

## ارزیابی ایمونولوژیک واکسن پپتیدی HIV-1-P24-Nef با ادجوانت مونوفسفریل لیپید A در موش‌های BALB/c

مهدى مهدوى<sup>۱</sup>، معصومه ابتکار<sup>۲\*</sup>، کيهان آزادمنش<sup>۳</sup>، فريدون مهبدى<sup>۴</sup>، حميدرضا خرم‌خورشيد<sup>۵</sup>، فاطمه رهبرى‌زاده<sup>۶</sup>  
امير نژاده‌قدم<sup>۷</sup>، زهير محمد حسن<sup>۸</sup>

- ۱- دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، انتیتوپاستور ایران، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، انتیتوپاستور ایران، تهران، ایران
- ۵- دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران
- ۶- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۷- کارشناس ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، انتیتوپاستور ایران، تهران، ایران
- ۸- استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۰۷/۰۷ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۱۶

### چکیده

هدف: واکسن‌های متعددی علیه ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان بررسی شده‌اند؛ اما هیچ‌کدام از واکسن‌ها به عنوان واکسن ضد ایدز مورد تأیید قرار نگرفته‌اند. یک راهکاری که بتوان پاسخ ایمنی را علیه بیماری‌زاها تقویت نمود، به کارگیری یک واکسن چند اپی‌توبی است. این استراتژی علیه واکسن‌های متعددی به کار گرفته شده است و پاسخ‌های ایمنی را بهبود بخشیده است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق یک پپتید الحقیقی چند اپی‌توبی شامل قسمت‌هایی از P24 و Nef ویروس نقص ایمنی اکتسابی انسان به عنوان کاندید واکسن به موش‌ها تزریق شد و سپس پاسخ‌های ایمنی همورال با سنجش تیتر آنتی‌بادی کل و تعیین زیرکلاس‌های IgG به کمک الایزا مشخص شد. همچنین سنجش پاسخ‌های ایمنی سلولی با بررسی پاسخ‌های تکثیری سلول‌های طحالی با استفاده از MTT و سلول‌کشی با روش آزمایش لاكتات دهیدروژناز بررسی شد. در نهایت الگوی سیتوکین‌های ایترافرون گاما و ایترولوکین-۴ نیز به کمک الایزا مشخص شد.

نتایج: نتایج پژوهش حاضر بیانگر آنست که واکسن کاندید باعث تحریک پاسخ تکثیری لنفوسيت‌های طحالی موش شده و همچنین پاسخ‌های سلول‌کشی قادر تمندی را نیز القا نموده است. بررسی پاسخ ایمنی همورال نشان داده است که واکسن کاندید باعث تولید آنتی‌بادی اختصاصی شده که اغلب از زیرکلاس IgG2a است. همچنین بررسی الگوی سیتوکینی نشان داده است که ترشح ایترافرون گاما پاسخ غالب بوده است.

نتیجه‌گیری: به کارگیری اپی‌توب‌های ایمونوژن و حفاظت شده از P24 و Nef موجب القای پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی قادر تمندی شده است و می‌توان کاندیدی برای مطالعات بیشتر در مدل‌های حیوانی باشد.

کلیدواژگان: واکسن پپتیدی، HIV-1-P24-Nef، ادجوانت، مونوفسفریل لیپید A، موش c/BALB

\*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی، کد پستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶

Email: ebtekarm@modares.ac.ir

پروتئینی برای اولین بار، در این پژوهش به عنوان کاندید واکسن استفاده شده است بنابراین در تحقیق حاضر پپتید الحاقی (Adjuvant) HIV-P24-Nef با استفاده از ادجوانت (Monophosphoryl Lipid A: MPLA) به موش‌ها تزریق و پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی بررسی شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۱-۱- تهیه پپتید HIV-P24-Nef

پپتید الحاقی HIV-P24-Nef شامل توالی‌های (۱۵۹-۱۷۳) P24 و از (۱۰۲-۱۱۷) Nef توسط شرکت GL Biochem از کشور چین در فاز جامد سنتز شده و با خلوص بالای ۹۵ درصد استفاده شد.

### ۱-۲- تهیه پپتید HIV-P24-Nef مخلوط در ادجوانت MPLA

برای ایمن نمودن موش‌ها، به ازای هر موش ۲۰ میکروگرم پپتید که در بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) حل شده بود، در حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر در مخلوط شد و سپس برای تزریق زیر پوستی استفاده شد.

### ۱-۳- گروه‌های مورد مطالعه و تزریق واکسن کاندید

تعداد ۱۶ سر موش c BALB/Mاده ۶ تا ۸ هفت‌های از انسٹیتو پاستور ایران (کرج) خریداری شد. موش‌ها به چهار گروه چهار تایی تقسیم شدند. به گروه اول ۲۰۰ میکرولیتر شامل ۲۰ میکروگرم آنتی‌ژن مخلوط شده با ادجوانت MPLA و به گروه دوم ۲۰ میکرولیتر آنتی‌ژن در حجم ۲۰۰ میکرولیتر در PBS به صورت زیر پوستی تزریق شد. به عنوان گروه‌های کنترل به چهار سر موش، ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS و به گروه

## ۱- مقدمه

با وجود تلاش‌های فراوان در مورد ساخت یک واکسن مؤثر و کارای ضد ویروس نقص سیستم ایمنی انسان (Human Immunodeficiency Virus: HIV) دسترسی به آن کماکان در پرده‌ای از ابهام قرار دارد [۱]. داروهای ضد عفونت (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) در پاک‌سازی کامل بدن از عفونت ناتوان بوده‌اند و به نظر می‌رسد که شاید یک واکسن مؤثر و کارامد بتواند مشکل پاندمی جهانی را برطرف سازد [۲]. شواهد نشان می‌دهد که برخی از اپی‌توب‌های موجود در ساختار ویروس HIV ایمونوژن (Immunogene) و حفاظت شده (Conserved) است و پاسخ‌های ایمنی را به خوبی تحریک می‌نماید [۳].

پروتئین P24 از ایمونوژن ترین پروتئین‌های ویروس HIV است که پاسخ‌های سلول‌کشی (Cytotoxic) ضد آن در کنترل بیماری نقش دارد [۴]. از طرف دیگر یکی از ژن‌های تنظیمی ویروس AIDS که در چرخه زندگی ویروس نیز نقش حیاتی دارد ژن Nef است که به عنوان کاندید واکسن، تحقیقات زیادی روی آن صورت گرفته است [۵]. جالب توجه این‌که در پروتئین Nef اپی‌توب‌های محافظت شده متعددی وجود دارد که در افراد آلوده به AIDS پاسخ‌های سلول‌کشی قدرتمندی علیه آن‌ها مشاهده شده است. این ویژگی‌ها این مناطق را کاندید مناسبی برای واکسن قرار می‌دهد [۶، ۷] پروتئین Nef در بیماری‌زایی ویروس AIDS بسیار اهمیت دارد و در مراحل اولیه چرخه ویروس نقش مهمی بر عهده دارد. از سوی دیگر؛ یافته‌های علمی نشان می‌دهد که اپی‌توب‌های ایمونوژن متعددی در سطح Nef وجود دارد که توسط لنفوسيت‌های B و T شناسایی می‌شود و پاسخ ایمنی قدرتمندی به آن‌ها داده می‌شود [۸، ۹]. بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از پروتئین Nef در ساختار یک واکسن کاندید چند اپی‌توبی بتواند کارایی واکسن را ارتقا بخشند.

در پژوهش حاضر با به کارگیری پپتید الحاقی (Fusion peptide)، آثار ایمونولوژیک آن بررسی شد. این ترکیب HIV-P24-Nef

سیتوکین موشی (R&D system, USA) صورت گرفت و سپس نسبت ۴-IFN- $\gamma$ /IL-۴ محاسبه شد.

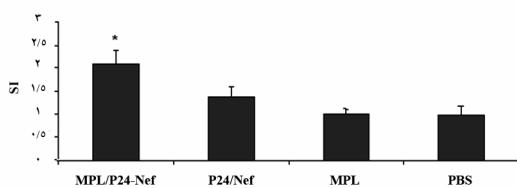
## ۷-۲- بررسی تیتر IgG اختصاصی و زیر کلاس‌های آن

بدین منظور دو هفته پس از آخرین ایمن‌سازی موش‌ها از آن‌ها خون‌گیری نموده و سرم جدا شد. برای سنجش تیتر ELISA آنتی‌بادی و زیر کلاس‌های IgG1 و IgG2a از روش استفاده شد.

## ۸-۲- بررسی آماری

برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون آنواروی یک سویه (Tukey's test) و آزمون توکی (One-Way ANOVA) در سطح ۹۵ درصد اطمینان استفاده شد. همه داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) بیان شد و P کوچک‌تر از ۰/۰۵ به معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

بررسی سطح پاسخ‌های تکثیری سلول‌های طحالی



نمودار ۱ بررسی پاسخ‌های تکثیری سلول‌های طحالی با روش MTT در گروه‌های مطالعه؛ داده‌ها به صورت SI نشان داده شده است و نمودار شامل میانگین  $\pm$  انحراف معیار است. واکسن کاندید به همراه MPL موجب افزایش معنی دار پاسخ‌های تکثیری سول‌های طحال نسبت به پیتید بalon ادجوانست (P=۰/۰۴۵) و گروه‌های کنترل (P=۰/۰۰۱) شده است. بین پیتید تنها و گروه‌های کنترل اختلاف معنی داری مشاهده نشد. (※: اختلاف معنی دار)

## ۳- نتایج

### ۳-۱- پاسخ تکثیری لنفوسيت‌ها به واکسن

یافته‌ها بیانگر آنست که تزریق پیتید مخلوط شده با

دیگر ۲۰۰ میکرولیتر ادجوانست MPLA تنها تزریق شد. موش‌ها چهار هفته بعد با شرایط مشابه دوز تقویت کننده (Booster Dose) واکسن کاندید را دریافت نمودند.

## ۴-۲- بررسی پاسخ‌های تکثیری لنفوسيت‌ها

دو هفته پس از آخرین تزریق پیتید، پاسخ‌های تکثیری با روشن استاندارد ۳-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-MTT (2,5-diphenyltetrazolium bromide) نتایج پاسخ تکثیری به صورت شاخص تحریک (Stimulation Index: SI) با توجه به کنترل هر نمونه از آزمون (جذب سلول‌های تحریک نشده/جذب سلول‌های تحریک شده) محاسبه شد.

## ۵-۲- بررسی پاسخ لنفوسيت‌های سلول کش

با استفاده از روش استاندارد لاکتات دهیدروژناز (Lactate Dehydrogenase: LDH) پاسخ‌های سلول کشی بررسی شد. همچنین میزان درصد سلول کشی با فرمول ارایه شده در کیت محاسبه شد [۱۰].

## ۶-۲- بررسی الگوی پاسخ سیتوکینی [ایترفرون گاما] (Interferon gamma: IFN- $\gamma$ ) و ایتلولوکین ۴ (Interleukin 4: IL-4)

برای بررسی الگوی سیتوکینی از سوسپانسیون سلولی به دست آمده از طحال در محیط کشت سلولی FBS+RPMI (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد سوسپانسیونی به تعداد ۱۰<sup>۷</sup> سلول در هر میلی‌لیتر استفاده شد. سپس سلول‌های طحال در پلیت ۲۴ خانه‌ای با آنتی‌زن اختصاصی تحریک شدند. بعد از ۷۲ ساعت از کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۵ درصد CO<sub>2</sub> سوپ رویی جمع‌آوری شد. سنجش سیتوکینی با کمک کیت مخصوص الیزای (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)

پپتید مخلوط شده با ادجوانات در نسبت ۱/۵۰ با گروه آنتیژن تنها ( $P<0.001$ ) و گروههای کنترل ( $P<0.001$ ) و ۱/۱۰۰ با گروه آنتیژن تنها ( $P<0.002$ ) و گروههای کنترل ( $P<0.001$ ) اختلاف معنی داری دارد (جدول ۱). اما در گروهی که آنتیژن تنها را دریافت نموده اند تنها در نسبت ۱/۱۰۰ توانسته است با گروههای کنترل اختلاف معنی داری ایجاد نماید ( $P<0.047$ ) و در گروههای کنترل هیچ گونه اختلاف معنی داری مشاهده نشده است.

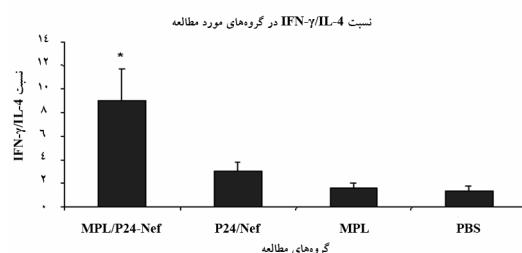
ادجوانات موجب افزایش پاسخهای تکثیری می شود (نمودار ۱)، به گونه ای که با گروه آنتیژن تنها ( $P=0.045$ ) و همچنین گروههای کنترل ( $P=0.001$ ) اختلاف معنی داری دارد، اما تزریق پپتید تنها فاقد چنین اثری بوده است.

### ۲-۳- بررسی پاسخ سلول کشی

بررسی پاسخهای CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) LDH نشان داده است که تزریق با استفاده از روش سنجش

جدول ۱ بررسی سلول کشی سلولهای طحالی در گروههای مطالعه؛ دادهها به صورت درصد سلول کشی نشان داده شده است و جدول شامل میانگین  $\pm$  انحراف معیار است. تزریق واکسن کاندید به همراه MPL موجب افزایش معنی دار پاسخهای سلول کشی در نسبت های ۵۰ و ۱۰۰ به تمامی گروههای ( $P=0.001$ ) شده است. تزریق پپتید بدون ادجوانات افزایش معنی دار پاسخهای سلول کشی در نسبت های ۱۰۰ به تمامی گروههای کنترل ( $P=0.047$ ) را نشان می دهد (\*: اختلاف معنی دار).

گروههای	نسبت سلول مؤثر به هدف
MPL/P24-Nef (درصد سلول کشی)	۱/۵۰±SD
PBS (درصد سلول کشی)	۱/۱۰۰±SD



نمودار ۲ بررسی نسبت ۴ IFN- $\gamma$ /IL-۴ در گروههای مطالعه؛ دادهها به صورت SI نشان داده شده است و نمودار شامل میانگین  $\pm$  انحراف معیار است. تزریق واکسن کاندید به همراه MPL موجب افزایش معنی دار نسبت ۴ IFN- $\gamma$ /IL-۴ در مقایسه با تمامی گروههای ( $P=0.001$ ) نشده است. تزریق پپتید بدون ادجوانات چنین اثری در مقایسه با گروههای کنترل ( $P=0.07$ ) نداشته است. (\*: اختلاف معنی دار)

### ۳-۳- الگوی سیتوکینی

یافته های حاضر نشان می دهد که با تزریق واکسن کاندید به همراه ادجوانت MPLA نسبت IFN-4 به طور معنی داری (نمودار ۲) نسبت به سایر گروهها افزایش می یابد ( $P<0.001$ ). تزریق پپتید بدون ادجوانات تغییر محسوسی نسبت به گروههای کنترل و هیچ گونه اختلاف معنی داری با این گروهها ندارد ( $P>0.401$ ). ( $P$ )

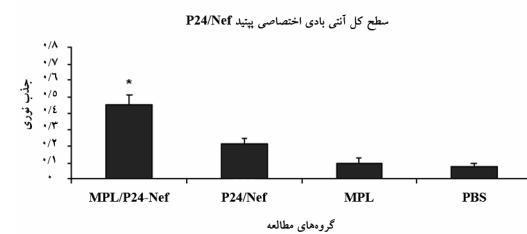
### ۴-۴- تیتر آنتی بادی اختصاصی

بررسی سطح آنتی بادی اختصاصی پپتید پس از ایمن سازی ثانویه نشان می دهد (نمودار ۳) که سطح پاسخهای آنتی بادی در گروه دریافت کننده واکسن کاندید به همراه ادجوانات با تمامی گروههای اختلاف معنی داری دارد ( $P<0.001$ ). همچنین تزریق پپتید بدون استفاده از ادجوانات نیز موجب القای پاسخ آنتی بادی شده است اما در مقایسه با گروههای کنترل اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد ( $P>0.057$ ).

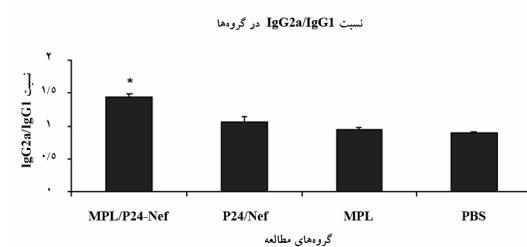
یافته های حاضر نشان می دهد (نمودار ۴) که تزریق واکسن کاندید به همراه ادجوانات MPLA موجب افزایش سطح آنتی بادی اختصاصی IgG2a می شود و به دنبال آن موجب افزایش معنی دار نسبت IgG2a/IgG1 در مقایسه با گروههای

افزایش پاسخ‌های تکثیری در مقایسه با سایر گروه‌ها شده است. از سوی دیگر بررسی پاسخ‌های سلول‌کشی نیز نشان داده است که واکسن کاندید موجب القای قدرتمند پاسخ‌های CTL شده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که واکسن کاندید قادر به القای پاسخ‌های ایمنی سلولی است. در حقیقت پاسخ‌های ایمنی سلولی از پارامترهای مهم در کنترل عفونت‌های ویروسی خصوصاً در AIDS است و القای این شاخه از پاسخ‌های ایمنی می‌تواند یکی از ویژگی‌های مهم یک واکسن مؤثر باشد [۱۲]. بررسی عفونت تجربی در مدل میمون نشان داده است که حذف جمعیت لغوسیت‌های سلول‌کش منجر به گسترش عفونت می‌شود و این یافته علمی نشان می‌دهد که پاسخ‌های ایمنی سلولی به‌ویژه پاسخ‌های سلول‌کشی در کنترل عفونت AIDS نقش حیاتی دارند و بنابراین تقویت پاسخ‌های سلول‌کشی یکی از ویژگی‌های کلیدی یک واکسن مؤثر ضد AIDS است. تحقیقات متعددی در مورد آنتیژن‌های P24 و Nef نشان داده است که این دو پروتئین قادر به تحریک ایمنی سلولی هستند. ژانگ (Zhang) و همکاران با استفاده از ابی‌توب‌های متعددی از P24 به سطح بالایی از ایمنی سلولی دست یافتند [۱۳]. در مطالعه‌ای دیگر استریک (Streeck) و همکارانش نیز پاسخ‌های CTL قدرتمندی علیه برخی از ابی‌توب‌های P24 در بیماران مبتلا به AIDS مشاهده نمودند [۱۴]. همچنین مطالعات متعددی وجود دارد که همگی بیانگر القای پاسخ‌های ایمنی سلولی توسط پروتئین Nef است [۷]. در تحقیق حاضر، با استفاده از پیتید الحاقی دو پروتئین مذکور القای پاسخ‌های ایمنی مشاهده شد. در مرحله بعدی به مطالعه روی سیتوکین‌های IL-4 و IFN- $\gamma$  پرداخته شد. یافته‌های بررسی حاضر، نشان می‌دهد که تزریق پیتید با استفاده از ادجوانت MPLA موجب القای قدرتمند سیتوکین- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) می‌شود. الگوی Th1 افزایش معنی‌دار نسبت IFN- $\gamma$ /IL-4 در مقابله با عفونت‌های ویروسی و القای پاسخ‌های helper (۱) ایمنی سلولی، به‌ویژه پاسخ‌های CTL بسیار اهمیت دارد [۱۵]. اعتقاد بر اینست که القای الگوی سیتوکینی Th1 با پاسخ‌های

کنترل شد ( $P<0.01$ ).



نمودار ۳ بررسی سطح آنتی‌بادی کل اختصاصی؛ داده‌ها به صورت SI نشان داده شده است و نمودار شامل میانگین  $\pm$  انحراف معیار است. با تزریق واکسن کاندید به همراه MPL افزایش معنی‌دار سطح پاسخ‌های آنتی‌بادی اختصاصی نسبت به تمامی گروه‌ها ( $P=0.001$ ) مشاهده می‌شود. تزریق پیتید بدون ادجوانت چنین اثری در مقایسه با گروه‌های کنترل ( $P=0.07$ ) نداشته است. (※: اختلاف معنی‌دار)



نمودار ۴ بررسی در گروه‌های مطالعه؛ داده‌ها به صورت SI نشان داده شده است و نمودار شامل میانگین  $\pm$  انحراف معیار است. با تزریق واکسن کاندید به همراه MPL افزایش معنی‌دار نسبت به IgG2a/IgG1 نسبت به تمامی گروه‌ها ( $P=0.017$ ) مشاهده می‌شود. (※: اختلاف معنی‌دار)

## ۴- بحث

استفاده از چند ابی‌توب ایمونوژن در ساختار یک واکسن کاندید، راهکار مؤثری است که امروزه بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. اساس این تفکر تحریک جمعیت‌های سلولی اختصاصی چند ابی‌توب ایمونوژن و حفاظت شده علیه بیماری‌زای مورد نظر است و از این رو این پدیده موجب گسترش شدید پاسخ ایمنی علیه عامل بیماری‌زا شده و پاکسازی آن را از بدن بیمار آسان می‌کند [۱۱]. بررسی پاسخ‌های تکثیری سلول‌های طحالی متعاقب تزریق پیتید با استفاده از ادجوانت MPLA نشان می‌دهد که پیتید باعث

همورال را نيز تحریک نماید. از سوی دیگر یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تزریق پپتید بدون استفاده از ادجوانت باعث عدم تحریک و یا تحریک بسیار ضعیف سیستم ایمنی می‌شود و این بیانگر نقش مهم ادجوانات‌ها در افزایش کارایی واکسن است. با توجه به نتایج این بررسی می‌توان گفت که واکسن کاندید مطالعه حاضر پاسخ‌های ایمنی سلولی و همورال را به خوبی تحریک نموده و الگوی خوبی از پاسخ‌های سیتوکینی Th1 را القا می‌نماید؛ بنابراین شاید به مطالعات تکمیلی دیگری هم نیاز باشد تا در نهایت برای مراحل آزمایش‌های انسانی معرفی شود.

## ۵- تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه تربیت مدرس به دلیل تأمین بخشی از هزینه این پژوهش قدردانی می‌شود. همچنین نویسندهای از خانم‌ها مرضیه هلاکوئی و دکتر گلکار تقدير و تشکر می‌نمایند.

- [1] Watkins DI. The hope for an HIV vaccine based on induction of CD8+ T lymphocytes--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103(2): 119-29.
- [2] Cristillo AD, Wang S, Caskey MS, Unangst T, Hocker L, He L, Hudacik L, Whitney S, Keen T, Chou TH, Shen S, Joshi S, Kalyanaraman VS, Nair B, Markham P, Lu S, Pal R. Preclinical evaluation of cellular immune responses elicited by a polyvalent DNA prime/protein boost HIV-1 vaccine. Virology 2006; 346(1): 151-68.
- [3] Pal R, Wang S, Kalyanaraman VS, Nair BC, Whitney S, Keen T, Hocker L, Hudacik L, Rose N, Cristillo A, Mboudjeka I, Shen S, Wu-

ایمنی سلولی قدرتمندی همراه است که به دنبال آن با مهار پیشروی به سمت بیماری AIDS همراه است [۱۶]. بنابراین در طراحی یک واکسن کاندید، کسب الگوی پاسخ‌های سیتوکینی Th1 باید از ملزمومات طراحی واکسن باشد. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد می‌توان با به کارگیری پپتید مذکور به الگوی Th1 دست یافت. در این تحقیق همچنین پاسخ‌های ایمنی همورال نیز بررسی شد. یافته‌های حاضر نشان می‌دهد که ایمن‌سازی موش‌ها با واکسن کاندید به همراه ادجوانت MPLA موجب افزایش معنی‌دار آنتی‌بادی اختصاصی می‌شود و نوع پاسخ آنتی‌بادی غالب از کلاس IgG2a است. آنتی‌بادی Th1 IgG1 بیانگر الگوی Th2 بوده و در موش بیانگر است [۱۰] و این نتایج، یافته‌های دیگر این پژوهش را تأیید می‌نماید که الگوی پاسخ ایمنی ایجاد شده از نوع Th1 است. از آنجایی که پاسخ آنتی‌بادی در پاک‌سازی ویروس‌ها از خون مبتلایان به عفونت AIDS بسیار اهمیت دارد [۱۷]، این یکی از نقاط قوت واکسن کاندید در بررسی حاضر است زیرا یافته‌ها نشان داده که واکسن کاندید در مطالعه حاضر قادر است ایمنی

## ۶- منابع

- Chou TH, Montefiori D, Mascola J, Lu S, Markham P. Polyvalent DNA prime and envelope protein boost HIV-1 vaccine elicits humoral and cellular responses and controls plasma viremia in rhesus macaques following rectal challenge with an R5 SHIV isolate. J Med Primatol 2005; 34(5-6): 226-36.
- Rubio Caballero M, Rubio Rivas C, Nogués Biau A, Falguera Sacrest M, Manonelles Fernández A. [Survival and disease progression in 251 patients with HIV-1 infection. Study of p24 antigen and viral burden as prognosis makers. Their value at 4 years of follow-up]. An Med Interna 2001; 18(10): 517-20.
- Liang X, Fu TM, Xie H, Emini EA, Shiver JW.

- Development of HIV-1 Nef vaccine components: immunogenicity study of Nef mutants lacking myristylation and dileucine motif in mice. *Vaccine* 2002; 20(27-28): 3413-21.
- [6] Currier JR, Visawapoka U, Tovanabutra S, Mason CJ, Birx DL, McCutchan FE, Cox JH. CTL epitope distribution patterns in the Gag and Nef proteins of HIV-1 from subtype A infected subjects in Kenya: use of multiple peptide sets increases the detectable breadth of the CTL response. *BMC Immunol* 2006; 7: 8.
- [7] Bråve A, Gudmundsdotter L, Gasteiger G, Hallermalm K, Kastenmuller W, Rollman E, Boberg A, Engström G, Reiland S, Cosma A, Drexler I, Hinkula J, Wahren B, Erfle V. Immunization of mice with the nef gene from Human Immunodeficiency Virus type 1: Study of immunological memory and long-term toxicology. *Infect Agent Cancer* 2007; 2: 14.
- [8] Peng B, Voltan R, Cristillo AD, Alvord WG, Davis-Warren A, Zhou Q, Murthy KK, Robert-Guroff M. Replicating Ad-recombinants encoding non-myristoylated rather than wild-type HIV Nef elicit enhanced cellular immunity. *AIDS* 2006; 20(17): 2149-57.
- [9] Thakar MR, Bhonge LS, Lakhade SK, Shankarkumar U, Sane SS, Kulkarni SS, Mahajan BA, Paranjape RS. Cytolytic T lymphocytes (CTLs) from HIV-1 subtype C-infected Indian patients recognize CTL epitopes from a conserved immunodominant region of HIV-1 Gag and Nef. *J Infect Dis* 2005; 192(5): 749-59.
- [10] Jamali A, Mahdavi M, Hassan ZM, Sabahi F, Farsani MJ, Bamdad T, Soleimanjahi H, Motazakker M, Shahabi S. A novel adjuvant, the general opioid antagonist naloxone, elicits a robust cellular immune response for a DNA vaccine. *Int Immunol* 2009; 21(3): 217-25.
- [11] Kmiecik D, Bolesta E, Naito T, Gzyl J, Kaneko Y, Kozbor D. Enhancement of cellular and humoral immune responses to human immunodeficiency virus type 1 Gag and Pol by a G/P-92 fusion protein expressing highly immunogenic Gag p17/p24 and Pol p51 antigens. *J Hum Virol* 2001; 4(6): 306-16.
- [12] Promkhatkaew D, Pinyosukhee N, Thongdeejaroen W, Teeka J, Wutthinantiwong P, Leangaramgul P, Sawanpanyalert P, Warachit P. Prime-boost immunization of codon optimized HIV-1 CRF01\_AE Gag in BCG with recombinant vaccinia virus elicits MHC class I and II immune responses in mice. *Immunol Invest* 2009; 38(8): 762-79.
- [13] Zhang L, Jin N, Song Y, Wang H, Ma H, Li Z, Jiang W. Construction and characterization of a recombinant fowlpox virus containing HIV-1 multi-epitope-p24 chimeric gene in mice. *Sci China C Life Sci* 2007; 50(2): 212-20.
- [14] Streeck H, Licherfeld M, Alter G, Meier A, Teigen N, Yassine-Diab B, Sidhu HK, Little S, Kelleher A, Routy JP, Rosenberg ES, Sekaly RP, Walker BD, Altfeld M. Recognition of a defined region within p24 gag by CD8+ T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection in individuals expressing protective HLA class I alleles. *J Virol* 2007; 81(14): 7725-31.
- [15] Dai B, Yang L, Yang H, Hu B, Baltimore D, Wang P. HIV-1 Gag-specific immunity

- induced by a lentivector-based vaccine directed to dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(48): 20382-7.
- [16] Ramanathan VD, Kumar M, Mahalingam J, Sathyamoorthy P, Narayanan PR, Solomon S, Panicali D, Chakrabarty S, Cox J, Sayeed E, Ackland J, Verlinde C, Vooijs D, Loughran K, Barin B, Lombardo A, Gilmour J, Stevens G, Smith MS, Tarragona-Fiol T, Hayes P, Kochhar S, Excler JL, Fast P. A Phase 1 study to evaluate the safety and immunogenicity of a recombinant HIV type 1 subtype C-modified vaccinia Ankara virus vaccine candidate in Indian volunteers. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; 25(11): 1107-16.
- [17] Koopman G, Mortier D, Hofman S, Mathy N, Koutsoukos M, Ertl P, Overend P, van Wely C, Thomsen LL, Wahren B, Voss G, Heeney JL. Immune-response profiles induced by human immunodeficiency virus type 1 vaccine DNA, protein or mixed-modality immunization: increased protection from pathogenic simian-human immunodeficiency virus viraemia with protein/DNA combination. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt 2): 540-53.