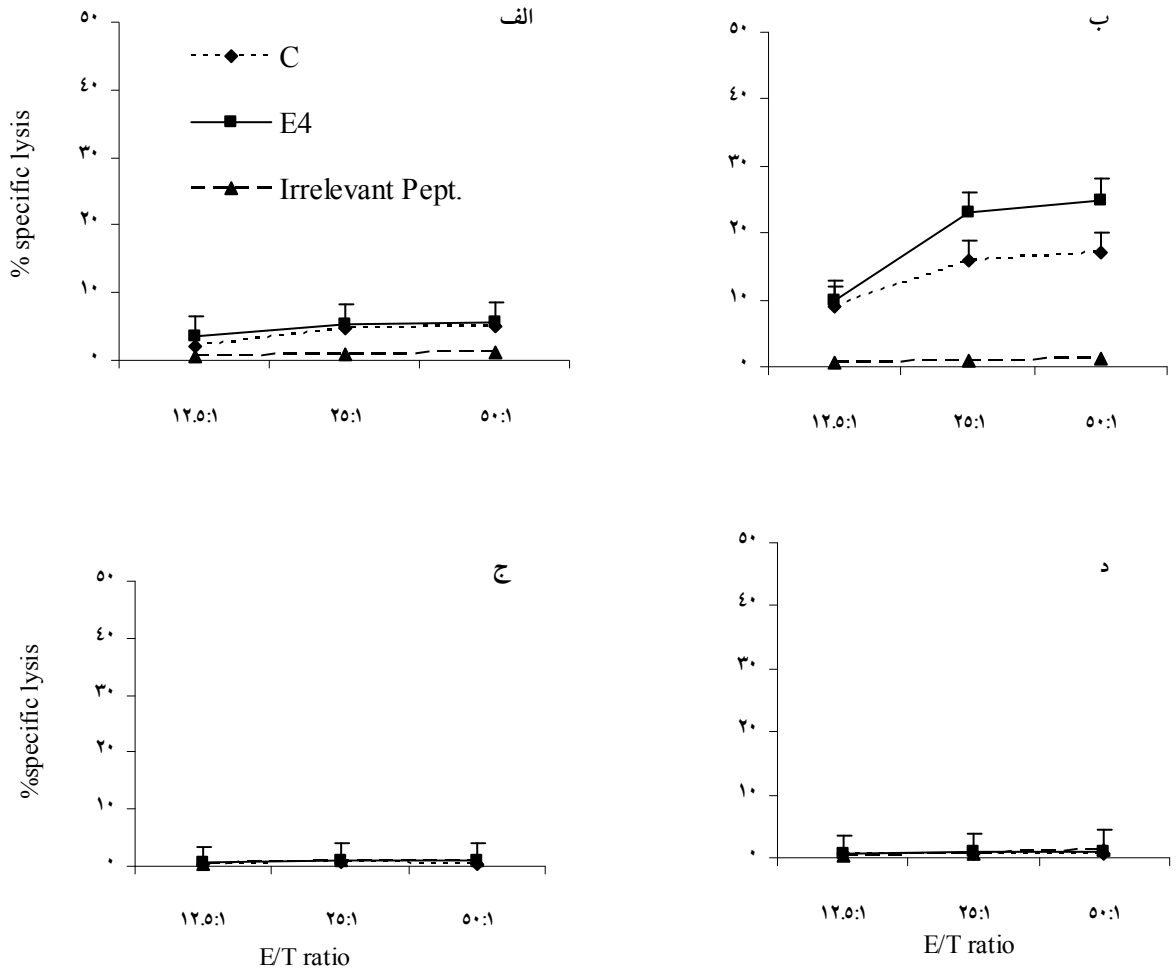
گروه‌های آزمایش	ELISpot assay (E_4 epitope)		ELISpot assay (E_4 epitope)		Tumor challenge (day 26)	
	$\overline{X} \pm SD$	P	$\overline{X} \pm SD$	P علیه NI	$\overline{X} \pm SD$	P علیه NI
NI	–		۱۷۳۰±۱۹۹			
pcDNA3.1	۳/۲±۱/۷	pcDNA3.1.POL pcDNA3.1.HPOL (t-test) ۰/۰۲	–	–	–	–
pcDNA3.1.POL	٤٦/۷±۷/٤		۱٤٤۰±۲۲۹	۰/۱۱۱۱		
pcDNA3.1.HBs	۳/۷±۲/۵		۱٦۲۲±۱۹٦	۰/۳٤		
pcDNA3.1.HPOL	۱۳۰±۸/٤		۱۱۸۳±۷۹/۹	۰/۰۱٦		
DNA	۱۳۳±۱۲/۲	۰/۰۰۱ (ANOVA)	۵۷/٦±٤	۰/۰۰۱	–	–
DNA/Pept.	٦۰۳±٤٤/۹		۲۱۲/٦±۱۳			
Pept.	۵۵±۹/۸		۱۵۱±۱۷			



شکل شماره ۱- شکل شماتیک توالی پلی توپ کلون شده در فرودست پروموتر hCMV IE پلاسمید +pcDNA3.1 به صورت غیر متصل (الف) و متصل (ب) به آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت بی (HBsAg). توالی و محل برش آنزیم‌های *Hin*dIII، HI *Bam*HI و RI*Eco*، همچنین توالی-های مربوط به Kozak، شروع (ATG) و ختم (TAA) ترجمه مشخص شده اند. ترتیب قرار گیری اپی توپ‌های گنجانده شده در سازه پلی توپ (نواحی مشخص شده از آنتی ژن‌های core، E2 و NS3) به علاوه توالی اسید آمینه‌ای آنها (در مورد اپی توپ‌های $E2_{614-622}$ و NS3 و توالی HBsAg تنها ابتدا و انتها) نشان داده شده است. (ج) ارزیابی درصد ترشح HBsAg در محیط کشت سلول‌های Cos-7 ترانسفکت شده با پلاسمیدهای pcDNA3.1.HBs (بیان کننده HBsAg طبیعی)، pcDNA3.1.HPOL (بیان کننده هیبرید HBs-CE_4E_6N) و pcDNA3.1 (به عنوان کنترل) به وسیله الایزا، ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن. نتایج میانگین سه ترانسفکشن مختلف ± انحراف معیار را نشان می‌دهد.

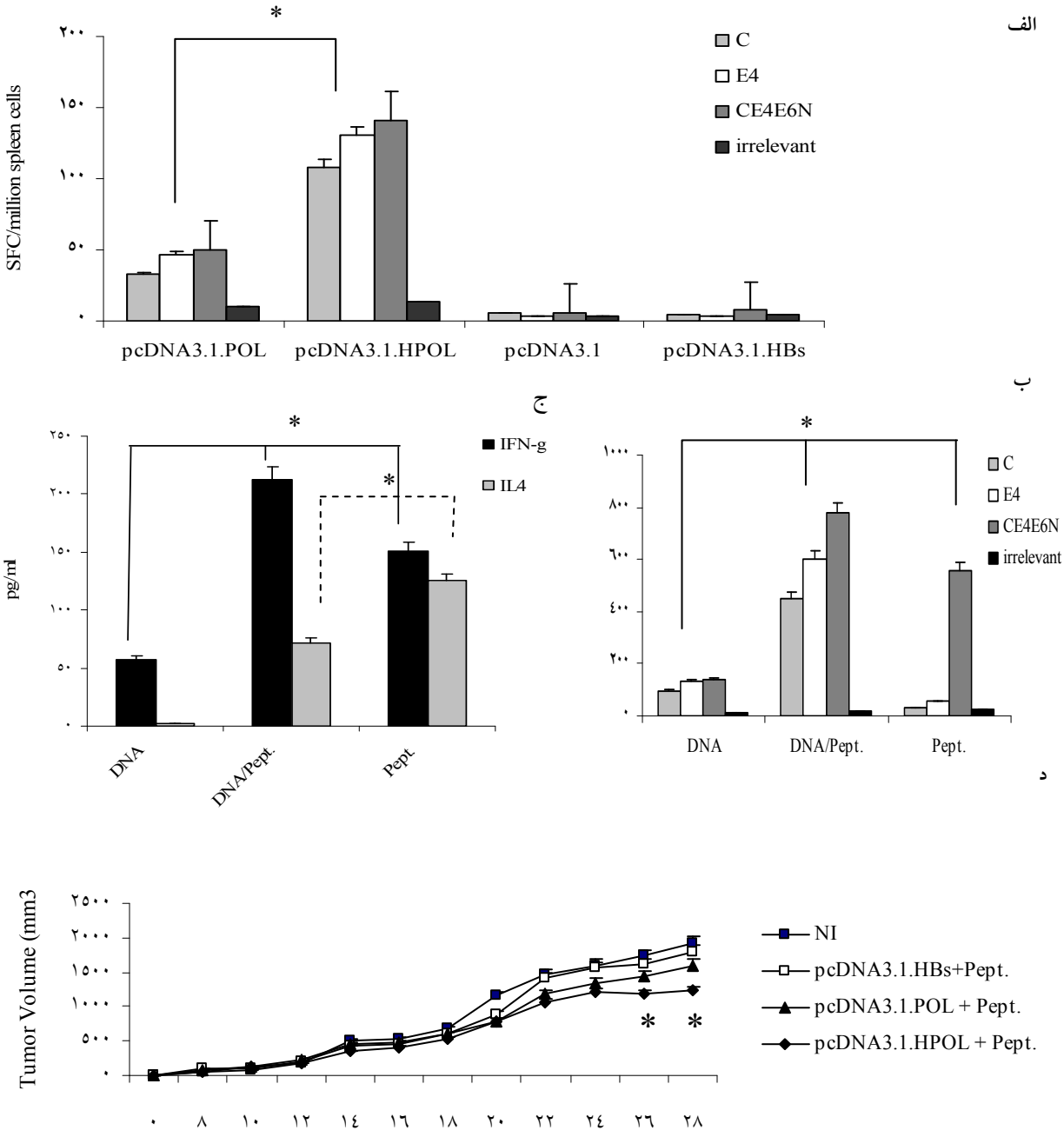
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

بررسی پاسخ محافظ در برابر چالش با مدل توموری:
چالش حیوان واکسینه با ویروس با سلول‌های توموری بیان کننده آنتی ژن‌های واکسن روش استاندارد بررسی ایمنی محافظ در تحقیقات واکسن است [۳٤]. با این هدف سلول‌های توموری بیان کننده پپتید CE_4E_6N به موش‌های ایمن شده به روش prime/boost (که در ارزیابی‌های ایمونولوژیک پاسخ قوی‌تری را ایجاد کرده بودند) تزریق شدند. همان‌طور که از شکل شماره ۳- د بر می‌آید، موش‌های دریافت کننده پلاسمید pcDNA3.1.POL (به عنوان DNA) اگرچه پپتید یادآور را نیز دریافت کردند، همانند گروه واکسینه نشده، قادر به ایجاد پاسخ محافظ و کنترل رشد سلول‌های *CT26/polytope* نبودند. نکته جالب آن که در گروه ایمن شده با pcDNA3.1.HBs (به عنوان DNA) نیز با وجود دریافت پپتید CE_4E_6N تغییرمعنی داری در میزان رشد سلول‌های توموری دیده نشد. در کمال تعجب اگرچه موش‌های تزریق شده با پلاسمید pcDNA3.1.HPOL پس از دریافت پپتید نتوانستند به طور کامل سلول‌های توموری را مهار کنند، اما در مقایسه با گروه‌های کنترل غیر واکسینه و دریافت کننده pcDNA3.1.HBs در روز ۲٦ پس از ترزیق رشد آنها را به طور معنی‌داری کاهش دادند (شکل شماره ۳- د و جدول شماره ۱، طبق آزمون آماری Mann-Whitney، P=۰/۰۱۵).



شکل شماره ۲- القاء لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک اختصاصی اپی توپ‌ها بوسیله پلاسمیدهای پلی توپ. مخلوط سلول‌های طحال گروه‌های موشی ایمن شده (هر گروه ٦ عدد) با پلاسمیدهای pcDNA3.1.POL (الف)، pcDNA3.1.HPOL (ب)، pcDNA3.1 (ج) و pcDNA3.1.HBs (د) در آزمایشگاه با پپتیدهای اپی توپی (C و E_4) برای مدت ۸ روز تحریک شده و پس از شستشو توانائی آنها برای لیز اختصاصی سلول‌های هدف P815 که قبلا با یکی از پپتیدهای C، E_4 و یا یک پپتید غیر مرتبط (irrelevant Pept.) مجاور شده بودند، با استفاده از کیت تجاری Cytotox96 و اندازه گیری آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH)، در نسبت‌های مختلف سلول‌های طحال به هدف (E:T) به صورت سه گانه (triplicate) بررسی شد. نقاط، میانگین LDH آزاد شده در سه چاهک ± انحراف معیار را نشان می‌دهند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]



شکل شماره ۳- ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی در موش‌های ایمن شده با پلی توپ. (الف) سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده با پلاسمیدهای pcDNA3.1.POL، pcDNA3.1.HPOL یا پلاسمیدهای کنترل (pcDNA3.1 و pcDNA3.1.HBs) با پپتیدهای اپی توپی (C و E_4) یا پپتید پلی توپ CE_4E_6N و یا پپتید غیر مرتبط به طور جداگانه تحریک شده و تعداد سلول‌های ترشح کننده IFN-γ (SFCs) در آزمون ELISpot شمارش شدند. (ب) گروه‌های موشی در سه رژیم مختلف توسط پلاسمید pcDNA3.1.HPOL (DNA) یا پپتید CE_4E_6N مخلوط با اجوانت (CpG + M720) (Pept.) و یا ترکیب این دو (DNA/Pept.) ایمن شده و تعداد SFC به روش ELISpot شمارش شد. (ج) سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده در سه رژیم (نمودار ب) با پپتید CE_4E_6N در آزمایشگاه تحریک شده و میزان IFN-γ و IL4 ترشح شده به محیط با روش الایزا اندازه گیری شد. (د) موش‌های غیر ایمن (NI) یا ایمن شده با دو تزریق DNA و یک یادآور پپتید CE_4E_6N مخلوط با اجوانت (CpG + M720) تعداد ۲×۱۰^۵ سلول توموری CT26 بیان کننده CE_4E_6N را به صورت زیر جلدی دریافت کردند. اندازه گیری حجم تومور ایجاد شده ۲۶ روز پس از تزریق کاهش معنی دار رشد سلول‌های توموری را در گروه ایمن شده با pcDNA3.1.HPOL در مقایسه با گروه کنترل غیر ایمن نشان می دهد. نمودارهای "الف"، "ب" و "ج" میانگین ± خطای استاندارد مربوط به شمارش سه چاهک و نمودار "د" میانگین ± خطای استاندارد مربوط به اندازه تومور در موش‌های هر گروه را نشان داده و * مبین تفاوت معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بین گروه‌ها است.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

بحث

واکسن‌های DNA علی‌رغم توانائی تحریک سلول‌های T CD8+، برخلاف ناقلین ویروسی به دلیل فقدان قابلیت تکثیر و میزان بیان محدود پروتئین موفقیت چشم‌گیری را کسب نکرده‌اند. استفاده از توالی‌های سازنده VLP به صورت فیوژن با آنتی ژن‌ها و اعمال رژیم‌های مختلف واکسیناسیون می‌توانند به عنوان استراتژی‌های با ارزشی در راستای افزایش ایمنی زائی واکسن‌های DNA مطرح باشند. به تازگی توانائی القاء پاسخ CTL علیه دو اپی توپ HCV ($core_{133-142}$ و $E1_{315-322}$) در غیاب اپی توپ‌های کمکی CD4+ و در قالب واکسیناسیون با یک DNA پلی توپ نشان داده شده است [٤]. در این مطالعه علی‌رغم اینکه پتانسیل واکسن طراحی شده در برانگیختن پاسخ اختصاصی اپی‌توپ‌ها نشان داده شد، ولی پاسخ ایجاد شده از کارائی مورد انتظار برخوردار نبوده است. با توجه به مزایای بالقوه واکسن‌های DNA پلی توپ و ضرورت افزایش ایمنی زائی این نوع واکسن، در تحقیق حاضر سعی شد که با اتصال توالی VLP ساز HBsAg و انجام تزریقات به شیوه prime/boost ایمنی زائی واکسن DNA پلی توپ طراحی شده با استفاده از چهار اپی توپ غالب HCV افزایش یافته و کمیت و کیفیت پاسخ های ایجاد شده در موش BALB/c مورد ارزیابی قرار گیرد. نتایج بررسی‌های درون تنی در این تحقیق نشان داد که پروتئین بیان شده توسط پلاسمید pcDNA3.1.HPOL (شامل اتصال HBsAg و پپتید پلی توپ) احتمالا توانائی تشکیل خود به خود ذرات شبه ویروسی و ترشح به محیط کشت را همانند ذرات HBsAg طبیعی ولی به میزان کمتر حفظ کرده است. در هر حال اطمینان قطعی از شکل گیری ذرات شبه ویروسی در این تحقیق نیازمند به کارگیری میکروسکوپ الکترونی و مشاهده این ذرات در مایع روئی سلول‌های ترانسفکت شده است. در عین حال نتایج ارزیابی های ایمونولوژیک واکسیناسیون با این پلاسمید به وضوح برتری آن را در مقایسه با پلاسمید فاقد ژن HBsAg (pcDNA3.1.POL) در جهت فعال کردن سلول‌های T CD8+ اختصاصی اپی‌توپ‌ها نشان داد. از آنجا که ارزیابی نیمه کمی بیان دو پلاسمید pcDNA3.1.HPOL و pcDNA3.1.POL با روش semiquantitative RT-PCR [٢٠] تفاوت قابل توجهی را در میزان بیان این دو پلاسمید نشان نداده بود (نتایج ارائه نشده است)، احتمال این که افزایش پاسخ مشاهده شده ناشی از افزایش بیان پروتئین بوده باشد، منتفی است. در عوض این تفاوت معنی‌دار در ایمنی زائی می‌تواند ناشی از ساخت و ترشح ذرات باشد که جذب بهتر آنها را توسط سلول‌های حرفه‌ای عرضه کننده آنتی ژن (APC) به دنبال داشته [٣٥] و در مقایسه با پروتئین‌های متصل به غشاء یا داخل سلول موجب القاء قوی‌تر ایمنی سلولی و هومورال می گردد [٣٦]. در حقیقت طبیعت ذره‌ای آنتی ژن ترشح شده، امکان عرضه آن را نه تنها از طریق مولکول‌های MHC-II به سلول‌های T CD4+ بلکه از طریق MHC-I و مسیر cross priming به سلول‌های T CD8+ نیز فراهم می کند [٣٥،٢٢]. علاوه بر این حضور اپی‌توپ‌های کمکی سلول‌های T و بیان طولانی مدت پروتئین از جمله دیگر مکانسیم‌های کمکی HBsAg به عنوان یک ناقل ایمنی زائی محسوب می شوند [٣٥،٣١]. در مطالعات قبل نشان داده شده بود که اتصال توالی‌های طولانی به انتهای آمینی و یا ناحیه هیدروفیل لوپ خارجی HBsAg می‌تواند منجر به کاهش قابلیت ترشح پروتئین گردد [٣٧،٣٥]. به علاوه علی‌رغم اینکه اتصال توالی‌های ٣٦ [٣٥] و ٩٨ [٣١] اسید آمینه‌ای در گزارشات قبلی همچنان باعث حفظ توانائی ترشح HBsAg شده بودند، در تحقیق حاضر میزان ترشح ذرات به دنبال افزودن توالی پلی توپ ٤٠ اسید آمینه ای به انتهای کربوکسیل پروتئین به میزان قابل توجهی از ترشح آن کاست (شکل شماره ١- ب). مقایسه نتایج این تحقیق با گزارشات مذکور این نکته را مطرح می سازد که ترکیب اسیدآمینه‌ای قطعه افزوده شده و سازگاری آن با مولکول HBsAg می‌تواند در مقایسه با طول یا محل اتصال از اهمیت بیشتری برخوردار باشد. استفاده از DNA و پپتید تحت رژیم تزریقی prime/boost به عنوان یکی از روش‌های افزایش پاسخ ایمنی در واکسیناسیون مطرح می باشد [٢١]. تزریق واکسن پلی توپ طراحی شده در این تحقیق به صورت پپتید مخلوط شده با اجوانت نشان دهنده ایجاد پاسخ متعادل Th1 و Th2 در موش‌های واکسینه شده بود. اگرچه چنین پاسخ دوگانه‌ای می‌تواند به عنوان یکی از مزایای واکسن محسوب شود، اما با توجه به اینکه پپتید پلی توپ CE_4E_6N با ترادف طراحی شده در طبیعت وجود ندارد، تنها پاسخ‌های Th1 اختصاصی علیه اپی‌توپ‌های CTL موجود در این توالی دارای اهمیت می باشند و ایمنی هومورال مشتق از پاسخ‌های Th2 علیه پپتید کامل نه تنها مد نظر نیستند، بلکه ممکن است بر شدت و کیفیت پاسخ‌های سلولی ایجاد شده نیز تاثیر نا مطلوب داشته باشند [٢١]. ایمن سازی موش‌ها تنها با DNA پلاسمیدی pcDNA3.1.HPOL علی‌رغم ایجاد پاسخ Th1 و CTL اختصاصی علیه اپی‌توپ‌های گنجانده شده، فاقد قدرت و دامنه مناسب بود (شکل شماره ٣- ب و ج). دلیل این پاسخ ضعیف می‌تواند میزان کم بیان پروتئین در سلول باشد که از جمله معضلات مربوط به واکسن‌های DNA است [٥]. اما هنگامی‌که موش‌های دریافت کننده pcDNA3.1.HPOL به

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

عنوان یادآور با پپتید سنتتیک مخلوط شده با اجوانت ایمن شدند، پاسخ قوی سلول‌های +CD8 با غلبه Th1 ایجاد شد (شکل شماره ۳- ب و ج). در تائید این مشاهده مطالعات کینتیک نیز نشان داده‌اند که استفاده از رژیم‌های تزریقی گوناگون که مسیرهای مختلف عرضه آنتی ژن را درگیر می‌کنند می‌تواند به القاء پاسخ-های قوی‌تر سلول +CD8 منجر شود [۳۸]. همچنین نتایج، به دست آمده در تائید گزارشات قبلی [۲۰] مبین عدم کارائی ایمن سازی اولیه سلول‌های T با استفاده از واکسیناسیون پپتیدی بوده و نشان داد که واکسیناسیون DNA (pcDNA3.1.HPOL) قادر به ایجاد سلول‌های +CD8 اختصاصی و برانگیختن پاسخ خاطره-ای Th1 می باشد؛ به طوری که این پاسخ می‌تواند به دنبال واکسیناسیون یادآور با پپتید به طور موثری تقویت گردد. با این وجود، نتایج مربوط به چالش موش‌ها با مدل توموری نشان داد که CTL های اختصاصی که به دنبال واکسیناسیون prime/boost علیه اپی توپ‌های C و E_4 تحریک شده بودند تنها زمانی قادر به ایجاد پاسخ محافظت کننده بودند که توسط مکانیسم‌های کمکی ناشی از افزودن HBsAg از نظر تعداد و عملکرد تقویت می-شدند. به طور خلاصه نتایج چالش آزمائی این تحقیق هم‌سو با گزارشات قبلی [۳،۱] از طرفی بر اهمیت کمک سلول‌های T +CD4 در ایجاد پاسخ‌های محافظ سلول‌های +CD8 علیه HCV تاکید نمود و از طرف دیگر نشان داد که الزاما منبع آنتی ژنی برای تحریک سلول‌های +CD4 نباید متعلق به همان پاتوژن یا ایمونوژن باشد [۱۶،۱۱]؛ به طوری که در این مطالعه HBsAg به طور موفقیت آمیزی برای این منظور به کار گرفته شد. به این ترتیب علاوه بر تشکیل ذره و هدف قرار دادن سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن، فعال کردن سلول‌های T غیر اختصاصی اپی‌توپ‌ها (bystander activation) [۳۹] نیز می‌تواند توضیح دیگری برای ایمنی زائی بیشتر پلاسمید پلی توپ متصل به HBsAg باشد.

ترشح سایتوکاین‌های پیش برنده پاسخ Th1 به علت اپی توپ‌های کمکی HBsAg در واکسیناسیون DNA قبلا نشان داده شده بود [۳۵]. در این حالت لنفوسیت‌های T احتمالا تحت اثر سایتوکاین‌ها و یا واکنش متقاطع (cross reactivity) با اپی توپ‌های HBsAg فعال شده و در نهایت منجر به تقویت کیفیت و کمیت پاسخ سلولی علیه پلی توپ می‌گردند. به طور خلاصه، در تحقیق حاضر بر اساس ارزیابی‌های ایمونوانفورماتیک توالی پلی توپ جدیدی متشکل از چهار اپی توپ غالب موشی و انسانی متعلق به نواحی ساختمانی و غیر ساختمانی ویروس هپاتیت سی طراحی و ساخته شده و پاسخ سلول‌های +CD8 T اختصاصی علیه اپی توپ‌های $H\text{-}2^d$ گنجانده شده پس از واکسیناسیون موش BALB/c مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق به وضوح کارائی اتصال HBsAg به توالی پلی توپ و رژیم تزریقی DNA-prime/peptide-boost را در کنار استفاده از اجوانت‌های سازگار در انسان به عنوان دو استراتژی قدرتمند برای افزایش ایمنی زائی واکسن پلی توپ CTL علیه HCV در غیاب اپی‌توپ‌های +CD4 ویروس نشان داد. به دنبال نتایج امیدوار کننده این مطالعه، هم اکنون ارزیابی ایمونولوژیکی پاسخ ایجاد شده علیه اپی‌توپ‌های انسانی گنجانده شده (E_6 و N) با استفاده از موش تراریخته دارای HLA-A2 در حال انجام است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه تحت حمایت مالی انستیتو پاستور ایران انجام شد.

References:

[1] Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. ***Annu Rev Pathol*** 2006; 1: 23-61.
[2] Moradpour D, Brass V, Gosert R, Wolk B, Blum HE. Hepatitis C: molecular virology and antiviral targets. ***Trends Mol Med*** 2002; 8: 476-82.
[3] Gremion C, Cerny A. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. ***Rev Med Virol*** 2005; 15(4): 235-68.
[4] Shi L, Liu S, Fan GX, Sheng L, Ren HX, Yuan YK. Effective induction of type 1 cytotoxic T cell responses in mice with DNA vaccine encoding two hepatitis C virus cytotoxic T lymphocyte epitopes. ***Viral Immunol*** 2006; 19(4): 702-11.
[5] Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. ***Annu Rev Immunol*** 2000; 18: 927-74.
[6] Leroux-Roels G. Development of prophylactic and therapeutic vaccines against hepatitis C virus. ***Expert Rev Vaccines*** 2005; 4(3): 351-71.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

[7] Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, Lopez-Diaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, et al. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. ***J Virol*** 2002; 76(10): 5062-70.
[8] Yao ZQ, Eisen-Vandervelde A, Waggoner SN, Cale EM, Hahn YS. Direct binding of hepatitis C virus core to gC1qR on CD4+ and CD8+ T cells leads to impaired activation of Lck and Akt. ***J Virol*** 2004; 78(12): 6409-19.
[9] Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. ***J Exp Med*** 2002; 195(1): 35-41.
[10] Dolganiuc A, Kodys K, Kopasz A, Marshall C, Do T, Romics L Jr, et al. Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. ***J Immunol*** 2003; 170(11): 5615-24.
[11] Suhrbier A. Polytope vaccines for the codelivery of multiple CD8 T-cell epitopes. ***Expert Rev Vaccines*** 2002; 1(2): 207-13.
[12] Sette A, Livingston B, McKinney D, Appella E, Fikes J, Sidney J, et al. The development of multi-epitope vaccines: epitope identification, vaccine design and clinical evaluation. ***Biologicals*** 2001; 29(3-4): 271-6.
[13] Chen L, Gao T, Yang N, Huang J, Chen Y, Gao T et al. Immunization with a synthetic multiepitope antigen induces humoral and cellular immune responses to hepatitis C virus in mice. ***Viral Immunol*** 2007; 20(1): 170-9.
[14] Martin P, Simon B, Lone YC, Chatel L, Barry R, Inchauspé G, et al. A vector-based minigene vaccine approach results in strong induction of T-cell responses specific of hepatitis C virus Vaccine. ***Vaccine*** 2008; 26(20): 2471-81.
[15] Fournillier A, Dupeyrot P, Martin P, Parroche P, Pajot A, Chatel L, et al. Primary and memory T cell responses induced by hepatitis C virus multiepitope long peptides. ***Vaccine*** 2006; 24916): 3153-64.
[16] Woodberry T, Gardner J, Mateo L, Eisen D, Medveczky J, Ramshaw IA, et al. Immunogenicity of a human immunodeficiency virus (HIV) polytope vaccine containing multiple HLA A2 HIV CD8(+) cytotoxic T-cell epitopes. ***J Virol*** 1999; 73(7): 5320-5.
[17] Melief CJ, van der Burg SH. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. ***Nat Rev Cancer*** 2008; 8(5): 351-60.
[18] Bellier B, Dalba C, Clerc B, Desjardins D, Drury R, Cosset Fl, et al. DNA vaccines encoding retrovirus-based virus-like particles induce efficient immune responses without adjuvant. ***Vaccine*** 2006; 24(14): 2643-55.
[19] Marsac D, Puaux AL, Riviere Y, Michel ML. In vivo induction of cellular and humoral immune responses by hybrid DNA vectors encoding simian/human immunodeficiency virus/hepatitis B surface antigen virus particles in BALB/c and HLA-A2-transgenic mice. ***Immunobiology*** 2005; 210(5): 305-19.
[20] Jin H, Kang Y, Xiao C, Zhu K, Ma Y, Xie Q, et al. DNA prime followed by protein boost enhances neutralization and Th1 type immunity against FMDV. ***Viral Immunol*** 2005; 18(3): 539-48.
[21] Ramshaw IA, Ramsay AJ. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. ***Immunol Today*** 2000; 21(4): 163-5.
[22] Boisgérault F, Morón G, Leclerc C. Virus-like particles: a new family of delivery systems. ***Expert Rev Vaccines*** 2002; 1(1): 101-9.
[23] Löhr HF, Schmitz D, Arenz M, Weyer S, Gerken G, Meyer zum Büschenfelde KH. The viral clearance in interferon-treated chronic hepatitis C is associated with increased cytotoxic T cell frequencies. ***J Hepatol*** 1999; 31(3): 407-15.
[24] Park SH, Yang SH, Lee CG, Youn JW, Chang J, Sung YC. Efficient induction of T helper 1 CD4+ T-cell responses to hepatitis C virus core and E2 by a DNA prime-adenovirus boost. ***Vaccine*** 2003; 21(31): 4555-64.
[25] Sarobe P, Huarte E, Lasarte JJ, López-Díaz de Cerio A, García N, Borrás-Cuesta F, et al. Characterization of an immunologically conserved epitope from hepatitis C virus E2 glycoprotein recognized by HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes. ***J Hepatol*** 2001; 34(2): 321-9.
[26] Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. ***J Exp Med*** 2001; 194(10): 1395-1406.
[27] Sambrook J, Russell DW. Analysis of gene expression in cultured mammalian cells. In: Sambrook J, Russell DW, Editors. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press; 2001. p. 17.48-17.51.
[28] Roohvand F, Aghasadeghi MR, Sadat SM, Budkowska A, Khabiri AR. HCV core protein immunization with Montanide/CpG elicits strong Th1/Th2 and long-lived CTL responses. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2007; 354(3): 641-9.
[29] Yewdell JW, Bennink JR. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. ***Annu Rev Immunol*** 1999; 17: 51-88.
[30] Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. ***Nucleic Acids Res*** 2000; 28(1): 292.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]

[31] Báez-Astúa A, Herráez-Hernández E, Garbi N, Pasolli HA, Juárez V, Zur Hausen H, et al. Low-dose adenovirus vaccine encoding chimeric hepatitis B virus surface antigen-human papillomavirus type 16 E7 proteins induces enhanced E7-specific antibody and cytotoxic T-cell responses. ***J Virol*** 2005; 79(20): 12807-17.
[32] Puaux AL, Marsac D, Prost S, Singh MK, Earl P, Moss B, et al. Efficient priming of simian/human immunodeficiency virus (SHIV)-specific T-cell responses with DNA encoding hybrid SHIV/hepatitis B surface antigen particles. ***Vaccine*** 2004; 22(27-28): 3535-45.
[33] Bazhan SI, Belavin PA, Seregin SV, Danilyuk NK, Babkina IN, Karpenko LI, et al. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL-epitopes of major HIV-1 antigens. ***Vaccine*** 2004; 22(13-14): 1672-82.
[34] Shinoda K, Xin KQ, Jounai N, Kojima Y, Tamura Y, Okada E, et al. Polygene DNA vaccine induces a high level of protective effect against HIV-vaccinia virus challenge in mice. ***Vaccine*** 2004; 22(27-28): 3676-90.
[35] Woo WP, Doan T, Herd KA, Netter HJ, Tindle RW. Hepatitis B surface antigen vector delivers protective cytotoxic T-lymphocyte responses to disease-relevant foreign epitopes. ***J Virol*** 2006; 80(8): 3975-84.
[36] Boyle JS, Koniaras C, Lew AM. Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. ***Int Immunol*** 1997; 9(12): 1897-906.
[37] Netter HJ, Macnaughton TB, Woo WP, Tindle R, Gowans EJ. Antigenicity and immunogenicity of novel chimeric hepatitis B surface antigen particles with exposed hepatitis C virus epitopes. ***J Virol*** 2001; 75(5): 2130-41.
[39] Radcliffe JN, Roddick JS, Friedmann PS, Stevenson FK, Thirdborough SM. Prime-boost with alternating DNA vaccines designed to engage different antigen presentation pathways generates high frequencies of peptide-specific CD8+ T cells. ***J Immunol*** 2006; 177(10): 6626-33.
[39] Welsh RM, McNally JM, Brehm MA, Selin LK. Consequences of cross-reactive and bystander CTL responses during viral infections. ***Virology*** 2000; 270(1): 4-8.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-24]