

## Designing and Construction of a Multiepitope-Based DNA Vaccine to Induce Protective Immunity against Hepatitis C Virus

Leila Pishraft Sabet<sup>1\*</sup>, Katayoun Samimi Rad<sup>2</sup>, Azam Bolhasani<sup>3</sup>, Mahin Ahangar-Oskouee<sup>4</sup>

1- PhD in Medical Virology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

2- Associate Professor, Department of Virology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Assistant Professor, Hepatitis and HIV Laboratory, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

4- Assistant Professor, Department of Microbiology and Virology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Received: 10 Nov 2015, Accepted: 13 Jan 2016

### Abstract

**Background:** Hypervariability of hepatitis C virus (HCV) proteins is an important obstacle to design an efficient vaccine for the infection. To construct a protective vaccine against HCV, a DNA vaccine containing conserved epitopes of the virus was designed. To enhance the induced immune responses, adjuvant activity of N-terminal domain of gp96 (NT(gp96)) was used.

**Materials and Methods:** A multi-epitope (PT) DNA vaccine encoding four HCV immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes (HLA-A2 and H2-D<sup>d</sup>) from Core, E2, NS3 and NS5B antigens in addition to a T-helper CD4<sup>+</sup> epitope from NS3 protein and a B-cell epitope from E2 protein was designed and constructed. Then, NT(gp96) was fused to the PT DNA (PT-NT(gp96)). The stimulated cellular and humoral immune responses of PT and PT-NT(gp96) were evaluated in mice model.

**Results:** According to multicolor flow cytometry assay, the frequency of CD8<sup>+</sup> T-cells producing IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  in the splenocytes of immunized mice with PT-NT(gp96) (6.8%, 4%) was significantly higher than those of immunized with PT (0.9% , 0.8%), respectively. The same results have obtained in hepatic lymphocytes of the vaccinated mice. The level of IgG, IgG1 and IgG2a in the mice vaccinated with PT-NT (gp96) was significantly higher than the value obtained from the mice immunized with PT.

**Conclusion:** The results showed that PT DNA vaccine induces immune responses in mice model. Fusion of NT (gp96) to PT DNA vaccine causes to enhance cellular and humoral immune responses against HCV compared to sole PT vaccine.

**Keywords:** DNA Vaccine, Epitope, gp96, Hepatitis C virus

\*Corresponding Author:

Address: Razi Vaccine and Serum Research Institute, karaj, Iran.

Email: lp\_sabet@yahoo.com

## طراحی و ساخت واکسن DNA چند اپی توپی برای ایجاد ایمنی محافظت کننده علیه ویروس هپاتیت C

لیلا پیشرفت ثابت<sup>۱\*</sup>، کتابون صمیمی راد<sup>۲</sup>، اعظم بوالحسینی<sup>۳</sup>، مهین آهنگر اسکویی<sup>۴</sup>

۱- دکترای تخصصی ویروس شناسی پزشکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران.

۲- دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- استادیار، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۴- استادیار، گروه میکروبیولوژی و ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۳

### چکیده

**زمینه و هدف:** تغییرپذیری ویروس هپاتیت C (HCV) مهم‌ترین مشکل در فرآیند تهیه واکسن علیه این عفونت می‌باشد. در این مطالعه تجربی، برای ساخت واکسن حفاظت کننده علیه HCV، ساختار DNA دربرگیرنده اپی‌توپ‌های حفاظت شده از پروتئین‌های ویروسی طراحی و ساخته شد. به منظور تقویت پاسخ ایمنی القاء شده، از خاصیت ادجوانتی انتهای آمین gp96 (NT(gp96)) استفاده گردید.

**مواد و روش‌ها:** واکسن چنداپی توپی (PT) HCV کدکننده چهار اپی توپ ایمونودومینانت لئوسیت‌های T سیتوتوکسیک (HLA-A2 و H2-D<sup>d</sup>) از آنتی ژن‌های Core، E2، NS3 و NS5B، به همراه یک اپی توپ Th CD4+ از NS3 و یک اپی توپ B-cell از E2 طراحی و ساخته شد. سپس NT(gp96) به DNA PT متصل گردید (PT-NT(gp96)). پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال برانگیخته شده با ساختار PT و PT-NT(gp96) در مدل موشی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** مطابق سنجش فلوسیتومتری چند رنگی، فراوانی سلول‌های T-CD8<sup>+</sup> تولیدکننده IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  در سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده با PT-NT(gp96) (۶/۸ درصد و ۴ درصد) نسبت به گروه ایمن شده با PT (۰/۹ درصد و ۰/۸ درصد) افزایش معنی‌داری را نشان داد. نتایج مشابهی در بررسی لئوسیت کبد موش‌های واکسینه شده به دست آمد. میزان IgG، IgG1 و IgG2a در موش‌های واکسینه شده با PT-NT(gp96) به طور معنی‌داری از موش‌های ایمن شده با PT بالاتر بود ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد ساختار PT قادر به القای پاسخ ایمنی در مدل موشی می‌باشد. اتصال NT(gp96) به ساختار PT به طور مؤثری سبب تقویت پاسخ ایمنی هومورال و سلولی علیه HCV در مقایسه با واکسن PT می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** واکسن DNA، اپی توپ، gp96، ویروس هپاتیت C

\* نویسنده مسئول: ایران، کرج، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

Email: lp\_sabet@yahoo.com

## مقدمه

ویروس هپاتیت C یک عامل مهم هپاتیت مزمن ویروسی است که حدود ۱۳۰ تا ۱۷۰ میلیون از جمعیت جهانی به آن مبتلا هستند. بیش از ۷۵ درصد افراد آلوده به عفونت مزمن مبتلا می‌شوند که این افراد در خطر توسعه سیروز و کارسینوم هپاتوسلولار می‌باشند. ژنوم HCV RNA تک رشته‌ای با سنس مثبت است که سه پروتئین ساختمانی (E1، E2، Core)، و هفت پروتئین غیر ساختمانی (NS2، NS3، NS4A، NS4B، NS5A و NS5B) را کد می‌کند (۱).

تغییرپذیری بالای ویروس هپاتیت C و وجود اپی توپ‌های سرکوب کننده سیستم ایمنی در برخی از پروتئین‌های آن از مهم‌ترین چالش‌های تهیه یک واکسن مؤثر علیه HCV می‌باشد. واکسن‌های چند اپی توپی در برگزیده اپی توپ‌های حفاظت شده سلول‌های B و T می‌توانند رویکرد امید بخشی برای توسعه واکسن علیه عفونت HCV باشند. مطالعاتی در جهت طراحی واکسن‌های چند اپی توپی برای عوامل عفونی از جمله ویروس هپاتیت C انجام شده‌اند. این مطالعات توانایی این نوع واکسن‌ها را در ایجاد ایمنی برای هپاتیت C نشان داده‌اند (۵-۲). ناپایداری ساختارهای DNA چند اپی توپی بعد از بیان شدن و هم‌چنین عدم وجود ساختار سوم منجر به کارآیی محدود این نوع واکسن‌ها می‌شود (۷-۵) که با استفاده از راه‌کارهایی از جمله به کارگیری یک ناقل و یا ادجوانت مناسب می‌توان پاسخ‌های ایمنی برانگیخته شده علیه این ساختارها را تقویت نمود.

پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) به عنوان یک ادجوانت توانمند در ایمونوتراپی علیه تومورها و بیماری‌های عفونی و توسعه واکسن مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. اثر ادجوانتی gp96 با واکسن‌های تجربی بیماری‌های عفونی از قبیل ویروس هپاتیت B و ویروس پاپیلوما‌ی انسانی (HPV) تأیید شده است (۱۰-۸). بررسی‌ها نشان داده‌اند که پروتئین gp96 به عنوان یک چاپرون در لومن شبکه رتیکولوم اندوپلاسمیک بوده و در عرضه متقاطع پپتیدها به MHC کلاس I و II نقش دارد و منجر

به فعال شدن سلول‌های T CD8+ و T CD4+ می‌شود (۱۱)، (۱۲). هم‌چنین gp96 از طریق القاء سیتوکین‌های التهابی منجر به فعال شدن سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها می‌گردد (۱۳).

شواهد حاکی است که ساختارهای الحاق شده به gp96 منجر به افزایش توانمندی واکسن‌های DNA می‌شوند (۱۴). عملکرد ادجوانتی بخش انتهایی آمین gp96 (NT(gp96)) در القاء پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی علیه HBV و تومورها نیز نشان داده شده است (۱۵، ۱۶). در این مطالعه، ابتدا یک ساختار DNA چند اپی توپی (PT) علیه عفونت HCV طراحی گردید. به منظور افزایش توانمندی PT، از اثر ادجوانتی NT(gp96) استفاده گردید. ساختار DNA چند اپی توپی (PT) به NT(gp96) متصل گردید و ایمنی‌زایی واکسن DNA چند اپی توپی و ساختار الحاق شده آن با NT(gp96) در مدل موشی مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

## ساخت و ارزیابی DNA چند اپی توپی (PT) اتصال یافته با NT(gp96)

طراحی درون-رایانه‌ای و جزئیات ساخت واکسن DNA چند اپی توپی (PT) استفاده شده در این مطالعه تجربی، تأیید بیان آن در شرایط آزمایشگاهی و هم‌چنین ارزیابی اولیه ایمنی‌زایی آن در یک مطالعه قبلاً توضیح داده شده است (۱۷). به طور خلاصه، یک DNA چند اپی توپی کدکننده اپی توپ‌های محدود به H2-D<sup>l</sup> از Core (۱۸، ۱۹) و E2 (۲۰)، اپی توپ‌های محدود به HLA-A2 از NS3 و NS5B (۲۱)، یک اپی توپ T کمکی CD4 از NS3 (۲۲) و یک اپی توپ سلول B از E2 (۲۳) طراحی گردید. موقعیت اپی توپ‌ها و توالی آن‌ها در جدول ۱ آمده است. ساختار DNA PT به صورت کلون شده در پلاسمید pBluescript توسط شرکت بیوماتیک (کانادا) ساخته شد. به منظور تهیه پلاسمید pcDNA-PT، هضم آنزیمی توالی PT (در پلاسمید pBluescript) و پلاسمید pcDNA3.1(-) (اینویتروزن، آلمان) با آنزیم‌های

محدودالاثرب *HindIII* و *BamHI* انجام شد. الحاق قطعات هضم شده با استفاده از آنزیم *T4DNA ligase* انجام شد.

جدول ۱. اپی توپ های تشکیل دهنده ساختار DNA پلی توپی، موقعیت و توالی آن ها

پروتئین	موقعیت اسید آمینه	HLA	توالی پپتید
NS3	۱۰۷۳-۱۰۸۱	HLA-A2	CINGVCWTV
NS5B	۲۷۲۷-۲۷۳۵	HLA-A2	GLQDCTMLV
NS3	۱۲۴۸-۱۲۶۲	HLA-DR	GYKVLVNLNPSVAAT L
Core	۱۳۲-۱۴۲	HLA-A2 و H2-D <sup>d</sup>	DLMGYIPLVGA
E2	۴۰۵-۴۱۴	H2-D <sup>d</sup>	SGPSQKIQLV
E2	۴۱۲-۴۲۶	اپی توپ سلول B	QLINTNGSWHINSTA

### ایمن سازی موش ها

۱۲ موش CB6F1 (ژنوتیپ H-2d/b) به طور تصادفی به ۳ گروه ۴ تایی تقسیم شدند. در تمامی مراحل، کارهای انجام شده بر روی حیوانات مطابق با قوانین توصیه شده کار با حیوانات آزمایشگاهی بود. یک گروه از موش ها با *pcDNA-PT-* و گروه دیگر با *pcDNA-PT-NT(gp96)* ایمن شدند. سه بار تزریق با ۱۰۰ میکروگرم پلاسمید در فاصله زمانی ۲ هفته و به صورت داخل عضلانی انجام شد. یک هفته قبل از اولین تزریق، ۱۰۰ میکرولیتر کاردیوتوکسین (لاتوکسان، فرانسه) (۱۰ میکرومول در بافر فسفات سالیین (PBS) به عضله قدامی درشت نی پای موش ها تزریق شد. یک گروه از موش ها نیز به صورت ناآزموده بدون هیچ تزریقی به عنوان کنترل نگهداری شدند. دو هفته بعد از تزریق سوم، موش ها از نظر ایمنی سلولی و هومورال مورد بررسی قرار گرفتند.

### جداسازی لنفوسیت های طحال

سوسپانسیون تک سلولی مطابق دستورالعمل مربوطه از بافت طحال موش ها تهیه شد (۲۴). به طور خلاصه، ابتدا موش ها با ایزوفلوران بی هوش شدند و از طریق جا به جایی مهره های گردنی کشته شدند. طحال موش جدا شده، پس از له کردن از یک صافی با منافذ ۷۰ میکرومتری عبور داده شد. سلول های تک تهیه شده از طحال، دو بار با PBS شستشو داده شدند. پس از شمارش سلول ها با تریپان بلو، سوسپانسیونی از سلول های طحال در غلظت  $2 \times 10^7$  سلول بر میلی لیتر در محیط RPMI (شرکت گییکو، آلمان) کامل

به منظور ساخت *pcDNA-PT-NT(gp96)* ابتدا ناحیه نوکلئوتیدی ۱ تا ۱۰۱۴ از پروتئین شوک حرارتی *gp96* (*NT(gp96)*) (اهدایی آزمایشگاه ایمنولوژی و واکسن انستیتو پاستور ایران) در پلاسمید *pcDNA3.1(-)* کلون گردید. بدین طریق که پس از هضم آنزیمی *NT(gp96)* و پلاسمید *pcDNA3.1(-)* با آنزیم های *BamHI* و *KpnI*، الحاق قطعات هضم شده با آنزیم *T4 DNA ligase* صورت گرفت (*pcDNA-NT(gp96)*). به منظور ایجاد محل آنزیمی *NheI* در انتهای ۵' توالی *PT*، تکثیر *PT* با پرایمرهای طراحی شده (پیش رو: *ATTGCTAGCACCATGGGCCAACTGATCAAC* و پس رو: *TATGGATCCCACCAGTTGGATTTTCTG*)، محل های آنزیمی *NheI* و *BamHI* به ترتیب در پرایمرهای پیش رو و پس رو به صورت پر رنگ نشان داده شده اند) انجام شد. سپس ساختار *PT* تکثیر یافته در محل های آنزیمی *NheI* و *BamHI* از پلاسمید *pcDNA-NT(gp96)* کلون گردید.

کلون های حاصل با استفاده از هضم آنزیمی و تعیین سکانس مورد تأیید قرار گرفتند. برای ایمن سازی موش ها، پلاسمیدهای *pcDNA-PT-* و *pcDNA-PT-NT(gp96)* با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید عاری از اندوتوکسین (کیژن، آلمان) تخلیص شدند.

سانتی گراد در مجاورت محلول Cytotfix/Cytoperm (بی دی فارمین ژن، آلمان) قرار داده شدند. پس از شست و شو با بافر Perm/Wash 1X (بی دی فارمین ژن)، سلول ها ۲۰ دقیقه با آنتی بادی سیتوکین های داخل سلولی anti-IFN $\gamma$  (ای بیوساینس) و anti-TNF $\alpha$  (ای بیوساینس) رنگ آمیزی شدند و در پایان با دستگاه فلوسیتومتر (Becton Gallios Coulter) بررسی شدند. حداقل ۱۰۰۰۰۰ سلول شمرده شد. تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار FlowJo (Tree Star) انجام گرفت.

### تعیین ایزوتیپ آنتی بادی

دو هفته بعد از سومین ایمن سازی، موش ها از طریق قسمت رترو-اریتال خون گیری شدند. سرم ها از نمونه های خون کامل هر موش با انکوباسیون نمونه خون به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سپس سانتریفوژ آن در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه تهیه شد. سرم های هر گروه از موش ها مخلوط شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. میزان آنتی بادی های IgG و ایزوتیپ های IgG1 و IgG2a اختصاصی علیه اپی توپ تولید کننده آنتی بادی (اپی توپ E2<sub>412-426</sub>) در سرم موش ها با استفاده از الیزا اندازه گیری شد (۲۵). به طور خلاصه، پلیت الیزا با ۱۰۰ میکرولیتر از پپتید E2<sub>412-426</sub> (غلظت ۱۰ میکروگرم در میکرولیتر از پپتید در بافر کربنات-بی کربنات ۰/۵ مولار، pH=۹/۶) پوشش داده شد و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پلیت با PBS حاوی ۰/۰۵ درصد از Tween 20 (PBS-T) شست و شو داده شد و با بافر بلوک کننده (PBS) حاوی ۵ درصد (Skim milk) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از شست و شو با PBS-T، سرم رقیق شده (۱:۵۰) به پلیت افزوده شد و برای ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس پلیت شست و شو داده شد و به مدت ۲ ساعت با آنتی بادی IgG1، IgG2a و HRP (شرکت ساترن بیوتکنولوژی، آمریکا) رقیق (به میزان ۱:۴۰۰۰) انکوبه گردید. مرحله ظهور با سوبسترای TMB

(محیط کشت RPMI +۱۰ درصد سرم گوساله (سرم جنین گاوی) + ۱۰ واحد استرپتومایسین-پنی سیلین) تهیه گردید. ۱×۱۰<sup>۶</sup> سلول طحال از هر موش، در چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه ته صاف کشت داده شد و با ۱۰۰ میکرولیتر از پپتیدهای اپی توپ های محدود به H2-D<sup>d</sup> (E2 405-414, Core<sub>132-142</sub>) در غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر به طور جداگانه در شرایط آزمایشگاهی تحریک شد. سلول ها برای مدت ۶ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در حضور ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. قبل از رنگ آمیزی سیتوکین های داخل سلولی، مجدداً سلول های طحال به مدت ۵ تا ۶ ساعت با پپتیدها و در مجاورت  $\alpha$ -CD28 (شرکت بی دی فارمین ژن، آلمان) و برفلدین A (شرکت ای بیوساینس، آلمان) کشت داده شدند.

### جداسازی لنفوسیت های کبد

جدا کردن لنفوسیت های بافت کبدی مطابق دستورالعمل انجام شد (۲۴). به طور خلاصه، کبد موش ها پس از تکه تکه شدن، از صافی با منافذ ۷۰ میکرومتری عبور داده شدند. سلول ها پس از شست و شوی، برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محلول آنزیم حاوی DNAase و کلاژناز نوع ۲ (Aldrich، سیگما) انکوبه گردیدند. سپس لنفوسیت ها با استفاده از محلول پرکول ۴۰ درصد (Aldrich، سیگما) جدا شدند. میزان زنده بودن سلول ها با استفاده از تریپان بلو تعیین گردید. برای آماده شدن سلول ها برای رنگ آمیزی سیتوکین های داخل سلولی، ۱×۱۰<sup>۶</sup> سلول کبد هر موش به مدت ۵ تا ۶ ساعت با پپتیدها و در مجاورت  $\alpha$ -CD28 و برفلدین A کشت داده شدند.

### رنگ آمیزی سیتوکین های داخل سلولی

سلول های طحال و کبد به دست آمده از مراحل قبل، ابتدا با نشان گرهای سطحی anti-CD8 (ای بیوساینس، آلمان) و anti-CD4 (ای بیوساینس، آلمان) رنگ آمیزی شدند. برای جدا کردن سلول های مرده از Fixable FVD (Viability Dye) استفاده شد. سلول ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در مجاورت نشان گرهای سطحی انکوبه شدند. سپس برای فیکس کردن و نفوذپذیر نمودن، سلول ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه

ساختار DNA چند اپی توپی (PT) با ۲۵۲ نوکلئوتید و متشکل از ۶ اپی توپ طراحی و ساخته شد. بدین ترتیب، سه اپی توپ HLA-A2، دو اپی توپ H2-D<sup>d</sup>، یک اپی توپ سلولهای B و یک اپی توپ Th1 در ساختار DNA چند اپی توپی تعبیه گردید. اپی توپ Core 132-142 به صورت هم پوشان دارای یک اپی توپ H2-D<sup>d</sup> و یک اپی توپ HLA-A2 می باشد. نمای شماتیک ترادف اسید آمینه اپی توپها در شکل ۱ نشان داده شده است.

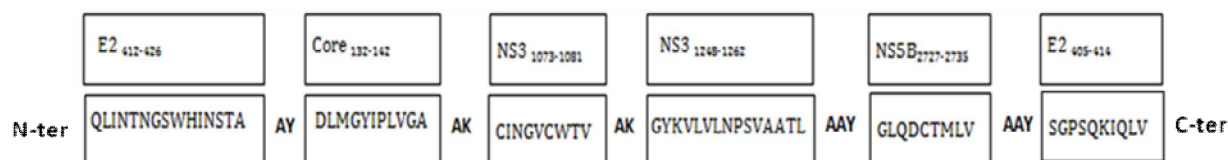
(تترامیتیل بنزیدین) انجام شد و جذب نوری (OD) در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد.

### تحلیل آماری

برای ارزیابی های آماری و رسم منحنی از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۵ استفاده شد. تحلیل آماری با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه آنووا انجام شد. p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته ها

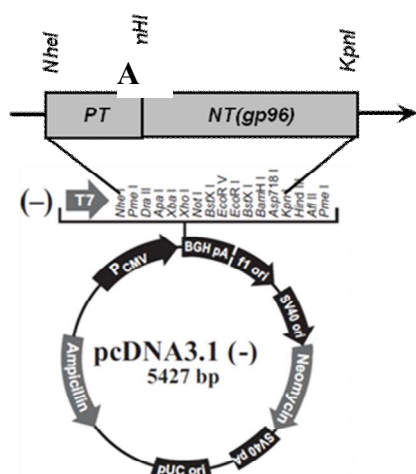
ساخت و آنالیز DNA چند اپی توپی (PT) فیوز شده به NT(gp96)



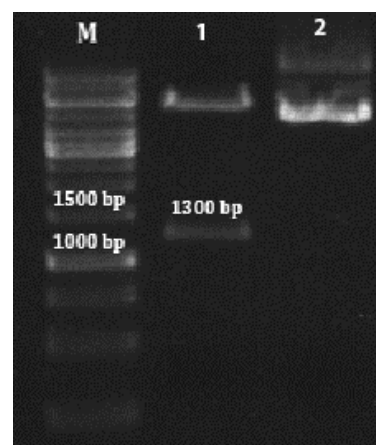
شکل ۱. نمای شماتیک ترادف اپی توپها در ساختار DNA پلی توپی به همراه توالی های جدا کننده موقعیت اپی توپها در پروتئین های ویروس هپاتیت C و همچنین توالی آنها در بلوک های جداگانه نشان داده شده اند.

NT(gp96) و مراحل کلونینگ آن با استفاده از هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید گردید که نتیجه هضم آنزیمی کلون نهایی با آنزیمهای *NheI* و *KpnI* در شکل ۲B آمده است.

توالی NT(gp96) با ۱۰۱۴ نوکلئوتید به انتهای ۳' از توالی PT الحاق گردید. موقعیت توالی PT و NT(gp96) در پلاسمید pcDNA3.1(-) در شکل ۲A نشان داده شده است. صحت ساختار کلون pcDNA-PT-



B



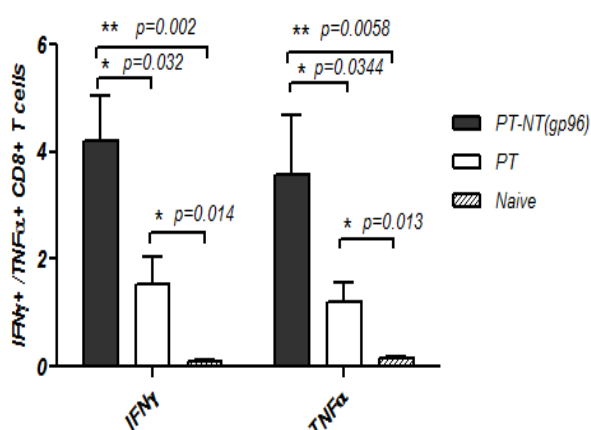
شکل ۲. A. موقعیت توالی PT و NT(gp96) در پلاسمید pcDNA3.1(-)

B. هضم آنزیمی pcDNA-PT-NT(gp96) با دو آنزیم *NheI* و *KpnI*. M. نشانگر DNA. ردیف ۱: pcDNA-PT-NT(gp96) بعد از هضم با دو آنزیم *NheI* و *KpnI*، ردیف ۲: pcDNA-PT-NT(gp96) قبل از هضم آنزیمی

### پاسخ سلول‌های T CD8+ اختصاصی در لنفوسیت‌های کبد موش‌های ایمن شده

از آن‌جا که کبد عضو اصلی برای تکثیر HCV می‌باشد، میزان پاسخ سلول‌های T CD8+ برانگیخته شده توسط دو ساختار PT و PT-NT(gp96) در کبد موش‌های ایمن شده مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان سلول‌های T CD8+ ترشح کننده سیتوکین‌های IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  پس از تحریک با پپتیدها اندازه‌گیری شد. همان‌طور که شکل ۴ نشان می‌دهد، پس از تحریک با پپتید E2 سیتوکین ترشح شده از سلول‌های T CD8+ به طور غالب IFN- $\gamma$  و بعد از آن TNF- $\alpha$  می‌باشد. میانگین فرکانس سلول‌های T CD8+ تولید کننده IFN- $\gamma$  یا TNF- $\alpha$  در دو گروه موش ایمن شده به طور معنی‌داری بالاتر از موش‌های گروه کنترل منفی بود. نتایج نشان داد که ایمن سازی با PT-NT(gp96) پاسخ قوی‌تری نسبت به PT القا می‌کند. میانگین در صد سلول‌های T CD8+ برای IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  در کبد موش‌های ایمن شده با PT-NT(gp96) (به ترتیب ۴/۲ درصد و ۳/۶ درصد) به طور معنی‌داری بالاتر از مقادیر به دست آمده در گروه موش ایمن شده با PT (به ترتیب ۱/۶ درصد و ۱/۲ درصد) می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

پاسخ ایمنی سلول‌های T CD8+ کبدی علیه اپی توپ Core همانند سلول‌های طحال قابل شناسایی نبود.



شکل ۴. پاسخ سلول‌های T CD8+ تولید کننده IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  علیه اپی توپ E2<sub>405-414</sub> در سلول‌های کبد موش‌های ایمن شده

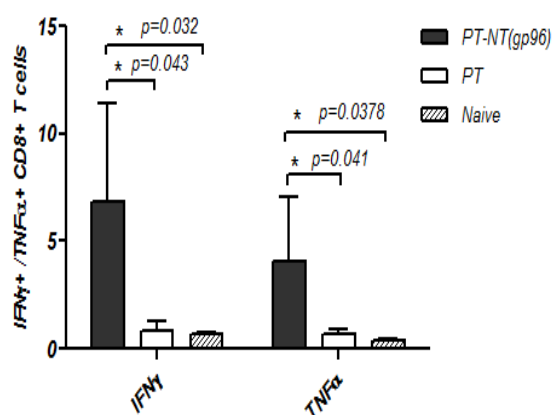
نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است. \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ).

### پاسخ سلول‌های T CD8+ اختصاصی در لنفوسیت‌های طحال موش‌های ایمن شده

همان‌طور که شکل ۳ نشان می‌دهد، میزان لنفوسیت‌های T CD8+ تولید کننده IFN- $\gamma$  در موش‌های ایمن شده با PT-NT(gp96) نسبت به گروه ایمن شده با PT و کنترل منفی به طور معنی‌داری افزایش یافت. میانگین پاسخ IFN- $\gamma$  پس از تحریک سلول‌های طحال با اپی توپ E2، در گروه ایمن شده با PT-NT(gp96)، ۶/۸ درصد به دست آمد که به طور معنی‌داری بالاتر از پاسخ به دست آمده در موش‌های ایمن شده با PT (۰/۹ درصد) بود.

نتایج مشابهی برای TNF- $\alpha$  به دست آمد. درصد سلول‌های T CD8+ ترشح کننده TNF- $\alpha$  علیه اپی توپ E2 در موش‌های ایمن شده با PT-NT(gp96)، ۴ درصد می‌باشد که به طور معنی‌داری بالاتر از ۰/۸ درصد به دست آمده در گروه ایمن شده با PT می‌باشد ( $p < 0.05$ ) (شکل ۳).

میزان لنفوسیت‌های تولید کننده IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  پس از تحریک سلول‌های طحال با اپی توپ Core<sub>132-142</sub> تفاوت معنی‌داری را در بین گروه‌های ایمن شده نشان نداد (اطلاعات نشان داده نشده است).



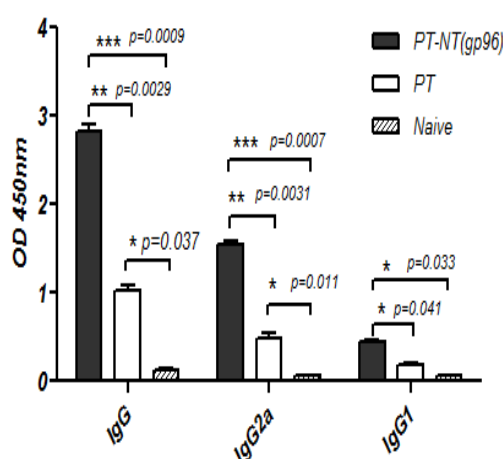
شکل ۳. پاسخ سلول‌های T CD8+ تولید کننده IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  علیه اپی توپ E2<sub>405-414</sub> از سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است. \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

## ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال

در بخش دیگری از این مطالعه، اثر ادجوانتی الحاق (gp96) NT در القاء پاسخ ایمنی هومورال اختصاصی اپی توپ E2<sub>412-426</sub> از HCV تعیین گردید. میزان آنتی بادی اختصاصی در سرم موش های ایمن شده دو هفته پس از سومین ایمن سازی اندازه گیری شد. همان طور که شکل ۵ نشان می دهد، میزان آنتی بادی IgG total در موش های ایمن شده با PT-NT(gp96) به طور معنی داری بالاتر از موش های واکسینه شده با PT می باشد ( $p < 0.001$ ) و میزان این آنتی بادی در این دو گروه به طور معنی داری از میزان به دست آمده در موش های گروه ناآزموده بالاتر می باشد.

تشخیص ایزوتیپ IgG در سرم موش ها مشخص کرد که ایمن سازی با PT و PT-NT(gp96) به طور غالب منجر به ایجاد آنتی بادی IgG2a می شود (شکل ۵) و موش های ایمن شده با PT-NT(gp96) به طور معنی داری تیتري بالاتر از گروه PT ایجاد می کنند ( $p < 0.001$ ). پاسخ آنتی بادی IgG1 ایجاد شده در گروه های واکسینه شده نیز بسیار ضعیف بود. بدین طریق نتایج نشان داد که این ساختارها غالباً پاسخ های ایمنی را در موش های واکسینه شده به سمت Th1 سوق می دهند.



شکل ۵. پاسخ آنتی بادی اختصاصی (IgG total, IgG1 و IgG2a) علیه اپی توپ E2<sub>412-426</sub> در گروه های واکسینه شده نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده است. \* نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه می باشد. ( $p < 0.05$ ); (\*\*  $p < 0.01$ ); (\*\*\*)  $p < 0.001$ )

## بحث

استفاده از واکسن های DNA چند اپی توپی رویکرد نوید بخشی برای القاء پاسخ های ایمنی بی خطر و مؤثر علیه پاتوژن های بسیار متغیر از جمله HCV می باشد (۲۶). به تازگی، توانایی القاء پاسخ CTL علیه دو اپی توپ HCV (core<sub>133-144</sub> و E1<sub>315-322</sub>) در قالب ایمنی زایی با یک DNA چند اپی توپی نشان داده است (۲۷). در این مطالعه، علیرغم توانایی ساختار طراحی شده در برانگیختن پاسخ های ایمنی اختصاصی اپی توپ ها، پاسخ ایجاد شده از کارآیی مورد انتظار برخوردار نبود. با توجه به مزایای بالقوه واکسن های DNA چند اپی توپی و ضرورت افزایش ایمنی زایی این نوع واکسن ها، در بررسی حاضر سعی گردید از طریق طراحی درون-رایانه ای واکسن چند اپی توپی و استفاده از یک ادجوانت مناسب ایمنی زایی واکسن DNA چند اپی توپی طراحی شده (PT) تقویت گردد. در یک بررسی، معماران ژادیان و همکاران از طریق اتصال توالی VLP ساز HBsAg ایمنی زایی واکسن اپی توپی طراحی شده را تقویت نمودند (۵). نتایج قبلی نشان داده اند که اتصال آنتی ژن با پروتئین های شوک حرارتی مثل gp96 یا بخش هایی از آن توانسته است ایمنی زایی پروتئین متصل به آن را افزایش دهد (۲۸، ۲۹). بنابر این، در این مطالعه، خصوصیت ادجوانتی قطعه انتهای آمین gp96 در افزایش ایمنی زایی واکسن های DNA چند اپی توپی اختصاصی HCV ارزیابی گردید.

در مطالعه حاضر، بررسی پاسخ های ایمنی سلولی و هومورال القاء شده در اثر واکسن های ساخته شده نشان داد که ساختار PT به طور مؤثری قادر به القای پاسخ ایمنی در مدل موشی می باشد. با اتصال ساختار PT به NT(gp96) پاسخ ایمنی سلولی و هومورال برانگیخته شده به طور معنی داری در مقایسه با PT افزایش پیدا کرد. یافته فوق در راستای نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی است که نشان می دهند الحاق آنتی ژن های اختصاصی HBV با انتهای آمین gp96 می تواند توان مندی واکسن های DNA HBV را افزایش دهد (۲۹، ۳۰). محیط و همکاران نیز نشان دادند که



واکسن های DNA کد کننده آنتی ژن E7 پاپیلومای انسانی که به NT(gp96) متصل گردید، به طور معنی داری پاسخ ایمنی اختصاصی نسبت به E7 را در مقایسه با پاسخ ایمنی علیه واکسن حاوی ژن E7 بدون ادجوانت افزایش می دهد (۹). عرضه متقاطع آنتی ژن متصل شده به gp96 و فعال شدن سلول های عرضه کننده آنتی ژن (APC) برای تحریک CTL های اختصاصی از جمله مکانیسم هایی است که منجر به افزایش توانمندی ساختار متصل به NT(gp96) می شود. هم چنین، CD91 که به عنوان گیرنده gp96 به کار می رود، عرضه متقاطع آنتی ژن الحاق شده را تسهیل می کند (۳۱).

کبد محل اصلی تکثیر ویروس هپاتیت C است. مطالعات قبلی نشان داده اند که سلول های T CD8+ ترشح کننده IFN- $\gamma$  اختصاصی HCV در کبد شامپانزه های پاک شده در مقایسه با آن هایی که عفونت در آن ها مزمن شده است، فراوان تر است (۳۲). کوپر و همکاران بیان کردند که پاک شدن عفونت هپاتیت C حاد در مدل شامپانزه با یک پاسخ زود هنگام CTL درون کبدی علیه پروتئین های HCV مرتبط است (۳۳). یافته های مطالعه حاضر نشان داد که NT(gp96) منجر به افزایش پاسخ CTL ها و فراوانی سلول های T CD8+ تولید کننده سیتوکین های IFN- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  در کبد موش های ایمن شده می شود.

گزارش شده است که یک واکسن مؤثر برای HCV باید علاوه بر پاسخ های ایمنی سلولی، آنتی بادی های خنثی کننده را علیه پروتئین های غشاء برانگیزاند (۳۴). این نوع واکسن احتمال پاک سازی ویروس را پس از این که فرد در معرض آن قرار گرفت، افزایش می دهد. اپی توپ E2<sub>412-426</sub> که در ساختار PT قرار داده شد، در بین ژنوتیپ های HCV حفاظت شده است و می تواند تولید آنتی بادی خنثی کننده را القاء نماید (۲۳، ۳۵). اندازه گیری پاسخ آنتی بادی علیه اپی توپ E2<sub>412-426</sub> در دو واکسن استفاده شده در این مطالعه نشان داد که هر دو ساختار، توانایی القاء پاسخ آنتی بادی در موش های ایمن شده را دارا می باشند. هم چنین مشخص شد که پاسخ ایمنی هومورال از

طریق الحاق NT(gp96) به ساختار PT به طور معنی داری افزایش می یابد. نتایج به دست آمده از این بخش پژوهش با نتایج به دست آمده از مطالعات مشابه در زمینه نقش NT(gp96) در القاء پاسخ ایمنی همخوانی دارد. لی و همکاران نشان دادند که NT(gp96) تا حدود زیادی پاسخ ایمنی هومورال القاء شده در اثر HBsAg را افزایش می دهد (۲۹). به علاوه چن و همکاران نقش NT(gp96) در تقویت پاسخ ایمنی هومورال اختصاصی اپی توپ های سلول های B ویروس سندرم تنفسی را در خوک نشان دادند (۳۶). در این مطالعه، نتایج ایزوتائپینگ IgG نشان داد که IgG2a آنتی بادی غالب در موش های ایمن شده بود و ساختار PT-NT(gp96) به طور معنی داری مقدار بیشتری IgG2a را در مقایسه با PT القاء نمود. این نتایج نشان می دهد که این کاندید واکسن ترجیحاً پاسخ های ایمنی نوع Th1 را تحریک می کند. لازم به ذکر است که عدم مشاهده پاسخ های ایمنی نسبت به اپی توپ Core<sub>132-142</sub> نیاز به بررسی های بیشتری دارد.

### نتیجه گیری

در این مطالعه، پس از طراحی یک واکسن DNA چند اپی توپی (PT)، فعالیت ادجوانتی NT(gp96) به عنوان یک راه کار در تقویت پاسخ ایمنی القاء شده علیه ساختار DNA چند اپی توپی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق به طور آشکار نشان داد که PT قادر به القای پاسخ ایمنی در موش های ایمن شده می باشد. هم چنین NT(gp96) به طور مؤثری قادر به افزایش پاسخ ایمنی سلولی و هومورال برانگیخته شده می باشد و کارآیی واکسن DNA چند اپی توپی علیه HCV در ساختار متصل شده با NT(gp96) به طور قوی افزایش می یابد. براساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، پیشنهاد می شود که پاسخ های ایمنی سلولی CTL علیه اپی توپ های HLA-A2 موجود در توالی PT در موش ترانس ژنیک در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

Scandinavian journal of immunology. 2012; 75(1): 27-37.

10. Wang S, Qiu L, Liu G, Li Y, Zhang X, Jin W, et al. Heat shock protein gp96 enhances humoral and T cell responses, decreases Treg frequency and potentiates the anti-HBV activity in BALB/c and transgenic mice. *Vaccine*. 2011; 29(37):6342-51.

11. Doody AD, Kovalchin JT, Mihalyo MA, Hagymasi AT, Drake CG, Adler AJ. Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I-and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. *The Journal of immunology*. 2004; 172(10):6087-92.

12. Javid B, MacAry PA, Lehner PJ. Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *The Journal of immunology*. 2007; 179(4):2035-40.

13. Yang Y, Liu B, Dai J, Srivastava PK, Zammit DJ, Lefrançois L, et al. Heat shock protein gp96 is a master chaperone for toll-like receptors and is important in the innate function of macrophages. *Immunity*. 2007; 26(2):215-26.

14. Chen C-H, Wang T-L, Hung C-F, Yang Y, Young RA, Pardoll DM, et al. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. *Cancer research*. 2000; 60(4):1035-42.

15. Baker-LePain JC, Sarzotti M, Fields TA, Li C-Y, Nicchitta CV. GRP94 (gp96) and GRP94 N-terminal geldanamycin binding domain elicit tissue nonrestricted tumor suppression. *The Journal of experimental medicine*. 2002; 196(11):1447-59.

16. Li H, Zhou M, Han J, Zhu X, Dong T, Gao GF, et al. Generation of murine CTL by a hepatitis B virus-specific peptide and evaluation of the adjuvant effect of heat shock protein glycoprotein 96 and its terminal fragments. *The Journal of immunology*. 2005; 174(1):195-204.

17. Sabet LP, Taheri T, Memarnejadian A, Azad TM, Asgari F, Rahimnia R, et al. Immunogenicity of Multi-Epitope DNA and Peptide Vaccine Candidates Based on Core, E2, NS3 and NS5B HCV Epitopes in BALB/c Mice. *Hepatitis monthly*. 2014; 14(10): e2215-6.

18. Löhr HF, Schmitz D, Arenz M, Weyer S, Gerken G, zum Büschenfelde K-HM. The viral clearance in interferon-treated chronic hepatitis

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت مالی دانشگاه

علوم پزشکی تهران کمال تشکر و امتنان را دارند.

## منابع

1. Roohvand F, Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, Part one: Advances in basic knowledge for hepatitis C virus vaccine design. Expert opinion on therapeutic patents. 2011; 21(12):1811-30.

2. Arashkia A, Roohvand F, Memarnejadian A, Aghasadeghi MR, Rafati S. Construction of HCV-polytope vaccine candidates harbouring immune-enhancer sequences and primary evaluation of their immunogenicity in BALB/c mice. *Virus genes*. 2010; 40(1):44-52.

3. Huang X-j, Lü X, Lei Y-f, Yang J, Yao M, Lan H-y, et al. Cellular immunogenicity of a multi-epitope peptide vaccine candidate based on hepatitis C virus NS5A, NS4B and core proteins in HHD-2 mice. *Journal of virological methods*. 2013; 189(1):47-52.

4. Yang Y, Kuang Y, Liu Y, Li W, Jiang Z, Xiao L, et al. Immunogenicity of multiple-epitope antigen gene of HCV carried by novel biodegradable polymers. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2011; 34(1):65-72.

5. Memarnejadian A, Roohvand F. Fusion of HBsAg and prime/boosting augment Th1 and CTL responses to HCV polytope DNA vaccine. *Cellular immunology*. 2010; 261(2):93-8.

6. Suhrbier A. Polytope vaccines for the codelivery of multiple CD8T-cell epitopes. *Expert review of vaccines*. 2002; 1(2):207-13.

7. Martin P, Simon B, Lone Y-C, 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*. 2008; 26(20):2471-81.

8. Bolhassani A, Zahedifard F, Taghikhani M, Rafati S. Enhanced immunogenicity of HPV16E7 accompanied by Gp96 as an adjuvant in two vaccination strategies. *Vaccine*. 2008; 26(26):3362-70.

9. Mohit E, Bolhassani A, Zahedifard F, Taslimi Y, Rafati S. The Contribution of NT-gp96 as an Adjuvant for Increasing HPV16 E7-Specific Immunity in C57BL/6 Mouse Model.

- C is associated with increased cytotoxic T cell frequencies. *Journal of hepatology*. 1999; 31(3): 407-15.
19. Shirai M, Okada H, Nishioka M, Akatsuka T, Wychowski C, Houghten R, et al. An epitope in hepatitis C virus core region recognized by cytotoxic T cells in mice and humans. *Journal of virology*. 1994; 68(5):3334-42.
20. Park S-H, Yang S-H, Lee CG, Youn J-W, 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.
21. Chang KM, Thimme R, Melpolder JJ, Oldach D, Pemberton J, Moorhead-Loudis J, et al. Differential CD4+ and CD8+ T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2001; 33(1):267-76.
22. Zhu F, Eckels DD. Functionally distinct helper T-cell epitopes of HCV and their role in modulation of NS3-specific, CD8+/tetramer positive CTL. *Human immunology*. 2002; 63(9):710-8.
23. Zhang P, Zhong L, Struble EB, Watanabe H, Kachko A, Mihalik K, et al. Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106(18):7537-41.
24. Kosinska AD, Zhang E, Johrden L, Liu J, Seiz PL, Zhang X, et al. Combination of DNA prime-adenovirus boost immunization with entecavir elicits sustained control of chronic hepatitis B in the woodchuck model. *PLoS Pathog*. 2013; 9(6):e1003391.
25. Rafati S. Antibody detection against HPV16 E7 & GP96 fragments as biomarkers in cervical cancer patients. *Indian J Med Res*. 2009; 130: 533-41.
26. Rahimi R, Mahdavi M, Ebtekar M. Immunogenicity evaluation of targeted multi-epitopic HIV-I candidate vaccine in Balb/c mice. *AMUJ*. 2014; 17(90): 46-58.[persian]
27. Shi L, Liu S, Fan G-X, Sheng L, Ren H-X, Yuan Y-K. Effective induction of type 1 cytotoxic T cell responses in mice with DNA vaccine encoding two hepatitis C virus cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Viral immunology*. 2006; 19(4):702-11.
28. Daemi A, Bolhassani A, Rafati S, Zahedifard F, Hosseinzadeh S, Doustdari F. Different domains of glycoprotein 96 influence HPV16 E7 DNA vaccine potency via electroporation mediated delivery in tumor mice model. *Immunology letters*. 2012; 148(2):117-25.
29. Li H-T, Yan J-B, Li J, Zhou M-H, Zhu X-D, Zhang Y-X, et al. Enhancement of humoral immune responses to HBsAg by heat shock protein gp96 and its N-terminal fragment in mice. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2005; 11(19):2858-63.
30. Yan J, Liu X, Wang Y, Jiang X, Liu H, Wang M, et al. Enhancing the potency of HBV DNA vaccines using fusion genes of HBV-specific antigens and the N-terminal fragment of gp96. *The journal of gene medicine*. 2007; 9(2):107-21.
31. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*. 2001; 14(3):303-13.
32. Spangenberg HC, Viazov S, Kersting N, Neumann-Haefelin C, McKinney D, Roggendorf M, et al. Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2005; 42(4):828-37.
33. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*. 1999; 10(4):439-49.
34. Torresi J, Johnson D, Wedemeyer H. Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *Journal of hepatology*. 2011; 54(6):1273-85.
35. Zhang P, Wu CG, Mihalik K, Virata-Theimer ML, Mei-ying WY, Alter HJ, et al. Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(20):8449-54.
36. Chen C, Li J, Bi Y, Yang L, Meng S, Zhou Y, et al. Synthetic B-and T-cell epitope peptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with Gp96 as adjuvant induced humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine*. 2013; 31(14):1838-47.