

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

**Memarnejadian A<sup>1</sup>, Roohvand F<sup>1\*</sup>, Motevalli F<sup>1</sup>, Aghasadeghi MR<sup>1</sup>**

**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<sup>+</sup> 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<sub>614-622</sub> and NS3<sub>1406-1415</sub>) and two H-2<sup>d</sup>-restricted mouse epitopes (core<sub>132-142</sub> and E2<sub>405-414</sub>) 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T cells ( $P<0.05$ ). Peptide boosting of this group (formulated in two human-compatible adjuvant) still led to the more activation of CD8<sup>+</sup> 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*

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

۱ آرش معمارنژادیان ، فرزین روحوند \*<sup>۲</sup> ، فاطمه متولی ، محمد رضا آفاسادقی

## خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به اثر تضعیف کنندگی سیستم ایمنی و موتابسیون‌های شایع در برخی آنتی ژن‌های ویروس هپاتیت سی (HCV)، القاء پاسخ متمنکز سلول‌های TCD8+ بر اپی‌توپ‌های نامتفاوت و مهم ویروس در قالب یک واکسن چند اپی‌توپی 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<sub>614-622</sub> و NS3<sub>1406-1415</sub>) و دو اپی‌توپ وابسته به H-2<sup>d</sup> موشی (core<sub>132-142</sub> و E2<sub>405-414</sub>) در یک ترادف پیش‌بینی شده توسط آنالیزهای ایمونوافروماتیکی 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.HPOL (به ترتیب pcDNA3.1.HPOL و BALB/c ۶ موس) ارزیابی شدند. به دنبال ایمن‌سازی موس‌های BALB/c (pcDNA3.1.POL) از نظر بیان و ترشح پروتئین در رده سلولی Cos-7 ارزیابی شدند. به دنبال ایمن‌سازی موس‌های BALB/c (pcDNA3.1.POL) از رژیم‌های مختلف تزریق DNA و پیتید، میزان فعالیت لنفوцит‌های TCD8+ همچنین نوع و قدرت محافظت پاسخ ایجاد شده، مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت انجام آنالیز آماری از آزمون‌های t و Mann Whitney و ANOVA استفاده گردید.

نتایج: علی‌رغم ایجاد پاسخ اختصاصی اپی‌توپ‌ها در موس‌های ایمن شده با پلاسمید pcDNA3.1.POL، گروه دریافت کننده pcDNA3.1.HPOL افزایش معنی داری را در تعداد و فعالیت لنفوцит‌های TCD8+ نشان داد ( $P < 0.05$ ). تزریق یادآور این گروه با پیتید (مخلوط شده با دو اجوانات 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 اپی‌توپ‌های کمکی در کنار رژیم تزریقی DNA-prime/peptide-boost دو استراتژی امید بخش برای تقویت واکسن‌های CTL چند اپی‌توپی علیه HCV می‌باشد.

واژگان کلیدی: هپاتیت سی، واکسن‌های DNA، آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت سی، آنتی ژن ۱۰۲۰۱، اپی‌توپ HLA-A2

۱- استادیار گروه هپاتیت و ایدز انتیتوپاستور ایران

۲- کارشناس ارشد گروه هپاتیت و ایدز انتیتوپاستور ایران

\* نویسنده مسؤول: فرزین روحوند

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

پست الکترونیک: farzin.roohvand@gmail.com

تلفن: ۰۲۱ ۶۶۹ ۵۳۳۱۱ (داخلی ۲۲۴۱)

دورنوبیس: ۰۲۱ ۶۶۹ ۶۹۲۹۱

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۱۴

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۸/۶/۲۶

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

## مقدمه

کارسینومای هپاتوسلولار دچار می‌شوند [۱]. با توجه به فقدان واکسن پیشگیری کننده و موفقیت ناچیز روش درمانی موجود (تزریق همزمان ریباویرین و ایترافرون آ)، تلاش برای دستیابی به واکسن درمانی علیه این عامل ویروسی یک ضرورت اساسی و مهم است [۲]. ژنوم HCV شامل RNA تک رشته‌ای مثبت مسی- باشد که سه پروتئین ساختمانی (core، E1 و E2) و شش

ویروس هپاتیت C (HCV)، که به عنوان عامل اصلی هپاتیت ویروسی مزمن شناخته می‌شود، با شیوعی بیش از ۴ برابر عفونت HIV در حدود ۱۲۳ میلیون نفر را در سراسر دنیا آلوده کرده است که از این میان حدود ۵۰-۸۵ درصد از افراد آلوده به هپاتیت مزمن و به دنبال آن پس از چند دهه به سیروز کبد و

مانع از تحریک مناسب سیستم ایمنی می‌گردد. این محدودیت به دلیل ناپایداری پیتیدهای مصنوعی پلی توب و حساسیت آنها به پروتئولیز در مورد واکسن‌های DNA پلی توب مشهودتر است [۱۷,۱۶,۱۴] و در نتیجه به کارگیری تمهداتی در جهت افزایش ایمنی‌زایی این نوع واکسن را ضروری می‌سازد. در این راستا، استراتژی‌های مختلفی مانند واکسیناسیون در قالب ایمونوژنهای prime/boost [۱۹,۱۸] و نیز استفاده از رژیم تزریقی [۲۱,۲۰] مورد توجه بوده‌اند. در انسواع 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 شبه ویروسی (VLP) [۲۲] را دارند، آنتی ژن در داخل سلول به صورت ذره‌ای بیان می‌شود. مزیت این روش که بنام plasmo-VLP [۱۸] نامیده شده است، بهره‌گیری از سهولت ساخت DNA پلاسمیدی و ایمنی زائی بیشتر ذرات VLP می‌باشد. آنتی ژن سطحی و آنتی ژن L1 ویروس هپاتیت بی (HBsAg, HBcAg)، پروتئین‌های VP2 ویروس پاپیلوما و نیز VLP می‌باشد. هدف از VLP می‌باشد [۲۲]. این روش می‌تواند اینکه ایجاد پاسخ ساختمانی HCV می‌باشد. در این تحقیق ضمن اینکه ایجاد پاسخ ایمنی علیه اپی توب‌های موشی (وابسته به H-2<sup>d</sup>) موجود در پلی توب در موش BALB/c نشان داده می‌شود، قابلیت ژن HBsAg (به صورت توالی متصل به پلی توب) و رژیم تزریقی DNA-prime/peptide-boost در افزایش پاسخ ایمنی سلولی و کنترل رشد سلول‌های توموری بیان کننده این پلی توب نیز به نمایش گذاشته می‌شود.

## مواد و روش‌ها

### ساخت و ارزیابی سازه DNA پلی توب:

ژن بیان کننده توالی مصنوعی پلی توب مشکل از دو اپی توب موشی (وابسته به H2-D<sup>d</sup>) با نام‌های C (ناحیه ۱۳۲-۱۴۲)، E<sub>4</sub> (ناحیه ۴۱۴-۴۰۵)، core، توالی DLMGYIPLVGA [۲۳] و E<sub>2</sub> (ناحیه ۶۲۲-۶۱۴) [۲۴] و دو اپی توب انسانی (وابسته به HLA-A2.1) با نام‌های E<sub>6</sub> (ناحیه ۱۴۱۵-۱۴۰۶)، P (RLWHYPCTI) [۲۵] و N (ناحیه ۱۴۰۶-۱۴۰۷) [۲۶] به طوری که اپی توب‌های مذکور را در تراویف CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N بیان کند، طراحی

پروتئین غیر ساختمانی (NS) را کد می‌کند. به دلیل شیوع موتاسیون در ژنوم HCV و ایجاد ژنوتیپ‌ها و زیر گونه‌های متفاوت، آنتی بادی‌های خشی 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 [۱,۳]. همچنین شواهد حاکمی از اهمیت پاسخ لنفوسيت‌های T سیتوکسیک (CTLs) و ترشح ایترفرون- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) در پاکسازی عفونت HCV می‌باشد [۴,۳,۱]. 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 استفاده شده‌اند [۶]، تاکنون موفقیت چشم‌گیری در جهت ایجاد پاسخ لازم برای محافظت در مقابل ویروس حاصل نشده است. علی‌رغم عدم موفقیت را از طرفی می‌توان در تعداد کم اپی توب‌های محافظ موجود در یک ناحیه آنتی ژنی جستجو کرد [۷,۸,۷]، که تغییر و موتاسیون در آنها زمینه فرار ویروس از دست سیستم ایمنی را فراهم می‌آورد، و از طرف دیگر می‌توان آن را ناشی از تضعیف سیستم ایمنی توسط برخی از آنتی ژن‌های HCV دانست که مانع از ایجاد پاسخ مناسب می‌گردد. در این خصوص سرکوب لنفوسيت‌های T، سلول‌های کشتنده طبیعی (NK) و سلول‌های دندریتیک (DC) توسط پروتئین‌های ساختمانی و نیز پروتئین غیر ساختمانی NS3 ویروس به خوبی شناسایی و گزارش شده است [۷-۱۰]. شناسایی اپی توب‌های CTL در پروتئین‌های مختلف HCV اخیراً امکان طراحی و ساخت واکسن‌های چند اپی توبی را که در آنها اپی توب‌های 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 اپی توب‌ها به منظور افزایش کارائی، تحریک همزمان پاسخ علیه اپی توب‌های برگرفته از آنتی ژن‌های مختلف، تمرکز ساختن پاسخ ایمنی بر اپی توب‌های مهم و نامتغیر و در نهایت ممانعت از بروز اثرات ناخواسته ناشی از به کار گیری آنتی ژن‌های کامل می‌باشد [۱۱,۱۲]. واکسن‌های پلی توب در موارد تومورها و بیماری‌های مختلف عفونی [۱۱] و اخیراً با استفاده از اپی توب‌های HCV برگرفته از پروتئین‌های ساختمانی [۱۳,۱۴] و غیر ساختمانی HCV [۱۳-۱۵] به کار گرفته شده‌اند. متاسفانه بیان ضعیف پروتئین از جمله محدودیت‌های واکسن‌های DNA می‌باشد [۵] که عموماً

## پیتیدهای سنتیک:

CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N پیتیدهای متناظر با اپی توب‌های C، E<sub>4</sub>، پلی توب N (حاوی ترادف خطی چهار اپی توب ارائه شده در شکل شماره ۱-الف) و اپی توب غیر مرتبط کنترل (ناحیه ۱۶-۲۵ پروتئین core با Fmoc توالی (NRRPQDVKFP) با روش شیمیائی فاز جامد در انسیتو بیوشیمی دانشگاه لوزان سوئیس ساخته و با خلوص ۹۷ درصد تهیه شدند.

تهیه مدل توموری بیان کننده پلی توب:

سلول‌های CT26 که رده سلولی تهیه شده از کارسینومای کلون Lipofectamine LTX (H-2<sup>d</sup>) می‌باشد، به کمک کیت pcDNA3.1.POL (Invitrogen) با پلاسمید مقاومت به آنتی بیوتیک Geneticin (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 ۵'-taggatccacatggacacctgtatggctac-3' و ۳'-atgaaattttcacacggcg-5' از نظر بیان ژن CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N مورد ارزیابی قرار گرفتند (نتایج نشان داده نشده است).

ایمن سازی موش‌ها:

موش‌های BALB/c (H-2<sup>d</sup>) ماده با وزن تقریبی ۲۰ g و سن ۸-۶ هفته از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی انسیتو 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 (pcDNA3.1.HPOL) یا pcDNA3.1.POL (در هفته‌های ۰، ۳ و ۶ و یا در ناحیه قاعده دم توسط ۵۰ µg ۵ پیتید سنتیک CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N که با دو اجوانات قابل استفاده در انسان (۵۰ µg از [۲۸] Montanide ISA 720 و ۷۰ CpG 1826 مخلوط شده بود، در روزهای ۰، ۱۰ و ۲۰ ایمن شدند. ایمن سازی تزریق یادآور پیتید (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 گلbulول‌های قرمز با محلول ۰/۸۴ درصد NH<sub>4</sub>Cl، سلول‌ها در محیط کشت 1640 RPMI کامل (غنى شده با ۱۰ درصد

و ساخته شد. برای این منظور دو الیگونوکلئوتید ۸۰-۸۴ بازی مرتبه با انتهای ۵' دو رشته مقابل پلی توب (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 ۵'-taggatccacatggacacctgtatggctac- Reverse: 5'-atgaaattttcacacggcg-3' و Forward: 3' برش آنزیم‌های محدود الاثر با خط زیر مشخص شده است) توالی پلی توب CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N در یک واکنش PCR تکثیر و به کمک دو آنزیم EcoRI و BamHI 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 بس GenBank accession no. X02496: 157-.HBsAg-S) به انتهای ۵' ژن CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N (بیان کننده ۸۳۷ آنزیم (HindIII/BamHI پلاسمید (HBs-CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N) ساخته شد (شکل شماره ۱-ب). پلاسمید HBsAg-S که تنها حاوی ژن S بود نیز به عنوان کنترل ساخته شد. پلاسمیدهای مذکور پس از تأیید صحت توالی با استفاده از ستون‌های Endotoxin-free Macherey-NucleoBond® PC 10000 columns (Nagel, Germany) تخلیص شده و برای ایمن سازی استفاده شدند. پس از ترانسفکشن وقت سلول‌های Cos-7 (بیان پلاسمیدها با ارزیابی لیزات سلولی به روش های 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 (Sartorius, Germany) cut off 3000 با برابر تغلیض شده و سپس میزان HBsAg آنها با استفاده از کیت تجاری Hepanostika (Biomérieux, France) آنها با استفاده از 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 ضربی یکسان سازی، میزان ترشح ذرات HBs-CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N 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.

سبوستراتی 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،  $2 \times 10^5$  سلول توموری (CT26/polytope) در حجم  $100 \mu\text{l}$  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  $\times$  عرض  $\times$  (طول + عرض) تقسیم بر ۲ به دست آمد. موش‌های غیر اینمن 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 اینمنی 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 Mann-Whitney U و با آزمون‌های t, GraphPad Prism 4.0 یا ANOVA ارزیابی شده و موارد با امکان  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

## نتایج

### ساخت و آنالیز DNA پلی توب:

ملک انتخاب اپی توب‌های به کار گرفته شده در این تحقیق علاوه بر اینمنی زائی آنها در افراد آلوده به HCV، عبارت بود از یکسان بودن نسبی تمایل اتصال آنها به آلل‌های H-2<sup>d</sup> و HLA-A2.1 (به منظور جلوگیری از پدیده ایمونودمینانس [۲۹]), تشابه توالی 1a و 1b و ارتباط ترجیحی آنها با پاکسازی ویروس [۲۶، ۲۳]. به منظور فراهم شدن امکان بررسی پاسخ اینمنی سلولی در حیوان معمول آزمایشگاهی (موش BALB/c) طراحی دو اپی توب C و N (وابسته به H2-D<sup>d</sup>) در کنار اپی توب‌های انسانی E<sub>6</sub> و E<sub>4</sub> (وابسته به HLA-A2.1) مد نظر قرار گرفت. محل قرار گیری اپی توب‌ها در رشتہ پلی توب بر اساس آنالیزهای ایمونوافرماتیک و با استفاده از الگوریتم‌های کامپیوتری برنامه-های (http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP/) Rankpep و (http://paprocd.de) PAProC و متصل شونده به آلل‌های MHC و محل برش پروتاشزوم را

FBS ۲ mM-گلوتامین،  $100 \mu\text{g/ml}$  استرپتومایسین و  $100 \text{ U/ml}$  (پنی سیلین) شستشو داده شده و به حالت معلق در آمدند.

### ارزیابی سلول‌های CTL:

به منظور ارزیابی قابلیت کشندگی سلول‌های CTL ایجاد شده علیه اپی توب‌های وابسته به H-2<sup>d</sup> سلول‌های جدا شده از طحال RPMI 1640 کامل حاوی  $50 \mu\text{M}$  ترکیب 2-ME کشت داده شده و برای مدت ۴ روز در مجاورت  $10 \mu\text{g/ml}$  از هریک از پپتیدهای C و E<sub>4</sub> در دمای  $37^\circ\text{C}$  و  $5 \text{ CO}_2$  درصد تحریک شدند. با Cedarlane افروden ۱۰ U/ml از ایتلرولوکین ۲ (IL2) نوترکیب (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  $6 \times 10^3$  سلول هدف (Target) (P815) (وابسته به H-2<sup>d</sup>) که قبلاً با یکی از پپتیدهای C, E<sub>4</sub> و یا پپتید کنترل غیر مرتبط مجاور شده بودند، به علاوه سلول‌های Effector به نسبت‌های مختلف E:T (شامل ۱:۱, ۵۰:۱ و ۲۵:۱ و ۱۲/۵:۱) در چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه تقسیم شدند. پس از ۶ ساعت نگهداری در  $37^\circ\text{C}$  LDH در مایع (Promega) Cytotox 96 روئی سلول‌ها با استفاده از کیت (Promega) (Netherlands) ارزیابی ترشح سایتوکاین‌ها:

سلول‌های جدا شده از محلول طحال موش‌ها در یک گروه  $(10^7 \times 2)$  با پپتید سنتیک CE<sub>6</sub>E<sub>6</sub>N ( $10 \mu\text{M}$ ) به مدت ۷۲ ساعت در  $37^\circ\text{C}$  تحریک شده و پس از این زمان مایع روئی از نظر میزان ایتلرولوکین ۴ (IL4) و IFN- $\gamma$  با روش الایزا (U-CyTech, Netherlands) ارزیابی شد.

### تست ELISpot :

با استفاده از کیت (MabTech, Sweden) IFN- $\gamma$  ELISpot سلول‌های طحال که در مقابل اپی توب‌های موشی توانایی ترشح اختصاصی IFN- $\gamma$  را داشتند، به صورت برون تنی و مطابق با دستورالعمل کیت شمارش شدند. به طور خلاصه  $2 \times 10^6$  سلول طحال به همراه  $10 \text{ U/ml}$  IL2 نوترکیب و  $10 \mu\text{M}$  از پپتیدهای C یا E<sub>4</sub> یا کنترل به مدت ۴۰ ساعت در چاهک‌های پوشیده شده با آنتی بادی موشی ضد IFN- $\gamma$  در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه شدند. پس از شستشو، چاهک‌ها با  $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$   $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$  ایتلرولوکین (anti-mouse IFN- $\gamma$ -biotin Ab) به تانویه کنزوگه با بیوتین (anti-mouse IFN- $\gamma$ -biotin Ab) به مدت ۲ ساعت و به دنبال آن با استریت آویدین نشان‌دار با آنزیم HRP به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. در انتهای، پس از افزودن

pcDNA3.1.POL نیز نشان داد (میزان لیز اختصاصی ۲۵ درصد در شکل شماره ۲-ب در مقابل ۶ درصد در شکل شماره ۲-الف،  $p < 0.05$ ). نتایج ELISpot نیز به طور مشابه تفاوت معنی‌داری را در تعداد سلول‌های ترشح کننده IFN- $\gamma$  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 پیتید غیر مرتبط (core<sub>16-25</sub>), اختصاصی بودن پاسخ‌های ایجاد شده علیه پیتیدهای C، E<sub>4</sub> و CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N 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 پیتید پلی توپ CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N تعداد بیشتری سلول‌های ترشح کننده IFN- $\gamma$  (SFC) را در مقایسه با سلول‌های تحریک شده با پیتیدهای اپی توپی C و E<sub>4</sub> ایجاد کرد که این امر می‌تواند به دلیل تحریک همزمان لنفوцит‌های CD8+ و CD4+ توسط پیتید طویل CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N باشد و این در حالی است که سلول‌های CD8+ تنها می‌توانند ترشح IFN- $\gamma$  در هنگام تحریک با پیتیدهای اپی توپی CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N را در مقابل تحریک با پیتیدهای اپی توپی C و E<sub>4</sub> مشاهده کردند [۳۱، ۳۲]. لازم به ذکر است که مشاهده القاء پاسخ ایمنی خود تائید کننده بیان پلاسمیدهای ساخته شده می‌باشد.

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 پیتید سنتیک CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N به صورت رژیم‌های مختلف prime/boost (CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N مخلوط شده با طحال موش‌های واکسینه با پیتید M720) در مقایسه با گروه دریافت کننده (M720 و CpG) در شکل شماره ۱ نشان داده شده است، سلول‌های CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N (M720) به دلیل تحریک درون تنی، DNA (pcDNA3.1.HPOL) به دلیل تحریک درون تنی، توانایی القاء تعداد بیشتر سلول‌های ترشح کننده IFN- $\gamma$  را داشته (شکل شماره ۳-ب) و میزان IFN- $\gamma$  (IL4) (به ترتیب به عنوان دو سایتوکاین شاخص پاسخ‌های Th1 و Th2) بیشتری را نیز به محیط کشت ترشح کردند (نسبت IFN- $\gamma$ /IL4 تقریباً ۱) (شکل شماره ۳-ج). با این وجود تعداد کمتر SFC ایجاد شده در مجاورت پیتیدهای اپی توپی C و E<sub>4</sub> نشانه پاسخ اختصاصی ضعیف‌الجهة اپی توپ‌های CTL گنجانده شده در این گروه بود. در مقابل موش‌های دریافت کننده DNA سلول‌های CD8+

شناسائی می‌کنند، صورت گرفت. در این حالت ترادف اپی توپ‌ها طوری در نظر گرفته شد که باعث ایجاد کمترین اپی توپ‌های بینایی‌مند در محل اتصال هر دو اپی توپ مورد نظر گردد [۱۲]. توالی اسید آمینه‌ای مربوط به پلی توپ CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N 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 پرومومتر hCMV/IE در ناقل hCMV/IE در مقابل pcDNA3.1+ ۴۰ اسید آمینه ای CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N را توسط پلاسمید pcDNA3.1.POL فراهم آورد (شکل شماره ۱-الف). همچنین از اتصال ژن به HBsAg به انتهای ۵' توالی CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N پلاسمید ce<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N را با ۲۶۸ HBs-CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N با ۴۰ 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 پیتیدهای متناظر با روش‌های وسترن بلاط و ایمونوفلورسانس (در مورد RT-PCR و دات بلاط (در مورد PCR) بررسی شد (نتایج نشان داده نشده است). لازم به ذکر است که علت عدم استفاده از روش‌های وسترن بلاط و ایمونوفلورسانس جهت محدودیت انجام وسترن بلاط به دلیل اندازه pcDNA3.1.POL کوچک پیتید پلی توپ بیان شده (۴۰ اسید آمینه) و نیز فقدان آنتی بادی مونوکلونال تجاری علیه آن بود. همچنین مطابق با گزارشات قبلی [۳۱، ۳۲] تشکیل و ترشح ذرات HBs-CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N 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 می‌شود، ذرات هیبرید-CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N اگرچه در مقابل HBsAg به مقدار 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 سوب سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1+ حاکی از اختصاصی بودن روش بود.

ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی در موش‌های واکسینه: بدین منظور دو روش ELISpot و CTL assay به کار گرفته شدند. نتایج سیتوکسیسیتیه در گروه‌های واکسینه (شکل شماره ۲-الف و ب) نه تنها حاکی از افزایش معنی دار لیز سلول‌های 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

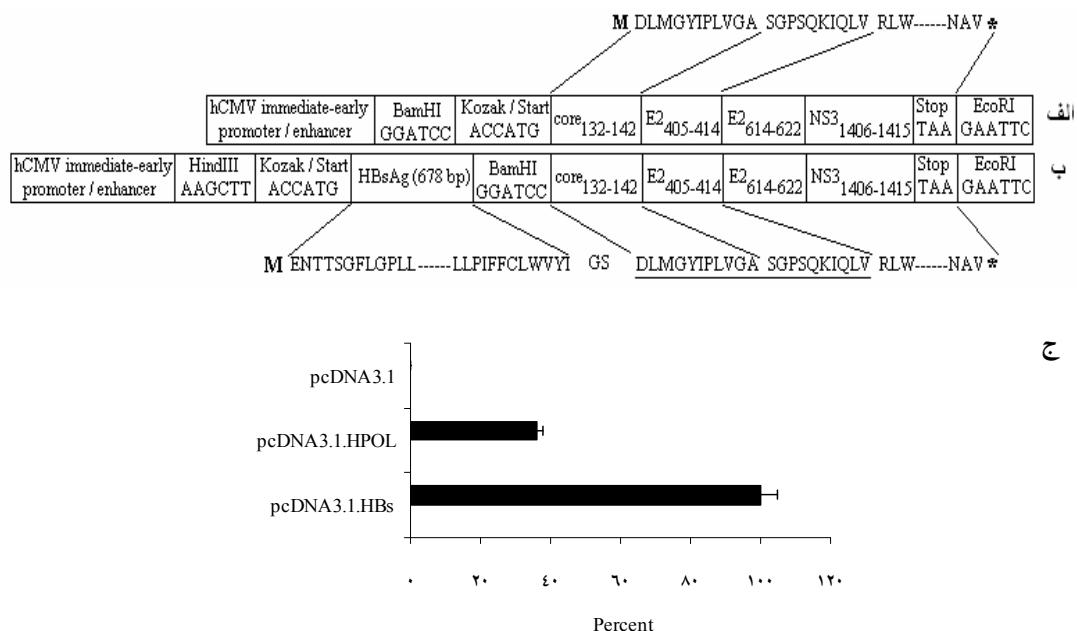
## واکسن پلی توب علیه HCV ...

نیز تزریق شده بودند، هم تعداد SFC اختصاصی اپی توب‌ها به طور معنی داری بالاتر از دو گروه ایمن شده به صورت تک IFN-رژیمی (DNA یا پپتید تنها) بود و هم شاخص نسبت-IFN-γ/IL4 (قریباً ۳:۱) نشان دهنده تورش پاسخ به سمت Th1 بود (شکل شماره ۳-ب و ج).

اختصاصی اپی توب‌ها و پاسخ قوی Th1 را نشان دادند که با ترشح γ-IFN و تولید مقادیر ناچیز IL4 در مقابل پپتید CE4E<sub>6</sub>N (نسبت IFN-γ/IL4 تقریباً ۲۸:۱) مشخص گشت (شکل شماره ۳-ب و ج). نکته جالب توجه این بود که در گروه دریافت کننده DNA-prime/peptide-boost که با رژیم توسعه پیشید

جدول شماره ۱- نتایج و ارزیابی‌های آماری گروه‌های مختلف واکسینه شده

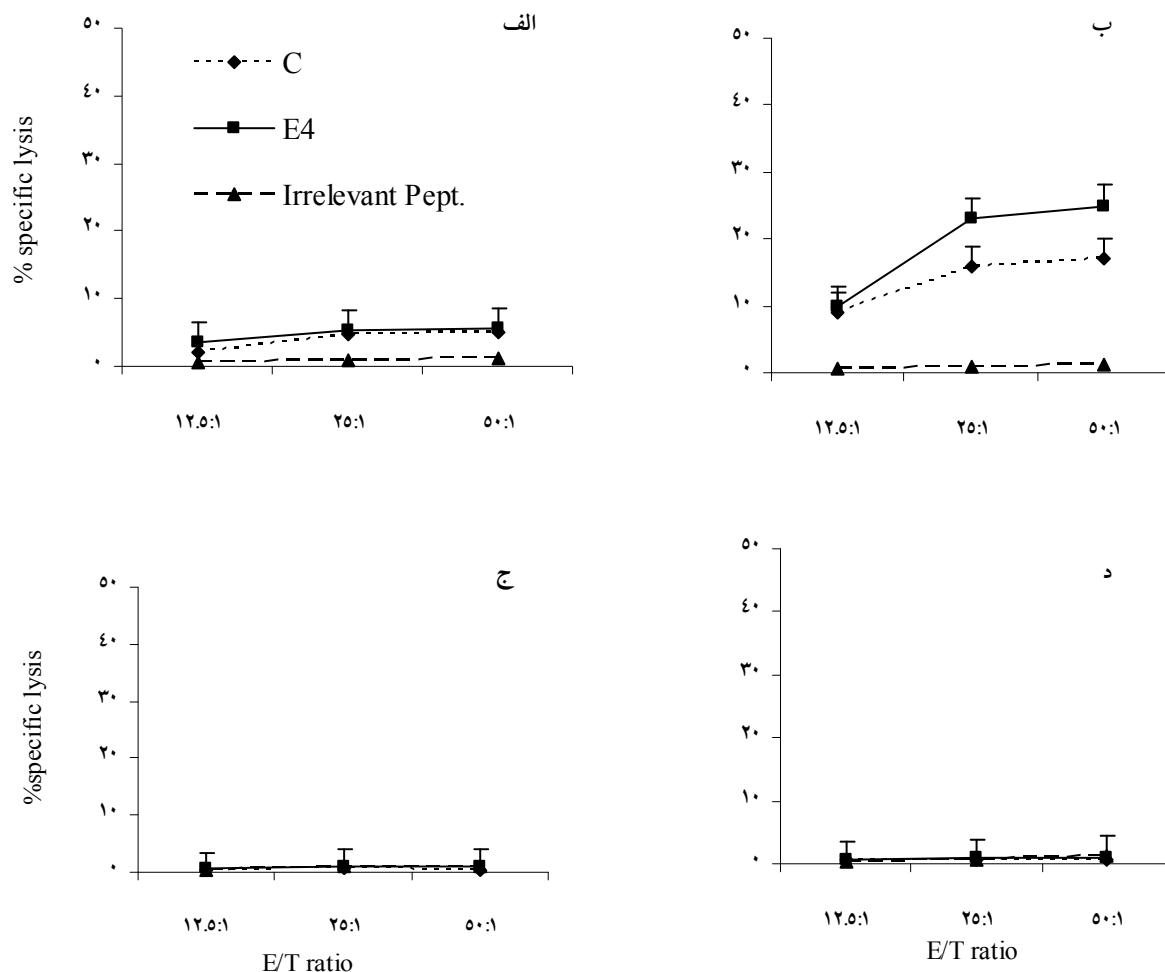
NI علیه P (Mann-Whitney)	Tumor challenge (day 26)		ELISpot assay (E <sub>4</sub> epitope)		ELISpot assay (E <sub>4</sub> epitope)		گروه‌های آزمایش
	$\bar{X} \pm SD$	P (ANOVA)	$\bar{X} \pm SD$	P	$\bar{X} \pm SD$		
-	-	-	-	-	-	-	NI
۰/۱۱۱	۱۴۴۰±۲۲۹	-	-	pcDNA3.1.POL pcDNA3.1.HPO L (t-test)	۳/۲±۱/۷ ۴۶/۷±۷/۴ ۰/۰۲	pcDNA3.1 pcDNA3.1.POL pcDNA3.1.HBs pcDNA3.1.HPOL	
۰/۳۴	۱۱۲۲±۱۹۶	-	-	-	۲/۷±۲/۰	-	
۰/۰۱۶	۱۱۸۳±۷۹/۹	-	-	-	۱۳۰±۸/۴	-	
		۵۷/۶±۴	۵۷/۶±۱۳	۰/۰۰۱ (ANOVA)	۱۳۳±۱۲/۲	۶۰۳±۴۴/۹	DNA
		۱۵۱±۱۷	۱۵۱±۱۷	-	۵۵±۹/۸	۵۵±۹/۸	DNA/Pept. Pept.



شکل شماره ۱- شکل شماتیک توالی پلی توب کلون شده در فروdes پرومتر hCMV IE pCDNA3.1+ به صورت غیر متصل (الف) و متصل (ب) به آنتی زن سطحی ویروس هپاتیت بی (HBsAg). توالی و محل برش آنزیم‌های EcoRI و BamHI HindIII همچنین توالی-های مربوط به Kozak، شروع (ATG) و ختم (TAA) ترجمه مشخص شده‌اند. ترتیب قرار گیری اپی توب‌های گنجانده شده در سازه پلی توب (ناحی مشخص شده از آنتی زن‌های core, E2 و NS3) به علاوه توالی اسید آمینه‌ای آنها (در مورد اپی توب‌های E2<sub>614-622</sub> و NS3 و توالی E2<sub>405-414</sub>) و توالی NS3 (نها ابتداء و انتها) نشان داده شده است. (ج) ارزیابی درصد ترشح HBsAg در محیط کشت سلول‌های Cos-7 ترانسفکت شده با pCDNA3.1.HBs (بیان کننده HBsAg طبیعی)، pCDNA3.1.HPOL (بیان کننده هیرید HBs-CE4E<sub>6</sub>N) و pCDNA3.1 (بے عنوان کنترل) به وسیله الیزا، ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن. نتایج میانگین سه ترانسفکشن مختلف ± انحراف معیار را نشان می‌دهد.

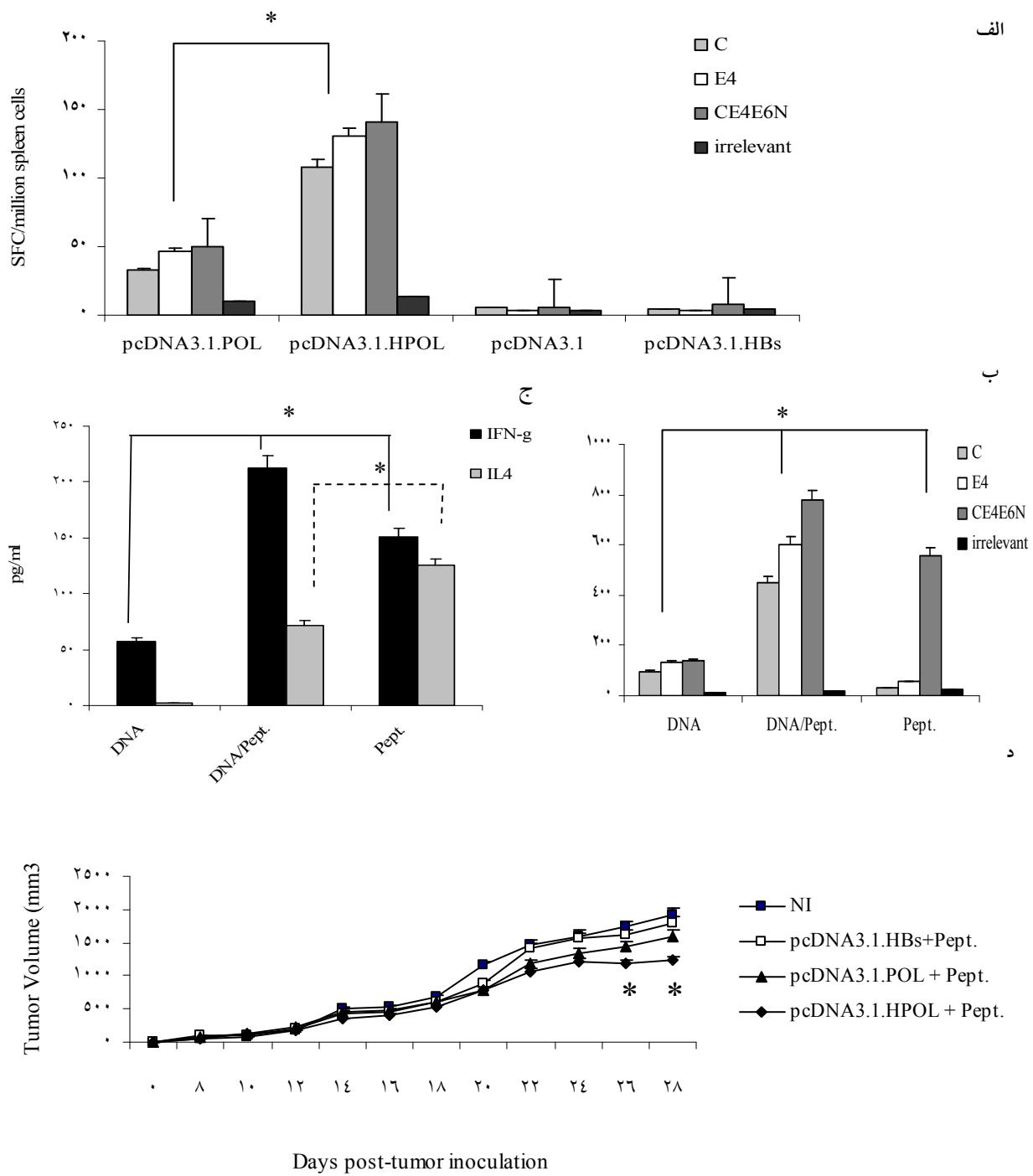
محافظه و کنترل رشد سلول‌های CT26/polytopic نبودند. نکته جالب آن که در گروه ایمن شده با pcDNA3.1.HBs (به عنوان DNA) نیز با وجود دریافت پپتید CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N تغییر معنی داری در میزان رشد سلول‌های توموری دیده نشد. در کمال تعجب اگرچه موش‌های تزریق شده با پلاسمید pcDNA3.1.HPOL پس از دریافت پپتید 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 ۲۶ پس از تزریق رشد آنها را به طور معنی‌داری کاهش دادند (شکل شماره ۳-د) و جدول (P=۰/۱۵). Mann-Whitney آزمون آماری شماره ۱، طبق آزمون آماری

بررسی پاسخ محافظه در برابر چالش با مدل توموری: چالش حیوان واکسینه با ویروس با سلول‌های توموری بیان کننده آنتی ژن‌های واکسن روش استاندارد بررسی ایمنی محافظه در تحقیقات واکسن است [۳۴]. با این هدف سلول‌های توموری بیان کننده پپتید CE<sub>4</sub>E<sub>6</sub>N به موش‌های ایمن شده به روی 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 دریافت کردند، همانند گروه واکسینه نشده، قادر به ایجاد پاسخ



شکل شماره ۲- القاء لنفوسيت‌های T سایتوکوسیک اختصاصی ایپی توپ‌ها بوسیله پلاسمیدهای پلی توپ. مخلوط سلول‌های طحال گروه‌های موشی ایمن شده (هر گروه ۶ عدد) با پلاسمیدهای pcDNA3.1.POL (الف)، pcDNA3.1.HPOL (ب)، pcDNA3.1 (ج) و pcDNA3.1.HBs (د) در آزمایشگاه با پپتیدهای ایپی توپی (C و E<sub>4</sub>) یا یک پپتید غیر مرتبط (irrelevant Pept.) مجاور شده بودند، با استفاده از کیت تجاری P815 Cytotox96 و اندازه گیری آنزیم لاكتات 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.

واکسن DNA پلی توب علیه HCV ...



شکل شماره ۳- ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی در موش‌های ایمن شده با پلاسمیدهای pcDNA3.1.HPOL، pcDNA3.1.POL و pcDNA3.1.HBs یا پلاسمیدهای کنترل (C) یا پپتید پلی CE4E6N و یا پپتید غیر مرتبط به طور جداگانه تحریک شده و تعداد سلول‌های ترشح کنده IFN- $\gamma$  (SFCs) در آزمون ELISpot شمارش شدند. (ب) گروه‌های موشی در سه رژیم مختلف توسط پلاسمید CE4E6N (DNA) یا پپتید CE4E6N (DNA) یا پپتید CE4E6N (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 CE4E6N در آزمایشگاه تحریک شده و میزان IFN- $\gamma$  و IL4 ترشح شده به محیط با روش الیزا اندازه گیری شد. (د) موش‌های غیر ایمن (NI) یا ایمن شده با دو تزریق DNA و یک یادآور پپتید CE4E6N مخلوط با اجوانات (CpG + M720)  $2 \times 10^6$  سلول توموری CT26 بیان کننده CE4E6N 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 می‌دهد. نمودارهای "الف"، "ب" و "ج" میانگین  $\pm$  خطای استاندارد مربوط به شمارش سه چاهک و نمودار "د" میانگین  $\pm$  خطای استاندارد مربوط به اندازه تومور در موش‌های هر گروه را نشان داده و \* مبین تفاوت معنی دار ( $p < 0.05$ ) بین گروه‌ها است.

## بحث

(APC) به دنبال داشته [۳۵] و در مقایسه با پروتئین‌های متصل به غشاء یا داخل سلول موجب القاء قوی‌تر ایمنی سلولی و هومورال می‌گردد [۳۶]. 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 CD8+ T نیز فراهم می‌کند [۳۵,۲۲]. علاوه بر این حضور اپی‌توب‌های کمکی سلول‌های T و بیان HBsAg طولانی مدت پروتئین از جمله دیگر مکانسیم‌های کمکی به عنوان یک ناقل ایمنی زائی محسوب می‌شوند [۳۵,۳۱]. در مطالعات قبل نشان داده شده بود که اتصال توالی‌های طولانی به انتهای آمینی یا ناحیه هیدروفیل لوب خارجی HBsAg می‌تواند منجر به کاهش قابلیت ترشح پروتئین گردد [۳۷,۳۵]. به علاوه علی‌رغم اینکه اتصال توالی‌های [۳۵] و [۹۸] اسید آمینه‌ای در گزارشات قبلی همچنان باعث حفظ توانائی ترشح HBsAg شده بودند، در تحقیق حاضر میزان ترشح ذرات به دنبال افزودن توالی پلی توب ۴۰ اسید آمینه‌ای به انتهای کربوکسیل پروتئین به میزان قابل توجهی از ترشح آن کاست (شکل شماره ۱-ب). مقایسه نتایج این تحقیق با گزارشات مذکور این نکته را مطرح می‌سازد که ترکیب اسید آمینه‌ای 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 اینکه رژیم تزریقی prime/boost به عنوان یکی از روش‌های افزایش پاسخ ایمنی در واکسیناسیون مطرح می‌باشد [۲۱]. تزریق واکسن پلی توب طراحی شده در این تحقیق به صورت پپتید مخلوط شده با اجوانات نشان دهنده ایجاد پاسخ متعادل Th1 و Th2 در موش-های واکسینه شده بود. اگرچه چنین پاسخ دوگانه‌ای می‌تواند به عنوان یکی از مزایای واکسن محسوب شود، اما با توجه به اینکه پپتید پلی توب CE<sub>4</sub>E<sub>N</sub> با ترادف طراحی شده در طبیعت وجود CTL ندارد، تنها پاسخ‌های Th1 اختصاصی علیه اپی‌توب‌های CTL موجود در این توالی دارای اهمیت می‌باشند 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 باشد [۲۱]. این سازی موش‌ها تنها با DNA پلاسمیدی pcDNA3.1.HPOL علی‌رغم ایجاد پاسخ CTL و DNA اختصاصی علیه اپی‌توب‌های گنجانده شده، قادر و دامنه مناسب بود (شکل شماره ۳-ب و ج). دلیل این پاسخ ضعیف می‌تواند میزان کم بیان پروتئین در سلول باشد که از جمله معضلات مربوط به واکسن‌های DNA است [۵]. اما هنگامی که موش‌های دریافت کننده pcDNA3.1.HPOL به

واکسن‌های DNA علی‌رغم توانائی تحریک سلول‌های T CD8+، برخلاف ناقلين ويروسى به دليل فقدان قابلیت تکثیر و میزان بیان محدود پروتئین موقفيت چشم‌گيری را كسب نکرده‌اند. استفاده از توالي‌های سازنده VLP به صورت فيوزن 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 اپی‌توب HCV core<sub>133-142</sub> و E1<sub>315-322</sub> در غیاب اپی‌توب-های کمکی CD4+ و در قالب واکسیناسیون با یک پلی DNA پلی توب نشان داده است [۴]. در این مطالعه علی‌رغم اینکه پتانسیل واکسن طراحی شده در برانگیختن پاسخ اختصاصی اپی-توب‌ها نشان داده شد، ولی پاسخ ایجاد شده از کارائی مورد انتظار برخوردار نبوده است. با توجه به مزایای بالقوه واکسن‌های DNA پلی توب و ضرورت افزایش ایمنی زائی این نوع واکسن، در تحقیق حاضر سعی شد که با اتصال توالی VLP ساز BALB/c انجام تزریقات به شیوه prime/boost ایمنی زائی واکسن HCV پلی توب طراحی شده با استفاده از چهار اپی‌توب غالب افزایش یافته و کمیت و کیفیت پاسخ‌های 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 Ag HBsAg و پپتید پلی توب) احتمالاً توانائی تشکیل خود به خود ذرات شیه ویروسی و ترشح به محیط کشت را همانند ذرات Ag 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 سلول-های ترانسفکت شده است. در عین حال نتایج ارزیابی‌های ایمونولوژیک واکسیناسیون با این پلاسمید به وضوح برتری آن را در مقایسه با پلاسمید فاقد ژن HBsAg در جهت فعل کردن سلول‌های T CD8+ اختصاصی اپی‌توب‌ها نشان داد. از آنجا که ارزیابی نیمه کمی بیان دو پلاسمید pcDNA3.1.POL و pcDNA3.1.HPOL ب— روش semiquantitative RT-PCR 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، متفقی است. در عوض این تفاوت معنی‌دار در ایمنی زائی می‌تواند ناشی از ساخت و ترشح ذرات باشد که جذب بهتر آنها را توسط سلول‌های حرفة‌ای عرضه کننده آنتی ژن

ترشح سایتوکاین‌های پیش برنده پاسخ Th1 به علت اپی توب‌های کمکی HBsAg در واکسیناسیون DNA قبل نشان داده شده بود [۳۵]. در این حالت لتفوسيت‌های T احتمالاً تحت اثر سایتوکاين‌ها و يا واکنش متقاطع (cross reactivity) با اپی توب‌های HBsAg فعال شده و در نهايٰت منجر به تقويتٰ كيفيت و كميٰت پاسخ سلولی علیه پلی توب می‌گردد. به طور خلاصه، در تحقيق حاضر بر اساس ارزیابی‌های ايمونوافورماتیک توالي پلی توب جدیدی متشکل از چهار اپی توب غالب موشی و انسانی متعلق به نواحی ساختمانی و غير ساختمانی ويروس هپاتیت سی طراحی و ساخته شده و پاسخ سلول‌های CD8+ T اختصاصی علیه اپی توب‌های H-2<sup>d</sup> گنجانده شده پس از واکسیناسیون موش BALB/c مورد ارزیابی قرار گرفت.

### نتیجه گیری

نتایج این تحقیق به وضوح کارائی اتصال Ag به توالي پلی توب و رژیم تزریقی DNA-prime/peptide-boost را در کنار استفاده از اجوانات‌های سازگار در انسان به عنوان دو استراتژی قدرتمند برای افزایش اینمی زائی واکسن پلی توب علیه HCV در غیاب اپی توب‌های CD4+ ويروس نشان داد. به دنبال نتایج اميدوار کننده این مطالعه، هم اکنون ارزیابی ايمونولوژیکی پاسخ ایجاد شده علیه اپی توب‌های انسانی گنجانده شده (E<sub>6</sub> و N) با استفاده از موش تاریخته دارای HLA-A2 در حال انجام است.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه تحت حمایت مالی انتستیتو پاستور ایران انجام شد.

عنوان يادآور با پیتید سنتیک مخلوط شده با اجوانات اینمن شدند، پاسخ قوی سلول‌های CD8+ با غلبه Th1 ایجاد شد (شكل شماره ۳-ب و ج). در تأیيد این مشاهده مطالعات کیتیک نیز نشان داده‌اند که استفاده از رژیم‌های تزریقی گوناگون که مسیرهای مختلف عرضه آنتی ژن را درگیر می‌کنند می‌تواند به القاء پاسخ‌های قوی تر سلول CD8+ متوجه شود [۳۶]. همچنین نتایج، به دست آمده در تأیید گزارشات قبلی [۲۰] می‌بین عدم کارائی اینمن سازی اولیه سلول‌های T با استفاده از واکسیناسیون پیتیدی بوده و نشان داد که واکسیناسیون pcDNA3.1.HPOL (DNA) قادر به ایجاد سلول‌های CD8+ اختصاصی و برانگیختن پاسخ خاطره-ای Th1 می‌باشد؛ به طوری که این پاسخ می‌تواند به دنبال واکسیناسیون يادآور با پیتید 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 به این توب‌های C و E<sub>4</sub> 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 می‌شوند. به طور خلاصه نتایج چالش آزمائی این تحقیق هم‌سو با گزارشات قبلی [۳۰] از طرفی بر اهمیت کمک سلول‌های T CD4+ در ایجاد پاسخ‌های محافظت سلول‌های HCV علیه CD4+ تاکید نمود و از طرف دیگر نشان داد که الزاماً منبع آنتی ژنی برای تحریک سلول‌های CD4+ نباید متعلق به همان پاتوزن یا ایمونوژن باشد [۱۶،۱۱]؛ به طوری که در این مطالعه به 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، فعل کردن سلول‌های T غیر اختصاصی اپی توب‌ها (bystander activation) نیز می‌تواند توضیح دیگری برای اینمی زائی بیشتر پلاسمید پلی توب متصل به HBsAg باشد.

### 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.

- [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, Still 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] Dolganicu 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; 24(16): 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. 3<sup>rd</sup> 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.

- [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.