

Designing, Constructing and Immunogenic Evaluation of Polytope DNA Constructs by the Application of Hepatitis C Virus Immunodominant Epitopes in BALB/c Mice

Arash Memarnejadian, Ph.D., Farzin Roohvand, Ph.D.*, Arash Arashkia, Ph.D., Farideh Berjisian, B.Sc., Mohammad Reza Aghasadeghi, Ph.D.

Hepatitis and AIDS Department, NRGB Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 1316943551, Hepatitis and AIDS Department, NRGB Lab, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: rfarzin@pasteur.ac.ir

Received: 26/May/2008, Accepted: 11/Nov/2008

Abstract

Objective: Polytope DNA vaccines, capable of focusing the cytotoxic T lymphocyte (CTL) response on critical epitopes, represent a promising approach in HCV immunotherapy. Nevertheless, due to controversial rules governing epitope processing and the low level expression/immunogenicity of recombinant polytope peptides, designing and primary expression/immunogenicity analysis of these vaccine types should be the first consideration prior to costly transgenic animal studies.

Materials and Methods: Four HLA-A2 and H-2^d restricted CTL epitopes were selected and designed in three appropriate sequential tandems based on epitope and proteasomal cleavage predictions. The related nucleotide sequences were synthesized using SOEing PCR method and cloned into a pcDNA3.1 vector, either alone or fused to the small hepatitis B surface antigen (HBsAg-S) gene. Following the preparation of polyclonal anti-sera, expression/secretion of polytopes was evaluated in Cos-7 cells by using immunofluorescence, Western-blot, dot blot, ELISA and RT-PCR techniques. The immunogenicity of the plasmids was also assessed through the delayed-type hypersensitivity (DTH) assay in BALB/c mice.

Results: Due to *in silico* designs and optimizations, the polytope products of constructed plasmids were efficiently detected *in vitro* through common techniques and HBsAg-S-based particles were shown to be secreted into the culture media (up to 30%). Moreover, all plasmids were able to efficiently induce a positive DTH response while HBsAg-S fusion constructs indicated a significant immunopotential effect towards the incorporated mouse epitopes.

Conclusion: Designed polytope constructs of this study are efficiently expressed and processed. They have the required initial potency for further immunogenicity analysis in transgenic mice.

Keywords: Epitope, Hepatitis C Virus, DNA Vaccine, Cytotoxic T-Lymphocytes

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 122-133

طراحی، ساخت و ارزیابی ایمنی‌زایی سازه‌های DNA پلی‌توپ با استفاده از اپی‌توپ‌های غالب ویروس هپاتیت سی در موش BALB/c

آرش معمارنژادیان Ph.D.، فرزین روحوند Ph.D.*، آرش آرش کیا Ph.D.، فریده برجیسیان B.Sc.، محمد رضا آقاصادقی Ph.D.

انستیتو پاستور ایران، بخش هیاتیت و ایدز، بانک ژن نو ترکیب، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور ایران، بخش هیاتیت و ایدز، بانک ژن نو ترکیب

پست الکترونیک: Email: rfarzin@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۷/۳/۶، پذیرش مقاله: ۸۷/۸/۲۱

چکیده

* **هدف:** طراحی، ساخت و ارزیابی ایمنی‌زایی سازه‌های DNA پلی‌توپ با استفاده از اپی‌توپ‌های غالب ویروس هپاتیت سی در موش BALB/c

* **مواد و روش‌ها:** چهار اپی‌توپ CTL وابسته به HLA-A2 و H-2^d انتخاب و بر اساس الگوریتم‌های شناسایی اپی‌توپ و برش پروتئازوم در سه ترتیب مختلف طراحی شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی مربوطه با روش SOE-PCR ساخته شده و به صورت متصل یا غیرمتصل به ژن آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت بی (HBsAg-S) در پلاسمید pcDNA3.1 کلون شدند. به دنبال تهیه آنتی‌سرم پلی‌کلونال بیان و ترشح پلی‌توپ‌ها در سلول‌های Cos-7 با روش‌های ایمونوفلورسانس، وسترن بلات، دات بلات، الیزا و RT-PCR بررسی و ایمنی‌زایی سازه‌ها با آزمون ازدیاد حساسیت تاخیری (Delayed-type Hypersensitivity; DTH) در موش BALB/c ارزیابی شد.

* **یافته‌ها:** پپتیدهای پلی‌توپ حاصل از بیان پلاسمیدهای ساخته شده به واسطه طراحی *in silico* و تمهیدات به کار رفته، با تکنیک‌های معمول در محیط آزمایشگاه به طور کامل شناسایی شده و ترشح ذرات هیبرید با HBsAg-S به محیط کشت (به میزان ۳۰ درصد) نشان داده شد. هم‌چنین کلیه پلاسمیدها قادر به تحریک کارآمد پاسخ DTH بودند که در این میان سازه‌های هیبرید با HBsAg-S اثر فزاینده معنی‌داری را بر پاسخ ایجاد شده علیه اپی‌توپ‌های موشی نشان دادند.

* **نتیجه‌گیری:** سازه‌های پلی‌توپ ساخته شده به خوبی بیان و پردازش شده و از کارایی اولیه لازم به منظور بررسی بیشتر ایمنی‌زایی در موش تراریخته برخوردار می‌باشد.

* **کلیدواژگان:** اپی‌توپ، ویروس هپاتیت سی، واکسن DNA، لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۱۳۳-۱۳۲

مقدمه

است. از جمله علل این ناکارآمدی می‌توان به ناکافی بودن تعداد اپی‌توپ‌های CTL محافظ (Protective) در یک آنتی‌ژن (۱۳) یا موتاسیون و در نتیجه فرار ویروس (۱۶-۱۴) اشاره کرد. به علاوه در مواردی اپی‌توپ‌های غیرمرتبط و سرکوب کننده موجود در آنتی‌ژن به علت تداخل با اپی‌توپ‌های محافظت کننده می‌توانند مانع از ایجاد پاسخ مناسب گشته و حتی موجب برانگیختن پاسخ‌های ناخواسته در اثر واکنش‌های گریز (۱۷). به طور مشخص در مورد ویروس HCV اثر سرکوب کنندگی سیستم ایمنی در مورد برخی از آنتی‌ژن‌های ویروس مانند E2، E1، Core و NS3 مشاهده شده است که به عنوان مکانیسمی برای تضعیف عملکرد برخی از سلول‌ها مانند سلول‌های T، NK و دندریتیک ذکر می‌شود (۲۱-۱۸). همین امر استفاده از ساختار طبیعی این آنتی‌ژن‌ها را به منظور واکنش‌های محدود می‌سازد.

واکسن‌های DNA چند اپی‌تویی یا پلی‌توپ (Polytope DNA Vaccines) به عنوان یک استراتژی جایگزین این امکان را فراهم ساخته‌اند که با انتخاب اپی‌توپ‌های نامتغیر و محافظ میکروارگانسیم و کنار هم قرار دادن توالی نوکلئوتیدی سازنده آنها در یک ساختار ساده، ضمن برانگیختن هم‌زمان پاسخ ایمنی علیه چندین اپی‌توپ مهم و موثر، با حذف نواحی ناخواسته از ایجاد پاسخ‌های سرکوب کننده ایمنی و

نقش کلیدی لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (Cytotoxic T-Lymphocytes; CTL) در دفاع علیه عفونت‌های ویروسی به ویژه ویروس‌های غیرسایتوپاتیک، مانند ویروس هپاتیت سی (Hepatitis C Virus; HCV) در مطالعات مختلف نشان داده شده است (۴-۱). اخیراً بررسی موارد درمان شده عفونت HCV نیز حاکی از اهمیت پاسخ قوی و چند جانبه لنفوسیت‌های T CD8⁺ علیه اپی‌توپ‌های مهم و نامتغیر ویروس و توانایی این سلول‌ها در پاک‌سازی عفونت در بدو شروع است (۵-۷). با این حال به دلیل وجود سویه‌های مختلف ویروس HCV و تنوع ساختار آنتی‌ژنیک آنها (۸، ۹) و هم‌چنین توانایی منحصر به فرد ویروس در تغییر سریع ساختار اپی‌تویی (موتاسیون) که منجر به فرار آن از دست سیستم ایمنی می‌گردد (۳، ۱۰)، کاربرد واکسن‌های درمانی برای ایجاد چنین پاسخی در سلول‌های T CD8⁺ تاکنون موثر واقع نشده است. در حال حاضر واکسن‌های DNA کلاسیک (DNA Vaccine) که از آنتی‌ژن کامل میکروارگانسیم جهت تحریک سیستم ایمنی استفاده می‌کنند، به عنوان یکی از راه‌های القا پاسخ Th1 و تحریک سلول‌های CTLs پذیرفته شده‌اند (۱۱، ۱۲). این نوع واکسن اگرچه در مورد برخی از پاتوژن‌ها موفق بوده است، اما کارایی چشم‌گیری را در پاک‌سازی عفونت‌های ویروسی مزمن مانند HCV از خود نشان نداده

مواد و روش‌ها

پلاسمیدهای چنداپی‌تویی

شناسایی و ارزیابی اپی‌توپ‌های CTL و ویروس HCV با توجه به ویژگی اتصال آنها به مولکول HLA، تشابه توالی آنها در ژنوتیپ‌های مختلف و ارتباط آنها با پاک‌سازی ویروس صورت گرفت. برای این منظور از میان ۱۶۱ نمونه متعلق به ۱۸ ژنوتیپ مختلف HCV که در پایگاه اطلاعاتی Los Alamos HCV Immunology Database (۳۴) ثبت شده است، اپی‌توپ‌های CTL برگرفته از آنتی‌ژن‌های Core, E2 و NS3 که میل اتصال بالاتری برای HLA-A2.1 داشته و توالی اسید آمینه‌ای آنها بیشترین شباهت را به دو ژنوتیپ شایع ویروس یعنی 1a و 1b داشتند، برای ارزیابی بیشتر انتخاب شدند. در قدم بعد با توجه به گزارش‌های موجود مبنی بر ارتباط احتمالی پاسخ ایمنی ایجاد شده علیه اپی‌توپ‌ها با پاک‌سازی عفونت، سه اپی‌توپ نهایی H2-E614، C132 و N1406 به علاوه اپی‌توپ E405 (که وابسته به H2-D^e و قابل ارزیابی در موش BALB/c می‌باشد) برای گنجانده شدن در ساختارهای چند اپی‌تویی این تحقیق در نظر گرفته شد (جدول ۱). سپس با کمک شبیه‌سازی کامپیوتری و استفاده از الگوریتم‌های پیش‌بینی اتصال پپتید به HLA (<http://bio.dfci.harvard.edu/>) و نیز پردازش پروتئازوم (<http://paproc.de>) سه توالی پلی‌توپ متشکل از چهار اپی‌توپ مذکور به گونه‌ای طراحی شد که کمترین اپی‌توپ‌های بینایی در حد فاصل آنها ایجاد شود و دیگر آنکه شرایط برای پردازش اپی‌توپ‌ها توسط پروتئازوم و در نتیجه عرضه آنها ایده‌آل باشد. این ویژگی‌ها با جابه‌جایی محل قرارگیری اپی‌توپ‌ها نسبت به هم کنترل شده و سرانجام با توجه به جدول فراوانی tRNA برای کدون‌های انسانی (www.kazusa.org.jp/codon/) سه توالی نوکلئوتیدی مربوطه طراحی و به روش SOEing PCR (۳۵) ساخته شدند. برای ساخت این سه توالی، سه جفت الیگونوکلئوتید ۸۴-۸۰ بازی که در ۲۱ باز ناحیه ۳ هم‌پوشانی (Overlap) داشتند، با خلوص از HPLC از کمپانی (MWG Biotech Germany) تهیه شدند. به عنوان نمونه یک جفت الیگوی طراحی شده برای ساخت ترادف شماره 1 (Polytope1) عبارت بودند از ODN_۱ با توالی

5'-ACCATGGGATCCGACCTGATGGGCTACATCCCTC
TGGTGGGCGCCTCCGGCCCTCCAGAAAGATCCA
GCTGGTGGCGCT-3'

و ODN_۲ با توالی

5'-ATGAATTCTTACACGGCGTTCAGGCCAGGCCG
GACAGCTTGATGGTGAAGGGTAGTGCCACAGCC
GCACCAGCTGGATCTTC-3'

که نواحی هم‌پوشان آنها با خط زیر مشخص شده است. با استفاده از آنزیم Pfu DNA polymerase (Fermentas)، dNTP و اعمال یک سیکل حرارتی ۹۵، ۷۰ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (هریک به مدت ۵ دقیقه)، پس از جفت شدن الیگونوکلئوتیدها در ناحیه هم‌پوشان، نواحی انتهایی از روی الگوی رشته مقابل ساخته شد. در مرحله بعد قطعه کامل به عنوان الگو در یک واکنش PCR با افزودن پرایمرهای P_۱' (5'-TAGGATCCACCATGGACCTGATGGGCTAC-3')، P_۲' (5'-ATGAATTCCTTACACGGCG-3')

که حاوی توالی برش آنزیم‌های BamHI و EcoRI (نواحی پر رنگ)، کدون‌های شروع و ختم ترجمه و توالی Kozak (نواحی *Italic*) بودند، تکثیر شده (توالی پرایمرهای نشان داده شده مربوط به Polytope1 می‌باشند) و

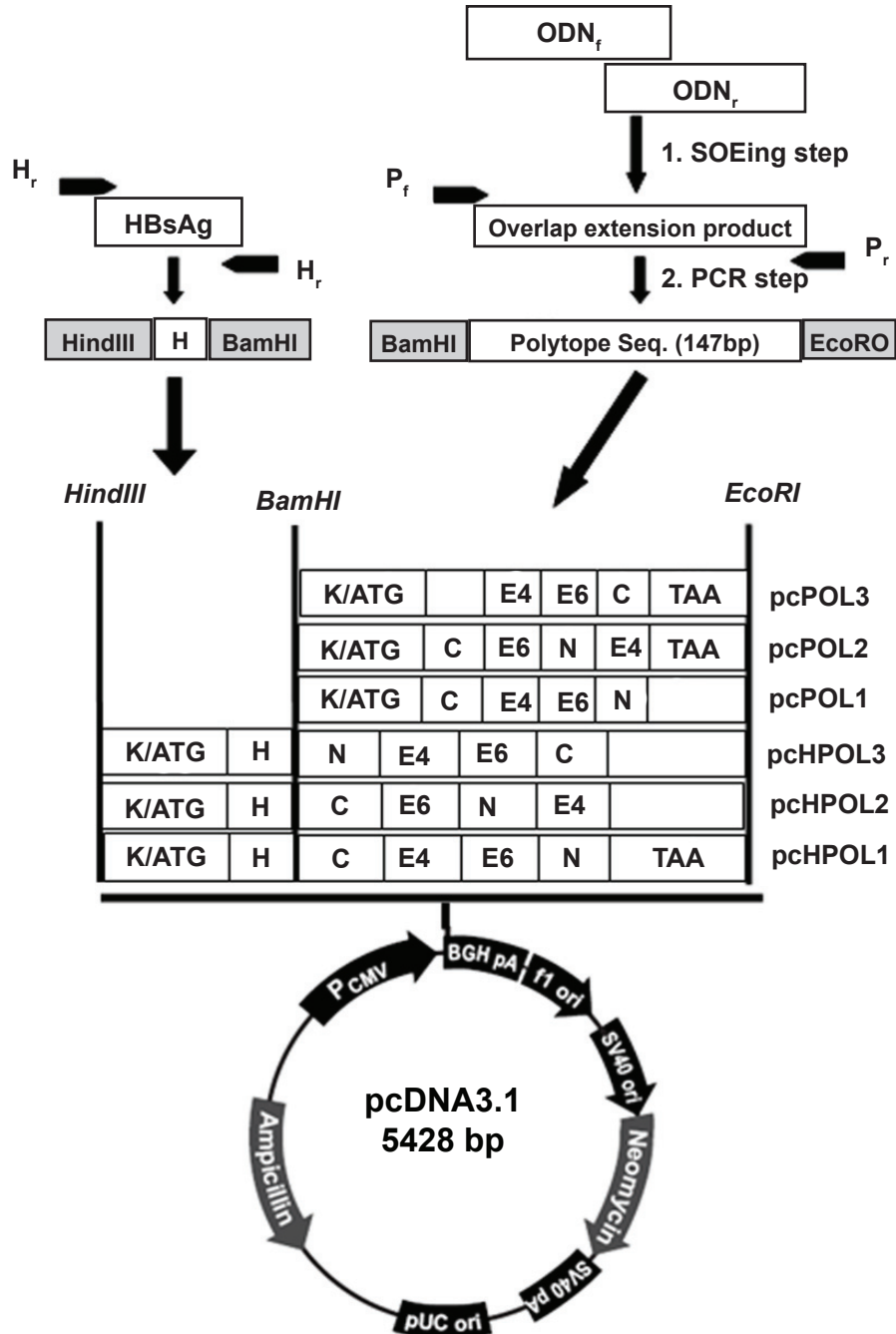
مضر نیز جلوگیری گردد (۲۲، ۲۳). به این ترتیب واکسن‌های مذکور که پاسخ ایمنی ایجاد شده نسبت به آنها در مورد برخی عفونت‌های ویروسی و تومورها به خوبی نشان داده شده است (۲۶-۲۴)، به عنوان نسل جدیدی از واکسن‌های DNA کارآمد و بی‌خطر مطرح می‌باشند. با این وجود توسعه این نوع واکسن نیازمند یافتن راه حل‌های مناسب برای افزایش بیان این توالی‌های مصنوعی، افزایش ایمنی‌زایی آنها و پایه‌گذاری روش‌های مناسب جهت سنجش کارایی واکسن در حیوان آزمایشگاهی می‌باشد. لازم به ذکر است که پپتیدهای پلی‌توپ به علت فقدان ساختمان دوم و سوم عموماً پایداری کمی داشته و نسبت به پروتئولیز در حین ترجمه حساس می‌باشند (۲۳، ۲۷، ۲۸). از آنجا که بیان محدود این پپتیدها می‌تواند به طور غیرمستقیم بر ایمنی‌زایی آنها تاثیر بگذارد، ارزیابی آزمایشگاهی بیان این نوع واکسن در مقایسه با واکسن‌های DNA کلاسیک از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد. همچنین در حال حاضر اطلاعات ضد و نقضی در مورد تاثیر محل قرارگیری و ترادف اپی‌توپ‌ها، افینیتی اتصال آنها به مولکول MHC و وجود یا عدم وجود اپی‌توپ‌های کمکی (Th) بر ایمنی‌زایی واکسن‌های پلی‌توپ در دست است (۲۷، ۲۹، ۳۰) که تکمیل آنها نیازمند انجام تحقیقات بیشتر می‌باشد. در نهایت اشاره به این نکته ضروری است که بررسی ایمنی‌زایی واکسن‌های پلی‌توپ انسانی به دلیل نیاز به استفاده از حیوانات تراریخته دارای (HLA Human Leukocyte Antigen) انسانی و مشکلات تهیه و تکثیر این نوع حیوان، هزینه‌بر بوده و به راحتی واکسن‌های کلاسیک نمی‌باشد (۳۱). با توجه به موارد فوق می‌توان نتیجه گرفت که توسعه استراتژی پلی‌توپ نیازمند تحقیق‌های بیشتر بوده و در این راستا طراحی هر چه دقیق‌تر و نیز اطمینان اولیه از بیان و ایمنی‌زایی واکسن قبل از انجام آزمایشات تحت بالینی بر روی حیوان تراریخته، می‌تواند به کاهش زمان و هزینه‌ها منجر شود.

آنتی‌ژن‌های E2، Core و NS3 ویروس هپاتیت سی (به عنوان مهم‌ترین پاتوژن عامل هپاتیت مزمن) به علت دارا بودن ویژگی‌هایی نظیر نامتغیر بودن و دخالت در بیماری‌زایی (Core)، در دسترس بودن اتصال ویروس به سلول‌های کبد (E2) هم‌چنین دخالت در تکثیر ویروس و مشاهده ارتباط پاسخ ایمنی ایجاد شده با پاک‌سازی عفونت (NS3)، همواره به عنوان آنتی‌ژن‌های مناسب برای استفاده در واکسن‌های درمانی مورد توجه بوده‌اند (۳۲، ۳۳).

هدف از تحقیق حاضر اثبات کارایی استراتژی واکسن‌های چند اپی‌تویی در ایجاد پاسخ ایمنی علیه چهار اپی‌توپ CTL برگرفته از سه ناحیه مذکور و هم‌چنین بررسی برخی مجهولات مرتبط با این نوع واکسن مانند تاثیر ترادف اپی‌توپ‌ها و نیز اثر افزایش آنتی‌ژن کوچک سطحی ویروس هپاتیت بی (HBsAg-S) بر ایمنی‌زایی آنها می‌باشد. برای این منظور با بهره‌گیری از آنالیزهای ایمونوفلورسنتیک شش پلاسمید چند اپی‌تویی حاوی سه ترادف مختلف اپی‌توپ‌های مذکور (دو اپی‌توپ انسانی وابسته به HLA-A2، یک اپی‌توپ موشی وابسته به H2-D^e و یک اپی‌توپ مشترک بین موش و انسان) طراحی و در دو حالت متصل به HBsAg-S و به تنهایی ساخته شده و بیان ژن مورد نظر با روش‌های مختلف آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین به منظور اطمینان از کارایی پلاسمیدهای مذکور پیش از انجام آنالیزهای دقیق ایمونولوژیکی در موش تراریخته، ایمنی‌زایی اولیه آنها بر اساس اپی‌توپ‌های موشی گنجانده شده، در موش BALB/c بررسی شد.

pcDNA3.1+(Invitrogen) کلون شدند که حاصل آن پلاسمیدهای چنداپی توپی pcPOL1، pcPOL2 و pcPOL3 بودند (شکل ۱).

در نهایت هر سه ژن سنتز شده که سه ترتیب مختلف از اپی توپ‌های مورد بحث را بیان می‌کردند، به طور جداگانه در ناقل یوکاریوتی



شکل ۱: نمایش مراحل ساخت پلاسمیدهای پلی توپ کد کننده سه ترادف مختلف اپی توپ‌های CTL به صورت متصل و غیرمتصل به ژن HBsAg-S. شکل شماتیک SOEing PCR در اینجا برای یک ترادف نشان داده شده است. برای ساخت سه ترادف مختلف این روش به صورت جداگانه سه بار با الگونیوکلیوتیدهای ۸۴-۸۰ بازی متفاوت به کار گرفته شد. در مرحله SOEing دو الگونیوکلیوتید همپوشان ODNr و ODNf در نتیجه اعمال سیکل حرارتی تشکیل یک هیبرید داده و نواحی مکمل همانندسازی شد. در مرحله PCR قطعه حاصل تکثیر شده و توالی برش آنزیم، کدون‌های شروع، ختم و توالی Kozak به آن اضافه شدند. ژن HBsAg-S نیز به وسیله دو پرایمر Hr و Hf تکثیر شده و توالی‌های لازم برای ترجمه و برش آنزیمی بر روی آن ایجاد شد. در نهایت توالی‌های پلی توپ به تنهایی و یا به صورت متصل و در قالب قرانت ژن HBsAg-S در پلاسمید pcDNA3.1 کلون شدند. H و TAA به ترتیب نشانه کدون شروع ترجمه و توالی Kozak. ژن HBsAg-S و کدون ختم ترجمه هستند. E6، E4، N و C نیز به ترتیب معرف توالی مربوط به اپی توپ‌های N1406، E405، E614 و C132 می‌باشند.

جدول ۱: اپی توپ های CTL به کار رفته در طراحی واکسن چند اپی توپی علیه HCV

مرجع	افینیتی اتصال MHC به (% Score) ^۴	درصد پوشش ژنوتیپ		وابستگی به MHC	محل اپی توپ # در سویه HCV-H	آنتی ژن مرجع	توالی آمینواسیدی	اپی توپ
		1a†	1b‡					
C132	(۴۵-۴۷)	۱۰۰	۹۶/۱	A2.1/H-2 ^d	۱۳۲-۱۴۲	Core	DLMGYIPLVGA*	
E614	(۴۷،۴۴)	۷۵	۲	A2.1	۶۱۴-۶۲۲	E2	RLWHYPCTI	
N1406	(۴۹،۴۷)	۰	۲۵/۲	A2.1	۱۴۰۶-۱۴۱۵	NS3	KLSGLGLNAV	
E405	(۴۸)	۰	۲/۹	H-2 ^d	۴۰۵-۴۱۴	E2	SGPSQKIQLV	

محل پروتئین ها بر اساس توالی سویه جدا شده توسط HCV-H (FDA) نشان داده شده است.

† یکسانی توالی آمینواسیدی در ۸ نمونه بررسی شده متعلق به ژنوتیپ 1a.

‡ یکسانی توالی آمینواسیدی در ۱۰۳ نمونه بررسی شده متعلق به ژنوتیپ 1b.

\$ درصد ذکر شده با توجه به نزدیکی توالی اپی توپ به توالی consensus (که برای MHC مشخص شده بیشترین افینیتی را دارد) توسط نرم افزار محاسبه شده است.

* پپتید C132 دو اپی توپ وابسته به HLA-A2.1 (ناحیه ای که زیر آن خط کشیده شده است) و H2-D^d (کل توالی نوشته شده) را در خود جای داده است.

ترانس فکت و تهیه لیزات سلولی

کشت و نگهداری رده سلولی Cos-7 که منشأ آن از کلیه میمون سبز آفریقای می باشد، در محیط کشت DMEM حاوی ۲ میلی مولار ال-گلوتامین، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FCS)، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و اتمسفر ۵ درصد CO₂ صورت گرفت. این سلول به روش لیپوفکشن و با استفاده از کیت تجاری PolyFect (Qiagen) به صورت موقت (Transient) با پلاسمیدهای پلی توپ ترانس فکت شد. برای این منظور کمپلکس ترانس فکت متشکل از مقادیر مناسب پلاسمید و محلول پلی فکت طبق دستورالعمل کیت تهیه شده و در فاز لگاریتمی به کشت سلول اضافه شد. ۷۲ ساعت بعد ضمن جمع آوری و نگهداری محیط کشت رویی، سلول ها تحت رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس قرار گرفته و یا به منظور تهیه لیزات سلولی، پنج بار با فواصل زمانی ۱ دقیقه و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه بر روی یخ تحت اثر اولتراسونیکاسیون قرار گرفتند. لیزات حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شده و مایع رویی جهت آنالیز جمع آوری شد. سلول های ترانس فکت شده با پلاسمیدهای فاقد قطعه پلی توپ یعنی pcDNA3.1 و pcH (حاوی ژن HBsAg) و نیز سلول های Cos-7 ترانس فکت نشده به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

بررسی بیان پپتیدهای پلی توپ

الف. وسترن بلات: پروتئین های موجود در لیزات سلولی پس از جداسازی بر روی ژل ۱۵ درصد SDS-PAGE بر اساس یک روش استاندارد (۳۷) به غشا نیتروسولوز منتقل شده و باند مربوط به پروتئین هیبرید HBs-polytope با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد HBsAg (Cedarlane, Canada) و آنتی بادی ثانویه کنژوگه با HRP (Sigma, USA) و افزودن محلول رنگزای DAB قابل رویت شد. ب. ایمونوفلورسانس: سلول های کشت داده شده بر روی لامل های مخصوص شیشه ای (Glass Cover Slips)، ۷۲ ساعت پس از ترانس فکت در مجاورت پارافورمالدئید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه

به منظور بررسی تاثیر HBsAg-S بر ایمنی زایی توالی های چند اپی

توپی، ژن

HBsAg-S (GenBank accession X02496, REGION: 157-837)

با استفاده از دو پرایمر

Hf (5'-CCTAAGCTTACCATGGAGAACATCAC-3')

Hr (5'-GCGGATCC T TAAATGTATACCCAAAGAC-3')

که حاوی توالی برش آنزیم های BamHI و HindIII (نواحی دارای خط زیر) و نیز کدون های Kozak، شروع و ختم ترجمه (نواحی *Italic*) بودند تکثیر شده و در یک قالب قرائت (ORF) با هریک از سه توالی پلی توپ، در پلاسمید pcDNA3.1+ کلون شد. به این ترتیب سه پلاسمید دیگر pCHPOL1، pCHPOL2 و pCHPOL3 که پروتئین هیبرید متشکل از اتصال پپتید پلی توپ به انتهای کربوکسیل HBsAg-S را بیان می کردند نیز ساخته شدند (شکل ۱). کلیه شش پلاسمید فوق پس از اطمینان از صحت توالی نوکلئوتیدی با استفاده از ستون های تخلیص پلاسمید اندوتوکسین و مطابق دستورالعمل کیت تخلیص شدند.

تهیه آنتی سرم پلی کلونال از خرگوش

امکان تهیه آنتی بادی علیه پپتیدهای پلی توپ این تحقیق ابتدا به صورت *in silico* و با استفاده از الگوریتم شناسایی اپی توپ های سلول B (http://bio.dfci.harvard.edu/tools/antigenic.html) بررسی شده سپس با اعمال یک روش استاندارد (۳۶)، آنتی بادی پلی کلونال خرگوشی علیه هریک از پپتیدها به طور جداگانه تهیه شد. به طور خلاصه ۱ میلی لیتر از مخلوط ایمونوژن شامل ۱ میلی گرم از پپتید سنتتیک (سنتز شده توسط انستیتو بیوشیمی دانشگاه لوزان سوئیس) مخلوط شده با حجم مساوی اجوان ناقص فروند (Incomplete Freund's Adjuvant) به صورت زیر جلدی به خرگوش ۳ ماهه تزریق شد. به دنبال تزریق یاد آور پس از یک ماه، نمونه خون خرگوش در فواصل زمانی مختلف جهت یافتن بیشترین عیار آنتی بادی با روش الایزای غیر مستقیم مورد بررسی قرار گرفت.

ایمن‌سازی موش‌ها

موش‌های BALB/c (H-2^d) ماده با ۸-۶ هفته سن از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران در کرج تهیه و گروه‌های ۹-۶ تایی آنها بر اساس "اصول بین‌المللی نگهداری و کار با حیوان آزمایشگاهی (۴۱)" و هم‌چنین مطابق با مصوبات کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران^{۱۱} با میزان ۱۰۰ میکروگرم پلاسمید (در حجم ۵۰ میکرولیتر) به صورت زیرجلدی در ناحیه کف پای چپ ایمن شدند. تزریقات در زمان‌های ۰، ۳ و ۶ هفته صورت گرفته و دو گروه دریافت‌کننده پلاسمیدهای فاقد ژن پلی‌توپ (pcDNA3.1 و pcH) به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

بررسی پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH)

طبق روش گزارش شده قبلی (۴۲)، ۳ هفته پس از آخرین ایمن‌سازی موش‌ها میزان ۱۰ میکروگرم از پپتید سنتتیک پلی‌توپ متناظر با هر یک از ترادف‌ها، مخلوط پپتیدهای C132+E405 یا E614+N1406 (شامل حجم مساوی هر یک از آنها) و یا یک پپتید غیر مرتبط، در حجم کلی ۴۰ میکرولیتر به صورت زیرجلدی به کف پای راست گروه‌های ایمن شده تزریق شد. مقدار مساوی سرم فیزیولوژی نیز به عنوان شاهد به کف پای چپ موش‌ها تزریق و پس از گذشت ۱۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مقدار برجستگی پای راست در مقایسه با پای چپ موش‌ها در گروه‌های مختلف توسط ریزسنج (Mitutoyo, Japan) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

انتخاب اپی‌توپ‌ها و طراحی پلاسمیدهای پلی‌توپ

توالی آمینو اسیدی اپی‌توپ‌های CTL مربوط به نمونه‌های جدا شده HCV در پایگاه اطلاعاتی که برای این منظور راه‌اندازی شده است (<http://hcv.lanl.gov/content/immuno/immuno-main.html>) موجود می‌باشد که برای این منظور راه‌اندازی شده است. در قدم اول بر اساس وابستگی به سوپرتایپ شایع HLA-A2 (۴۳) از نواحی E2، Core و NS3 بیش از ۶۰ اپی‌توپ شناسایی شدند که از میان آنها در نهایت ۳ اپی‌توپ غالب بر اساس ویژگی‌هایی نظیر ثبات توالی آمینو اسیدی در بین نمونه‌های جدا شده از دو ژنوتیپ شایع و مقاوم به درمان 1a و 1b (۹)، ارتباط پاسخ ایمنی ایجاد شده با پاکسازی ویروس و افینیتی اتصال آنها به HLA-A2.1 انتخاب شدند (جدول ۱). در بین این اپی‌توپ‌ها، C132 علاوه بر HLA-A2.1 (ناحیه ۱۴۰-۱۳۲) توسط H-2^d (ناحیه ۱۴۲-۱۳۲) نیز شناخته و عرضه می‌شد. به منظور فراهم کردن امکان مطالعه ایمنی‌زایی واکسن در حیوان معمول آزمایشگاهی (موش BALB/c) علاوه بر C132، اپی‌توپ E405 نیز که وابسته به H-2^d بود به مجموع اپی‌توپ‌های انتخابی افزوده شد. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است پاسخ ایمنی غالب نسبت به این اپی‌توپ‌ها در تحقیقات مختلف گزارش شده (۴۹-۴۴) و در این میان N1406 به عنوان یکی از اپی‌توپ‌های اصلی مرتبط با پاک‌سازی ویروس شناخته شده است (۶، ۴۹). هم‌چنین به منظور کاهش پدیده ایمنوودومینانس (۵۰) با بهره‌گیری از پیش‌بینی‌های *in silico* مربوط به اتصال اپی‌توپ‌ها به مولکول MHC (<http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP>) سعی شد که اپی‌توپ‌های انتخابی همگی دارای افینیتی اتصال (Score) بالاتر از ۵۰ درصد باشند. از جمله نکات قابل توجه در طراحی واکسن‌های پلی‌توپ، ترتیب قرارگیری اپی‌توپ‌ها نسبت به یکدیگر است. این

در دمای اتاق فیکس شدند. پس از شست‌وشو در بافر فسفات (PBS) به منظور کاستن از فلئورسانس زمینه، لامل‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۵۰ میلی‌مولار کلروآمونوم قرار گرفته و به دنبال شست‌وشوی مجدد، سلول‌ها ابتدا توسط محلول ۰/۱ درصد تریتون X-100 نفوذ پذیر شده و پس از شست‌وشو به مدت ۴۵ دقیقه به ترتیب در مجاورت با آنتی‌بادی ضد HBSAg و سپس آنتی‌بادی ثانویه کتزوگه با FITC (Sigma) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. قبل و بعد از افزودن هر آنتی‌بادی سلول‌ها توسط بافر PBS شسته شدند و در نهایت میزان فلئورسانس سلول‌های ترانس فکت شده در مقایسه با سلول‌های ترانس فکت نشده (به عنوان کنترل منفی) توسط میکروسکوپ فلئورسانس Zeiss Axioskop مورد بررسی قرار گرفت.

ج. دات‌بلات: به منظور کاستن از میزان انتشار نمونه‌های لکه‌گذاری شده و داشتن نقاط یک دست، غشا نیتروسولوز ابتدا به اندازه قطعات ۴ میلی‌متری پانچ شده و پس از قراردادن قطعات در چاهک‌های یک پلیت الایزا، لیزات سلولی و یا پپتیدهای سنتتیک طبق روش استاندارد (۳۸) بر روی غشا نمونه‌گذاری شدند. پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و قطعات درون چاهک‌ها ابتدا توسط آلبومین سرم گاوی (BSA) ۳ درصد بلاک شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با آنتی‌سرم خرگوشی تهیه شده علیه پپتیدهای پلی‌توپ و به دنبال آن با آنتی‌بادی ثانویه کتزوگه با HRP مجاور شدند. پس از ظهور لکه‌ها به وسیله محلول DAB قطعات پانچ شده را بر روی یک صفحه سفید قرار داده و توسط دوربین دیجیتال عکس‌برداری شدند. در نهایت وضوح و شفافیت عکس حاصل با نرم‌افزار فوتوشاپ تنظیم شد. پپتیدهای سنتتیک پلی‌توپ و لیزات سلول‌های ترانس فکت نشده به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده شدند.

د. RT-PCR: به دنبال تخلیص RNA سلولی به وسیله محلول تجاری Trizol ساخت Invitrogen ابتدا cDNA مربوطه با استفاده از پرایمر Random Hexamer و آنزیم Reverse Transcriptase ساخته شد (۳۹). جهت اطمینان از عدم آلودگی RNA با DNA پلاسمیدی نمونه کنترل بدون افزودن آنزیم RT نیز تهیه شد. سپس ۲ میکرولیتر از محصول هر یک از دو لوله تست و کنترل در کنار cDNA مربوط به سلول‌های ترانس فکت شده با پلاسمید بدون قطعه (pcDNA3.1) در یک واکنش استاندارد PCR حاوی ۲۰ پیکومول از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های پلی‌توپ طبق ۲۷ سیکل برنامه حرارتی (۲۰ ثانیه ۹۵، ۳۰ ثانیه ۵۰ و ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد) تکثیر گردید. محصول PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل ۲ درصد آگارز به وسیله سیستم UVP BioDoc-It (Cambridge, Uk) مشاهده شد.

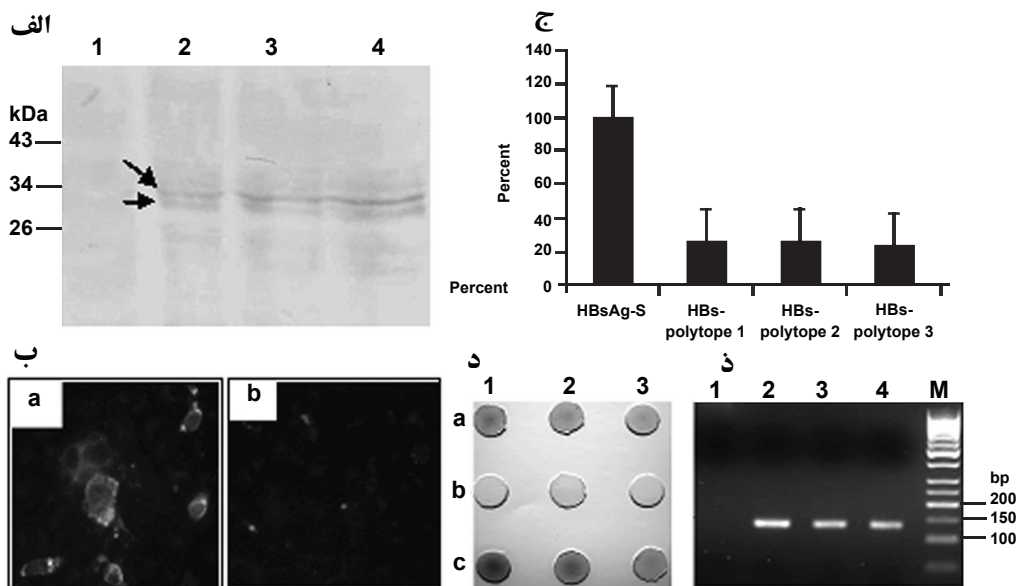
ه. الایزا: به منظور بررسی میزان ترشح ذرات HBS-poly- α ۷۲ ساعت پس از ترانس فکت سلول‌ها محیط کشت رویی جمع‌آوری شده و تا میزان ده برابر توسط لوله‌های تغلیظ‌کننده Vivaspin 2, 3000 MWCO (Sartorius) تغلیظ شدند. سپس با استفاده از کیت تجاری اندازه‌گیری HBSAg به روش الایزا (Hepanos-tika, Biomérieux, France) مقدار ذرات هیبرید ترشح شده در محیط کشت اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که جهت یکنواخت‌سازی میزان ترانس فکت پلاسمیدهای پلی‌توپ از ترانس فکت هم‌زمان پلاسمید pcDNA3.1/LacZ و سنجش آنزیم بتاگالاکتوزیداز در لیزات سلولی استفاده شده (۴۰) و نتایج الایزا پس از اعمال ضرایب یکنواختی در مقایسه با میزان ترشح ذرات HBSAg-S (Wild Type) از سلول‌های ترانس فکت‌ها با پلاسمید pcH، به صورت درصد بیان شدند.

مقایسه با پپتیدهای پلی توپ ۲ و ۳ نشان داد (نتایج نشان داده نشده است). آنتی سرم‌های تهیه شده علیه سه پپتید پلی توپ و آنتی بادی مونوکلونال تجاری علیه HBsAg در آزمایشات مختلف به منظور شناسایی محصول ژن‌های پلی توپ به کار برده شدند. نتایج نشان داد که ژن‌های پلی توپ به خوبی در رده سلولی Cos-7 که با داشتن آنتی ژن T ویروس SV40 امکان تکثیر اپی زومال پلاسمید pcDNA3.1 فراهم می‌کند، بیان شده‌اند (شکل ۲). علاوه بر این با استفاده از تکنیک استاندارد وسترن بلات باند مربوط به بیان پروتئین‌های نو ترکیب هیبرید با HBsAg-S در اندازه مورد انتظار مشاهده شد (شکل ۲ الف). وزن مولکولی پروتئین هیبرید HBs-polytope طبق توالی آمینواسیدی آن ۲۹/۸ کیلودالتون می‌باشد و در نتایج وسترن بلات این باند در کنار باند دیگری با وزن مولکولی حدود ۳۳ کیلودالتون به صورت یک باند دوگانه (doublet) مشاهده شد که بر اساس مطالعات قبلی باند سنگین تر می‌تواند مربوط به گلیکوزیلاسیون پروتئین HBsAg در محل اسید آمینه آسپارژین ۱۴۶ آن باشد (۵۴، ۵۵). ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از آنتی بادی علیه HBsAg نیز بیان پروتئین‌های HBs-polytope را در سلول‌های Cos-7 ترانس فکت شده اثبات کرد (شکل ۲ ب). هم چنین بررسی محیط کشت این سلول‌ها با روش الایزا حاکی از ترشح ذرات هیبرید HBsAg به محیط کشت سلول بود (شکل ۲ ج).

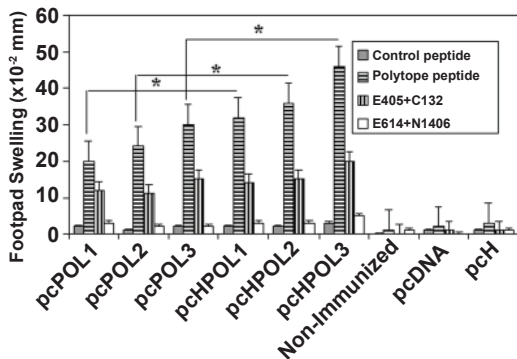
ویژگی که به واسطه پیدایش اپی توپ‌های جدید بینایی (Junc-tional) و نیز تاثیر بر پردازش اپی توپ‌ها توسط پروتازوم می‌تواند بر کارایی پاسخ ایمنی موثر واقع شود (۵۱)، به کمک روش‌های ایمونو انفورماتیک قابل پیش‌بینی است. بر این اساس با استفاده از دو الگوریتم موجود در برنامه‌های Rankpep (۵۲) (جهت پیش بینی لیگاند‌های MHC) و PAPProC (۵۳) (جهت پیش‌بینی برش پروتازوم) از بین ۲۴ ترکیب موجود برای ۴ اپی توپ در نظر گرفته شده در این تحقیق، ۳ ترادف (شکل ۱) که اپی توپ بینایی کمتر و پردازش بهتری را نشان می‌دادند، انتخاب شدند. توالی‌های مذکور علاوه بر اینکه به تنهایی در وکتور pcDNA3.1 کلون شدند، فیوژن آنها با ژن HBsAg-S نیز به طور جداگانه در این پلاسمید کلون شد. کلیه شش پلاسمید ساخته شده توسط آنالیزهای آنزیمی و در نهایت تعیین توالی، مورد تایید قرار گرفتند.

بررسی بیان ژن‌های پلی توپ

آنالیز پپتیدهای پلی توپ به وسیله الگوریتم کامپیوتری وجود یک شاخص آنتی ژنیک سلول‌های B در پلی توپ ۲ و ۳ و دو شاخص در پلی توپ ۱ را مشخص کرد. نتایج الایزا نیز هم سو با این پیش‌بینی، عیار بالاتر آنتی سرم پلی کلونال خرگوشی علیه پلی توپ ۱ را در سرم خرگوش‌های ایمن شده با پپتید سنتتیک متناظر با این پلی توپ در



شکل ۲: بیان و ترشح پپتیدهای پلی توپ در سلول‌های Cos-7. بررسی بیان پروتئین‌های هیبرید HBs-polytope در لیزات سلولی با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال علیه HBsAg با دو روش وسترن بلات، الف) و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، ب) انجام شد. در ستون‌های ۲-۴ غشا بلات شده باندهای دوگانه با اندازه ۳۳ و ۳۰ کیلو دالتون که نشانه اشکال گلیکوزیله و غیرگلیکوزیله پروتئین حاصل از ترانس فکت سه پلاسمید پلی توپ می‌باشند به ترتیب با دو فلش بالا و پایین مشخص شده‌اند. سلول‌های غیرترانس فکته نه تنها باند مربوطه را در غشا وسترن بلات نشان ندادند (ستون ۱ در الف) بلکه فاقد فلوروسانس قابل رویت در روش ایمونوفلورسانس نیز بودند (b در ب). این درحالی است که مشاهده نور فلورسانس در سلول‌های ترانس فکت شده (در این عکس با pCHPOL1) نشانه بیان پروتئین مورد نظر بود (a در ب).
 با روش الایزا درصد ترشح ذرات هیبرید HBs-polytope در مقایسه با HBsAg-S در مقایسه با \pm انحراف معیار حاصل از سه ترانس فکت مختلف می‌باشند. ستون‌ها نمایانگر میانگین \pm انحراف معیار حاصل از سه ترانس فکت مختلف می‌باشند.
 بیان و رونویسی پلاسمیدهای پلی توپ غیر هیبرید با HBsAg-S با دو روش دات ایمونوبلات، د) و RT-PCR، e) بررسی شدند. شدت رنگ حاصل از نمونه گذاری ۲۰، ۱۰ و ۲ میکرولیتر از لیزات سلول‌های ترانس فکت شده (در این شکل با pCPOL1) در دات بلات (ردیف a، به ترتیب ستون‌های ۱، ۲ و ۳) تفاوت واضحی را با لکه‌های مربوط به سلول‌های غیرترانس فکته (ردیف b) نشان داده اما شباهت نزدیکی با لکه‌های ناشی از ۲۰، ۱۰۰ و ۴ نانوگرم پپتید سنتتیک (ردیف c، به ترتیب ستون‌های ۱، ۲ و ۳) که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد، داشت.
 تکثیر mRNA سلول‌های ترانس فکت شده در RT-PCR نیز حضور باند ۱۵۰ نوکلئوتیدی مربوط به بیان صحیح ژن‌های پلی توپ ۱، ۲ و ۳ (به ترتیب ستون‌های ۱-۳) را نشان داد، در حالی که نمونه کنترل (ستون ۴) متعلق به سلول‌های ترانس فکت شده با پلاسمید بدون قطعه (pcDNA3.1) باند مربوطه نداشت. ستون M نمایانگر باندهای پروتئینی با وزن مشخص است.



شکل ۳. پاسخ DTH موش‌های ایمن شده با سازه‌های ژنی پلی‌توپ. موش‌های BALB/c با پلاسمیدهای کدکننده ترادف‌های مختلف توالی پلی‌توپ متصل یا غیرمتصل به HBsAg-S ایمن شدند. سه هفته بعد از آخرین تزریق موش‌ها توسط ۱۰ میکروگرم پپتید پلی‌توپ صنعتی و با مخلوط مساوی از پپتیدهای ای‌تویی E405 + C132 یا E614 + N1406 در ناحیه کف پای راست به صورت زیر جلدی تحریک شده و پس از ۲۴ ساعت تورم ایجاد شده در مقایسه با پای چپ تزریق شده بوسیله سرم فیزیولوژی اندازه‌گیری شد. موش‌های غیرایمن و نیز گروه‌های واکسینه با پلاسمیدهای فاقد قطعه (pcDNA3.1 و pch) به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. از پپتید ILKEPVHGV (متعلق به آنزیم RT ویروس HIV) به عنوان پپتید غیرمرتبط استفاده شد. نتایج نشان‌دهنده میانگین تورم ایجاد شده در موش‌های هر گروه (۹-۶ عدد) \pm خطای استاندارد بوده و * تفاوت معنی‌دار تورم پای گروه‌های دریافت‌کننده پلاسمیدهای pchPOL را در مقایسه با گروه‌های واکسینه با پلاسمیدهای غیرفیوژن pcPOL نشان می‌دهد.

بحث

واکسن‌های DNA پلی‌توپ را می‌توان به عنوان نسل جدیدی از واکسن‌ها که دارای مزایای بالقوه زیادی می‌باشند، در نظر گرفت. اما از آنجا که در جریان جذب، پردازش و عرضه ای‌توپ‌های یک آنتی‌ژن، جزئیات مربوط به نحوه اثر و برش پروتازوم در درون سلول و نیز تاثیر اسیدهای آمینه مجاور بر پردازش یک ای‌توپ هنوز کاملاً مشخص نیست (۲۲)، و از طرف دیگر بیان پپتیدهای پلی‌توپ به علت سنتتیک بودن و فقدان ساختمان‌های دوم و سوم ضعیف می‌باشد (۲۳، ۲۷، ۲۸)، طراحی مناسب و به‌کارگیری تمهیداتی جهت افزایش بیان و ایمنی‌زایی این نوع واکسن بسیار حایز اهمیت است. با توجه به موارد فوق نتایج این تحقیق نشان داد که در طراحی سازه‌های پلی‌توپ علیه HCV، پیش‌بینی‌های ایمونوآنتی‌جین و نیز استفاده از راهکارهایی جهت بهینه‌سازی بیان و ایمنی‌زایی سازه‌ها می‌تواند به بیان مناسب و افزایش ایمنی‌زایی ای‌توپ‌های گنجانده شده در واکسن منجر شود. از جمله نکات در نظر گرفته شده در طراحی سازه‌های پلی‌توپ، بهینه‌سازی کدون‌های ژنتیکی به منظور افزایش ترجمه در سلول‌های جانوری بود که می‌تواند در افزایش ایمنی‌زایی واکسن‌های DNA موثر باشد (۵۶). برای این منظور سکانس نوکلئوتیدی متناظر با سه توالی پلی‌توپ طراحی شده با استفاده از برنامه

Sequence Manipulation Suite (http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/SMS/rev_trans.html)

و بر اساس جدول فراوانی کدون‌های انسانی (www.kazusa.org.jp/codon/)

تعیین شد. تغییر کدون‌های ژنتیکی به کدون‌های رایج در سلول‌های جانوری بدون ایجاد تغییر در توالی اسیدهای آمینه حاصله ابتدا به عنوان یکی از راه‌های افزایش بیان در سازه‌های حاوی ژن‌های باکتریایی مطرح بود و با توجه به اینکه ژن‌های ویروسی به طور طبیعی از ماشین

اگرچه تولید ذرات هیبرید HBs-polytope به مقدار زیاد در درون سلول صورت گرفته و با روش‌های وسترن‌بلات و ایمونوفلورسانس تایید شد اما در مقایسه با ذرات HBsAg طبیعی (تولید شده توسط پلاسمید pch) میزان ترشح ذرات هیبرید به محیط کشت کمتر بود (حدود ۳۰ درصد).

از آنجا که پپتیدهای پلی‌توپ غیرهیبرید با HBsAg اندازه کوچک داشته (۴۰ اسید آمینه با وزن مولکولی حدود ۴ کیلو دالتون) و آنتی‌بادی مونوکلونال تجاری علیه آنها نیز در اختیار نبود، بیان آنها با استفاده از تکنیک‌های دات‌بلات (شکل ۲) و RT-PCR (شکل ۳) به ترتیب در سطح ترجمه و رونویسی mRNA نشان داده شد. در دات بلات شباهت شدت رنگ لکه‌های مربوط به سلول‌های ترانس فکت شده با لکه‌های نمونه‌گذاری شده از پپتیدهای سنتتیک (کنترل مثبت) و تفاوت مشخص آنها با لکه‌های سلول‌های غیر ترانس فکت (کنترل منفی) حاکی از بیان پلاسمیدهای پلی‌توپ در این سلول‌ها بود. هم‌چنین وجود باند ۱۵۰ نوکلئوتیدی ناشی از انجام RT-PCR بر روی RNA سلول‌های ترانس فکت شده با پلاسمیدهای پلی‌توپ و عدم مشاهده این باند در نمونه سلول‌های ترانس فکت شده با پلاسمید بدون قطعه و نیز نمونه کنترل فاقد آنزیم RT (در شکل نشان داده نشده است)، تایید‌کننده رونویسی از ژن‌های پلی‌توپ مورد نظر بود.

پاسخ DTH در موش BALB/c

ارزیابی اولیه پاسخ ایمنی اختصاصی علیه ای‌توپ‌های CTL گنجانده شده در سازه‌های پلی‌توپ با استفاده از آزمون پوستی DTH - که یک روش استاندارد بررسی ایمنی سلولی در *in vivo* است (۴۲) - صورت گرفت. برای این منظور پس از تزریق پپتیدهای سنتتیک پلی‌توپ متناظر با ترادف‌های مختلف، مخلوط پپتیدهای متناظر با دو ای‌توپ موشی (H-2^d) یا مخلوط پپتیدهای متناظر با دو ای‌توپ انسانی (HLA-A2) به کف پای راست موش‌ها، پس از ۲۴ ساعت میزان تورم پا در مقایسه با پای چپ که با حجم مساوی سرم فیزیولوژی تزریق شده بود اندازه‌گیری شد (شکل ۳).

در هر گروه واکسینه بین موش‌های تحریک شده با پپتید پلی‌توپ یا مخلوط دو ای‌توپ موشی (E405+C132) و موش‌های تحریک شده با پپتید کنترل (غیرمرتبط) تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.01$) که نشانه اختصاصی بودن پاسخ سلولی ایجاد شده علیه پپتیدپلی‌توپ و نیز مخلوط ای‌توپ‌های موشی بود. این در حالی بود که افزایش برجستگی معنی‌دار در موش‌های تحریک شده با مخلوط ای‌توپ‌های انسانی (E614+N1406) مشاهده نشد. همچنین در مقایسه با گروه‌های کنترل (واکسینه با پلاسمید pcDNA3.1، pch) و یا غیرواکسینه، با میانگین تورم ۰/۰۳-۰/۰۱ میلی‌متر) گروه‌های درمان تحریک شده با پپتیدهای پلی‌توپ یا مخلوط دو ای‌توپ موشی (با میانگین تورم به ترتیب ۰/۴۶-۰/۲ و ۰/۱۱-۰/۰۲ میلی‌متر) افزایش برجستگی معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.01$). نکته جالب توجه اینکه میانگین افزایش برجستگی پا در گروه‌های ایمن شده با پلاسمیدهای pchPOL1 (۰/۳۳ میلی‌متر)، pchPOL2 (۰/۳۶ میلی‌متر) و pchPOL3 (۰/۴۶ میلی‌متر) در مقایسه با گروه‌های واکسینه با پلاسمیدهای پلی‌توپ مربوطه که فاقد ژن HBsAg-S بودند (pcPOL2، pcPOL1، pcPOL3) به ترتیب با ۰/۲، ۰/۲۴ و ۰/۳ میلی‌متر) نیز تفاوت معنی‌داری داشت ($p < 0.05$).

در مقایسه با پروتئین طبیعی به میزان قابل توجهی (حدود ۷۰ درصد) کاهش یافته بود (شکل ۲ ج). این یافته با گزارش دیگری که میزان ترشح ذرات هیبرید HBSAg-S متصل به پپتید ۹۸ اسید آمینه‌ای را معادل HBSAg-S طبیعی یافته بود (۶۵) در تضاد است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً میزان ترشح بیش از آنچه به اندازه نسبی قطعه متصل شده وابسته باشد، به انعطاف پذیری و انطباق HBSAg-S با توالی افزوده شده ارتباط دارد.

در مجموع این نتایج احتمال تشکیل ذرات شبهه ویروسی هیبرید از پپتید پلی توپ با HBSAg-S، ولو به مقدار کم را مطرح می‌کنند. با این حال دست‌یابی به اطلاعات بیشتر در مورد کیفیت و کمیت تشکیل این نانو ذرات، مستلزم بررسی بیشتر آنها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی است (۷۲).

انجام تست پوستی DTH در موش‌های BALB/c ایمن شده با سازدهای پلی توپ حاکی از کارایی این پلاسمیدها در تحریک سیستم ایمنی بود (شکل ۳). پاسخ DTH که تقریباً ۱۸ الی ۲۴ ساعت پس از تحریک شروع شده و تا ۹۶ ساعت ادامه یافت در حقیقت نشانه یک واکنش یادآور (Recall) بوده و از حساس شدن اختصاصی سلول‌های T قبل از تحریک با پپتید سنتتیک حکایت می‌کرد. بنابراین پاسخ مثبت DTH تایید دیگری بر بیان *in vivo* پلاسمیدهای پلی توپ و نیز ایمنی‌زایی اولیه آنها بود. به علاوه پاسخ مثبت در قبال تحریک با مخلوط اپی توپ‌های موشی (پپتیدهای ۱۱-۹ اسید آمینه‌ای) پردازش این اپی توپ‌های CTL به دنبال واکنش‌های موش‌ها با DNA پلاسمیدی پلی توپ را نشان داد. همان‌طور که انتظار می‌رفت فقدان پاسخ معنی‌دار در مقابل تحریک با اپی توپ‌های انسانی نیز ناشی از ناتوانی موش‌های H-2^d (BALB/c) در شناسایی و عرضه اپی توپ‌های HLA-A2 بود. نکته جالب توجه اینکه برخلاف چشم‌گیر نبودن میزان ترشح ذرات هیبرید HBS-polytope در این مطالعه، در تایید گزارش‌های قبلی مبنی بر اثر افزایشی HBSAg-S بر پاسخ آنتی‌بادی و CTL علیه آنتی‌ژن‌های کامل (۶۵، ۷۳) افزایش معنی‌دار پاسخ ایمنی ($p < 0.05$) علیه سازدهای پلی توپ متصل به HBSAg-S مشاهده شد (شکل ۳) که تاکیدی بر کارایی بهتر آمیزه دو تکنولوژی پلی توپ و VLP است. این افزایش ایمنی‌زایی می‌تواند به علت تحریک سلول‌های Th علیه اپی توپ‌های کمکی HBSAg و کمک آنها به پاسخ سلول‌های CTL اختصاصی و یا بیان بیشتر پلی توپ‌های هیبرید باشد. اضافه بر آنکه همان مقدار کم ترشح ذرات هیبرید نیز موجب برداشت و عرضه بهتر اپی توپ‌ها توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن خواهد بود.

اگرچه نتایج آزمون DTH ایمنی‌زایی بیشتر پلاسمیدهای بیان کننده ترادف ۳ پلی توپی (pcPOL3 و pcHPOL3) را نسبت به دو ترادف دیگر نشان داد ولی نتیجه‌گیری قطعی در این باره نیازمند انجام ارزیابی‌های دقیق‌تر با استفاده تکنیک‌های نوین می‌باشد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر مراحل گام به گام تهیه یک واکسن DNA چند اپی توپی را از مرحله انتخاب اپی توپها و طراحی *in silico* تا ساخت و ارزیابی‌های *in vitro* و *in vivo* نشان داده و با توجه به هزینه و مشکلات کار با حیوان ترا ریخته، که مدل مناسب برای سنجش این نوع واکسن است، بر استفاده از روش‌های ارزیابی آزمایشگاهی و نیز سنجش اولیه این نوع واکسن در حیوان معمول (موش BALB/c) تکیه می‌کند. هم‌چنین نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که با توجه به مشکلات ناشی

ترجمه سلول‌های جانوری استفاده می‌کنند، این بهینه‌سازی کدون در مورد ژن‌های ویروسی، ضروری به نظر نمی‌رسید. اما اخیراً اثر افزایشی این روش در مورد بیان توالی‌های نوکلئوتیدی با منشأ ویروسی نیز به اثبات رسیده است (۵۷، ۵۸).

استفاده از پروموتور قدرتمند CMV که برتری آن در مقایسه با پروموتورهای مختلف جانوری قبلاً نشان داده شده است (۶۱-۵۹) و نیز طراحی توالی ACCATGG (Kozak) (۶۲) در ابتدای هر ژن از دیگر تمهیدات به کار رفته برای افزایش بیان بوده‌اند. هم‌چنین با هدف بررسی اثر افزایش توالی‌های سازنده ذرات شبهه ویروسی (VLP) بر ایمنی‌زایی پپتیدهای پلی توپ از اتصال ژن HBSAg-S با توالی پلی توپ در برخی از سازدها استفاده شد که این خود می‌تواند افزایش بیان پلی توپ هیبرید را به دنبال داشته باشد (اگرچه این تفاوت بیان در مطالعه حاضر بررسی نشده است). گزارش‌ها نشان می‌دهد که استفاده از ذرات هیبرید VLP به عنوان ناقلین آنتی‌ژنی با مکانیسم‌های مختلف از جمله عرضه بهتر آنتی‌ژن توسط سلول‌های عرضه کننده (APC) می‌تواند موجب افزایش پاسخ ایمنی گردد (۶۳، ۶۴). HBSAg-S با داشتن ذخیره غنی از اپی توپ‌های کمکی (Th)، قابلیت ترشح بیشتر و طولانی‌تر و نیز داشتن مجوز استفاده برای واکنش‌های جهانی علیه بیماری هپاتیت بی (۶۵، ۶۶)، در بین توالی‌های سازنده ذرات شبهه ویروسی، گزینه مناسبی را به منظور انتقال و عرضه اپی توپ‌های خارجی به سیستم ایمنی ارائه می‌کند. لوپ هیدروفیل خارجی موجود در ساختمان سه بعدی این ذرات - که اپی توپ اصلی سلول‌های B را نیز در خود جای داده است - اگرچه به عنوان محلی مناسب برای افزودن آنتی‌ژن‌های خارجی استفاده شده (۶۷، ۶۸) اما بیشتر باعث تحریک پاسخ هومورال علیه این آنتی‌ژن‌ها شده است. به علاوه آنتی‌ژن‌های افزوده شده به این ناحیه و نیز انتهای آمینی پروتئین اغلب باعث کاهش ترشح ذرات شده‌اند (۶۹-۷۱). بنابراین طراحی مطالعه حاضر طوری صورت گرفت که با اتصال توالی‌های پلی توپ به انتهای ۳' HBSAg-S پپتیدهای پلی توپ در قالب قرائت ژن HBSAg-S و به صورت متصل به انتهای کربوکسیل آن بیان شوند.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که بیان ذرات نو ترکیب HBSAg در سلول‌های جانوری، برخلاف بیان آنها در مخمر موجب گلیکوزیله شدن نسبی پروتئین و پیدایش یک باند دو گانه (Doublet) در وسترن بلات می‌گردد که شاخص بیان HBSAg بوده و باند سنگین‌تر با اختلاف وزن حدود ۳ کیلو دالتون به دنبال تیمار با آنزیم اندوگلیکوزیلاز از بین می‌رود (۵۴). در نتیجه وسترن بلات این مطالعه، مشاهده شاخص باند دو گانه مذکور با اختلاف اندازه حدود ۳ کیلو دالتون نشان داد که همانند HBSAg طبیعی، احتمالاً پروتئین هیبرید HBS-polytope نیز تحت عمل گلیکوزیلاسیون قرار گرفته و به این ترتیب اتصال پپتید پلی توپ به انتهای کربوکسیل پروتئین سطحی ویروس هپاتیت بی، در تشکیل و روند اصلاحات پس از ترجمه این ذرات ایجاد اختلال نکرده است.

در برخی گزارش‌ها نشان داده شده بود که افزایش طول پروتئین HBSAg می‌تواند مانع از شکل‌گیری ذرات VLP گردد و به این ترتیب طول قطعه اضافه شده به عنوان عامل اصلی تعیین کننده میزان ترشح ذرات معرفی شده بود (۶۶، ۷۰). با توجه به این موارد در تحقیق حاضر سعی شد که با کاهش طول قطعه پلی توپ به ۴۰ اسید آمینه کمترین تداخل با روند طبیعی تشکیل ذرات و ترشح آنها ایجاد شود. اما در کمال تعجب علیرغم بیان درون سلولی پروتئین هیبرید و تایید آن با روش‌های مختلف (شکل ۲ الف و ب)، ترشح ذرات هیبرید

موجود در واکسن با هدف به دست آوردن دیدگاه عمیق تر نسبت به پردازش و عرضه اپی توپها و تاثیر ترادف آنها، بر روی موش ترا ریخته دارای HLA-A2.1 در حال انجام است.

تقدیر و تشکر

کلیه هزینه های این تحقیق توسط انستیتوپاستور ایران تامین شده است.

References

1. Gruener NH, Gerlach JT, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, et al. Association of hepatitis C virus-specific CD8+T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis.* 2000; 181: 1528-1536.
2. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med.* 2000; 191: 1499-1512.
3. Cooper S, Erickson AL, Adams EG, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity.* 1999; 10: 439-449.
4. Kundig TM, Bachmann MF, Oehen S, Hoffman UW, Simard JLL, Kalberer CP, et al. On the role of antigen in maintaining cytotoxic T-cell memory. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 9716-9723.
5. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Gh-rayeb J, Reimann KA, et al. Memory CD8+ T cells are required for protection from hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2003; 197:1645-1655.
6. Vertuani S, Bazzaro M, Gualandi G, Micheletti F, Marastoni M, Fortini C, et al. Effect of interferon-alpha therapy on epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in hepatitis C virus-infected individuals. *Eur J Immunol.* 2002; 32: 144-154.
7. Gremion C, Cerny A. Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. *Rev Med Virol.* 2005; 15: 235-268.
8. Simmonds P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *J Hepatol.* 1998; 31: 54-60.
9. Zein NN. Clinical significance of HCV genotypes. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13(2): 223-235.
10. Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J, et al. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* 2001; 15: 885-895.
11. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. DNA vaccines: protective immunization by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 11478-11482.
12. Cui Z. DNA vaccine. *Adv Genet.* 2005; 54: 257-289.
13. Li X, Yang X, Jiang Y, Liu J. A novel HBV DNA vaccine based on T cell epitopes and its potential therapeutic effect in HBV transgenic mice. *Int Immunol.* 2005; 17(10): 1293-1302.
14. Chen M, Sallberg M, Sonnerborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L, et al. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.* 1999; 116:135-43.
15. Klenerman P, Zinkernagel RM. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. *Nature.* 1998; 394(6692): 482-485.
16. Rimmelzwaan GF, Boon AC, Voeten JT, Berkhoff

از ناپایداری و بیان پپتیدهای پلی توپ استفاده از راه کارهای مناسب در طراحی مانند انتخاب صحیح اپی توپها و ترادف آنها، انتخاب و کنترل و پروموتور مناسب و بهینه سازی کدون های انسانی می تواند به افزایش بیان و عرضه اپی توپها و در نتیجه ایمنی زایی واکسن منجر شود. در نهایت این مطالعه، قابلیت اپی توپهای انتخاب شده از ویروس هپاتیت سی را برای ایجاد پاسخ ایمنی سلولی اختصاصی در قالب یک واکسن DNA چند اپی توپی مطرح می سازد. به دنبال این مطالعه و اطمینان از عملکرد واکسن، آنالیز دقیق پاسخ CTL علیه اپی توپهای انسانی

- EG, Fouchier RA, Osterhaus AD. Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res.* 2004; 103(1-2): 97-100.
17. Takada A, Kawaoka Y. Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo implications. *Rev Med Virol.* 2003; 13(6): 387-398.
18. 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):6409-6419.
19. Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, Lopez-Diaz de CA, 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): 5062-5070.
20. 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.
21. 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): 5615-5624.
22. Suhrbier A. Polytope vaccines for the co delivery of multiple CD8 T-cell epitopes. *Expert Rev Vaccines.* 2002; 1(2): 207-213.
23. 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): 5320-5325.
24. Doan T, Herd K, Ramshaw I, Thomson S, Tindle RW. A polytope DNA vaccine elicits multiple effector and CTL responses and protects against human papillomavirus 16 E7-expressing tumour. *Cancer Immunol Immunother.* 2005; 54: 157-71.
25. Wilson CC, McKinney D, Anders M, MaWhinney S, Forster J, Crimi C, et al. Development of a DNA vaccine designed to induce cytotoxic T lymphocyte responses to multiple conserved epitopes in HIV-1. *J Immunol.* 2003; 171: 5611-23.
26. 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: 3676-3690.
27. Thomson SA, Khanna R, Gardner J, Burrows SR, Coupar B, Moss DJ, et al. Minimal epitopes expressed in a recombinant polyepitope protein are processed and presented to CD8+ cytotoxic T cells: Implications for vaccine design. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:

- 5845-5849.
28. Thomson SA, Elliott SL, Sherritt MA, Sproat KW, Coupar BE, Scalzo AA, et al. Recombinant polyepitope vaccines for the delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol.* 1996; 157: 822-826.
29. Bergmann CC, Yao Q, Ho CK, Buckwold SL. Flanking residues alter antigenicity and immunogenicity of multi-unit CTL epitopes. *J Immunol.* 1996; 157: 3242-3249.
30. Shirai M, Chen M, Arichi T, Masaki T, Nishioka M, Newman M, et al. Use of an intrinsic and extrinsic helper epitopes for in vivo induction of anti-hepatitis C virus cytotoxic T lymphocytes (CTL) with CTL epitope peptide vaccines. *J Infect Dis.* 1996; 173: 24.
31. Wentworth PA, Vitiello A, Sidney J, Keogh E, Chesnut RW, Grey H, et al. Differences and similarities in the A2.1-restricted cytotoxic T cell repertoire in humans and human leukocyte antigen-transgenic mice. *Eur J Immunol.* 1996; 26: 97.
32. Leroux-Roels G. Development of prophylactic and therapeutic vaccines against hepatitis C virus. *Expert Rev Vaccines.* 2005; 4(3): 351-371.
33. Martin P, Inchauspé G. Hepatitis C vaccines. *Drug Disco Today: Therap Strategies.* 2006; 3(2): 203-209.
34. Yusim K, Richardson R, Tao N, Szinger JJ, Funkhouser R, Korber B, et al. The Los Alamos Hepatitis C Immunology Database. *Appl Bioinformatics.* 2005; 4: 217-225.
35. Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene.* 1989; 77(1): 61-68.
36. Carter JM. Production of anti-peptide antisera. In: Coligan J, Bierer B, Margulies D, Shevach E, Strober W, editors. *Current protocols in immunology.* New York: John Wiley & Sons Inc. 2006; P 9.3.1-9.3.16.
37. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Bio-technology.* 1992; 24: 145-149.
38. Loi PK, Mcgraw HF, Tublitz NJ. Peptide detection in single cell using a dot immunoblot assay. *Peptides.* 1997; 18: 749-753.
39. Radhakrishnan S, Abraham P, Sridharan G. Improved sensitivity of reverse transcriptase polymerase chain reaction for hepatitis C virus using random hexamer primers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999; 33: 153-156.
40. Sambrook J, Russell DW. Analysis of gene expression in cultured mammalian cells. In: Sambrook J, Russell DW, editors. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Third ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001; 17: 48-17.51.
41. Leenars PPAM, Hendriksen CFM, de Leeuw WA, Carat F, Delahaut P, Fischer R. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals, the report and recommendations of ECVAM workshop 35. *ATLA abstracts.* 1999; 27: 79-102.
42. Kundig TM, Althage A, Hengartner H, Zinkernagel RM. Skin test to assess virus-specific cytotoxic T-cell activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 7757-7761.
43. Gulukota K, DeLisi C. HLA allele selection for designing peptide vaccines. *Genet Anal.* 1996; 13: 81-86.
44. Sarobe P, Huarte E, Lasarte JJ, de Cerio L, Garcia N, Borràs-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: 321-329.
45. Shirai M, Arichi T, Nishioka M, Nomura T, Ikeda K, Kawanishi K, et al. CTL responses of HLA-A2.1-transgenic mice specific for hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of humans carrying HLA-A2.1. *J Immunol.* 1995; 154: 2733-2742.
46. Lohr 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: 407-415.
47. Himoudi N, Abraham JD, Fournillier A, Lone YC, Joubert A, De Beeck AO, et al. Comparative vaccine studies in HLA-A2.1-transgenic mice reveal a clustered organization of epitopes presented in hepatitis C virus natural infection. *J Virol.* 2002; 76(24): 12735-12746.
48. 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: 4555-4564.
49. 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; 19: 1395-1406.
50. Yewdell JW. Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. *Immunology.* 2006; 25: 533-543.
51. 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: 271-276.
52. Reche PA, Glutting JP, Reinherz EL. Prediction of MHC class I binding peptides using profile motifs. *Hum Immunol.* 2002; 63: 701-709.
53. Kuttler C, Nussbaum AK, Dick TP, Rammensee HG, Schild H, Haderl KP. An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. *J Mol Biol.* 2000; 298: 417-429.
54. Yu D, Amano C, Fukuda T, Yamada T, Kuroda S, Tanizawa K, et al. The specific delivery of proteins to human liver cells by engineered bio-nanocapsules. *FEBS J.* 2005; 272(14): 3651-3660.
55. Sureau C, Fournier-Wirth C, Maurel P. Role of N glycosylation of hepatitis B virus envelope proteins in morphogenesis and infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol.* 2003; 77: 5519-5523.
56. Ulmer JB, Wahren B, Liu MA. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol Med.* 2006; 12(5): 216-222.
57. Andre S, Seed B, Erberle J, Schraut W, Bultmann A, Haas J. Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp 120 sequence with optimized codon usage. *J Virol.* 1998; 72: 1497-1503.
58. Deml L, Bojak A, Steck S, Graf M, Wild J, Schirmbeck R, et al. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol.* 2001; 75(22): 10991-11001.
59. Galvin TA, Muller J, Khan AS. Effect of different promoters on immune responses elicited by HIV-1 gag/env multigenic DNA vaccine in Macaca mulatta and Macaca nemestrina. *Vaccine.* 2000; 18: 2566-2583.
60. Xiang ZQ, Spitalnik SL, Cheng J, Erickson J, Wojczyk B, Ertl HCG. Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology.* 1995; 209: 569-579.
61. Xu Z-L, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Uchida E, Mayumi T, Hayakawa T. Optimization of transcriptional

- regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*. 2001; 272: 149-156.
62. Garmory HS, Brown KA, Titball RW. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genet Vaccines Ther*. 2003; 1(1): 2-14.
63. Jin H, Xiao W, Xiao C, Yu Y, Kang Y, Du X, et al. Protective immune responses against foot-and-mouth disease virus by vaccination with a DNA vaccine expressing virus-like particles. *Viral Immunol*. 2007; 20(3): 429-440.
64. Wong SB, Siliciano RF. Contribution of virus-like particles to the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 Gag-derived vaccines in mice. *J Virol*. 2005; 79(3): 1701-1712.
65. Baez-Astua A, Herraes-Hernandez E, Garbi N, Passolli HA, Juarez V, Zur HH, 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): 12807-12817.
66. Woo WP, Doan T, Herd K, Netter HJ, Tindle R. Hepatitis B surface antigen vector delivers protective cytotoxic T-lymphocyte responses to disease-relevant foreign epitopes. *J Virol*. 2006; 80(8): 3975-3984.
67. Netter HJ, Macnaughton TB, Woo WP, Tindle R. Antigenicity and immunogenicity of novel chimeric hepatitis B surface antigen particles with exposed hepatitis C virus epitopes. *J Virol*. 2001; 75(5): 2130-2141.
68. Michel ML, Mancini M, Sobczak E, Favier V, Guetard D, Bahraoui EM et al. Induction of anti-human immunodeficiency virus (HIV) neutralizing antibodies in rabbits immunized with recombinant HIV-hepatitis B surface antigen particles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 7957-7961.
69. Lee IH, Kim CH, Ryu WS. Presentation of the hydrophilic domains of hepatitis C viral E2 envelope glycoprotein on hepatitis B surface antigen particles. *J Med Virol*. 1996; 50(2): 145-151.
70. Delpeyroux F, Chenciner N, Lim A, Lambert M, Malpica Y, Streeck RE. Insertions in the hepatitis B surface antigen. Effect on assembly and acretion of 22-nm particles from mammalian cells. *J Mol Biol*. 1987; 195: 343-350.
71. Delpeyroux F, Van Wezel F, Blondel B, Crainic R. Structural factors modulate the activity of antigenic poliovirus sequences expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles. *J Virol*. 1990; 64: 6090-6100.
72. Berkower I, Raymond M, Muller J, Spadaccini A, Aberdeen A. Assembly, structure and antigenic properties of virus-like particles rich in HIV-1 envelope gp120. *Virology*. 2004; 321: 75-86.
73. Wunderlich G, Moura IC, del Portillo HA. Genetic immunization of BALB/c mice with a plasmid bearing the gene coding for a hybrid merozoite surface protein 1-hepatitis B virus surface protein fusion protects mice against lethal *Plasmodium chabaudi chabaudi* PC1 infection. *Infect Immun*. 2000; 68(10): 5839-5845.