Original Article

Comparison of Immunogenicity of HCV CD8-epitopes as a Single Epitope, Mixture of Epitopes and Polytope Peptide

Fatemeh Motevalli[1], Arash Memarnejadian[2], Seyed Mehdi Sadat[3], Golnaz Bahramali[1], Farzin Roohvand[2*]

1- M.Sc., Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran

3- Ph.D., Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1316943551, Department of Hepatitis & AIDS, Pasteur institute of Iran, Tehran, Iran*
Email: rfarzin@pasteur.ac.ir

Received: 13/Dec/2011, Accepted: 12/Feb/2012

Abstract

Objective: Animal studies show that vaccination with epitope-based peptides results in protective immunity. However, immunodominance should be regarded as a major challenge in this area. Considering the advantages of epitopic-vaccines against hepatitis C virus (HCV) infection, herein, we compared the occurrence of immunodominance following mice immunization with three different HCV epitopic-peptide formulations.

Methods: We synthesized four CD8+ epitopic-peptides (C_1,E_6,N,E_4) that were derived from HCV-antigens. A polytope-peptide ($C_1E_6NE_4$) spanning fusion of epitopes was designed based on immunoinformatics analyses for optimum proteasomal cleavage. BALB/c mice received three subcutaneous injections that contained 10 µg of peptide (minimal epitopes, or mixture of four epitopes or long-polytope) formulated with CpG (50 µg) and Montanide-ISA720 (70%) adjuvants in the tail-base at three-week intervals. Considering the H2-D^d (BALB/c)-restriction of C_1 and E_4-epitopes, three weeks after the last injection splenocytes from vaccinated animals were subjected to IFNγ/IL4 ELISpot assays in the presence of C_1 and E_4-peptides.

Results: All vaccinated animals promoted Th1-oriented responses as evidenced by detection of IFNγ-secreting cells and a low-level of IL4 secretion. Mice injected with minimal CTL-epitopes provoked stronger responses, however, due to the higher affinity of E_4-epitope for H2-D^d, frequency of E_4-specific cells was considerably higher than C_1-specific ones, showing some level of immunodominance. Interestingly, animals vaccinated with polytope-peptide developed high-quality balanced responses against both $C_1$and E_4-epitopes, however at a lower intensity.

Conclusion: These results supported the superiority of polytope-peptides over minimal epitopes, yet emphasized the key role of polytope design and optimization to avoid epitope dominancy.

Keywords: HCV, Epitope, Peptide Vaccine, Immunodominance, Polytope

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 14, No 4, Winter 2012, Pages: 63-73

مقاله اصیل

مقایسه ایمنی‌زایی اپی‌توپ‌های CD8 ویروس هپاتیت C به‌صورت تک اپی‌توپ، مخلوط اپی‌توپ‌ها و پپتید پلی‌توپ

فاطمه متولی[1]، آرش معمارنژادیان[2]، سیدمهدی سادات[3]، گلناز بهرامعلی[1]، فرزین روحوند[2]*

۱- کارشناس ارشد، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران
۳- دکتری تخصصی، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور ایران، گروه هپاتیت و ایدز
Email: rfarzin@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۰/۰۹/۲۳ پذیرش مقاله: ۹۰/۱۱/۲۴

چکیده

هدف: مطالعات حیوانی نشان می‌دهند که واکسیناسیون با پپتیدهای اپی‌توپی منجر به ایمنی حفاظتی می‌شود. با این وجود غلبه ایمنولوژیکی باید به‌عنوان یک چالش مهم در این زمینه مورد توجه قرارگیرد. با توجه به مزایای واکسن‌های اپی‌توپی علیه عفونت هپاتیت C، در این مطالعه بروز پدیده غلبه ایمنولوژیکی به‌دنبال ایمن‌سازی موش‌ها با سه ترکیب مختلف پپتیدهای اپی‌توپی ویروس هپاتیت C مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها: چهار پپتید اپی‌توپی وابسته به سلول‌های $CD8^+$ (C_1، E_6، N و E_4) برگرفته از آنتی‌ژن‌های ویروس هپاتیت C ساخته شد. پپتید چند اپی‌توپی ($C_1E_6NE_4$) حاصل از اتصال چهار اپی‌توپ نیز براساس مطالعات ایمونوانفورماتیک با هدف بهینه‌سازی برش پروتئازوم طراحی شد. موش‌های BALB/c سه تزریق زیرجلدی شامل ۱۰ میکروگرم پپتید (به‌صورت پپتید اپی‌توپی یا مخلوط اپی‌توپ‌ها یا پپتید پلی‌توپ) ترکیب شده با اجوانت‌های CpG (۵۰ میکروگرم) و MontanideISA720 (۷۰ درصد) را در قاعده دم با فاصله سه هفته دریافت کردند. با توجه به وابستگی دو اپی‌توپ C_1 و E_4 به $H2\text{-}D^d$ موشی، سه هفته پس از آخرین تزریق از سلول‌های طحال موش‌های واکسینه در حضور پپتیدهای C_1 و E_4 برای آزمون‌های IFNg/IL4 ELISpot استفاده شد.

نتایج: در کلیه حیوانات واکسینه پاسخ Th1 که با مشخصه ترشح بالای اینترفرون گاما و ترشح کم اینترلوکین ٤ شناخته می‌شود ایجاد شده بود. موش‌های ایمن شده با اپی‌توپ‌های تکی پاسخ قوی‌تری را نشان دادند، اما به‌علت گرایش بالاتر اپی‌توپ E_4 برای $H2\text{-}D^d$ پاسخ علیه آن قوی‌تر از پاسخ علیه اپی‌توپ C_1 بود که نمایانگر بروز درجاتی از غلبه ایمنولوژیکی است. نکته جالب توجه این‌که حیوانات واکسینه با پپتید پلی‌توپ اگر چه با شدت ضعیف‌تر اما پاسخ یکسانی را علیه هر دو اپی‌توپ C_1 و E_4 نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه برتری پپتید پلی‌توپ را بر اپی‌توپ‌های تکی نشان داد و بر نقش کلیدی طراحی بهینه واکسن‌های پلی‌توپ برای جلوگیری از وقوع غلبه اپی‌توپی تأکید نمود.

کلیدواژگان: ویروس هپاتیت C، اپی‌توپ، واکسن پپتیدی، غلبه ایمنولوژیکی، پلی‌توپ

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات: ۶۳-۷۳

مقدمه

امروزه عفونت ناشی از ویروس هپاتیت C (Hepatitis C Virus: HCV) یکی از مشکلات عمده در زمینه بهداشت و درمان در سطح جهانی است. طبق آخرین گزارش‌های سازمان

بهداشت جهانی (World Health Organization: WHO) بیش از ۱۳۰ میلیون نفر در سراسر جهان حامل ویروس HCV هستند که به دلیل عدم دسترسی به واکسن مناسب، سالانه حدود ۳ تا ٤ میلیون نفر به جمعیت این بیماران افزوده می‌شود [۱]. HCV تنها عضو از جنس هپاسی‌ویروس (Hepacivirus) و در خانواده فلاوی‌ویریده (Flaviviridae) و با ابعاد ۵۵ تا٦٥ نانومتر حاوی RNA تک رشته‌ای مثبت و دارای غشای ویروسی (Envelope) است [۲]. ژنوم HCV ۹٦۰۰ نوکلئوتید طول داشته و تنها دارای یک قالب قرائت باز (Open Reading Frame: ORF) است و پلی‌پروتئین پیش‌سازی را با ۳۰۱۰-۳۰۳۳ اسید آمینه می‌سازد که در حین ترجمه و پس از آن توسط پروتئازهای ویروس و سلول میزبان بریده شده و در نهایت حدود ۱۰ پروتئین جداگانه از آن حاصل می‌شود که به دو دسته پروتئین‌های ساختمانی S (Structural) شامل Core و گلیکوپروتئین‌های غشایی E1 و E2 و پروتئین‌های غیر ساختمانی NS (Non-structural) شامل پروتئین‌های NS2-NS5B تقسیم می‌شوند [۲].

به دلیل ناتوانی سیستم ایمنی میزبان، در ٦۰-۸۵ درصد از بیماران، عفونت HCV به‌صورت مزمن و ماندگار باقی مانده که در نهایت منجر به بیماری‌های سیروز کبدی، نارسایی کبدی و کارسینومای هپاتوسلولار (Hepatocellular Carcinoma) می‌شود [۲]. تنها راه درمان این بیماران دریافت اینترفرون آلفا (Interferon Alpha) همراه با ریباوارین (Ribavirin) است و متأسفانه این روش درمان طولانی مدت بوده و علاوه بر هزینه بالا عوارض جانبی از قبیل نوتروپنی (Neutropenia)، عوارض شبه آنفلوانزا، بیماری‌های عصبی و بیماری‌های خود ایمن (Autoimmune) را به دنبال خواهد داشت. بنابراین ساخت یک واکسن مؤثر در پیشگیری و کنترل این بیماری یک نیاز ضروری است [۳].

چالش‌های بزرگی برای ساخت و تولید واکسن HCV مطرح است که می‌توان جهش‌های پی در پی و تغییرات گسترده در ژنوم ویروس، حتی در بدن بیمار طی سال‌های عفونت، عدم پاسخ یا تضعیف پاسخ سیستم ایمنی میزبان توسط ویروس به‌منظور فرار از سیستم ایمنی و همچنین فقدان مدل حیوانی کوچک و مناسب را در این راستا ذکر کرد. مشخص شده که عفونت مزمن HCV به دلیل فقدان پاسخ مناسب سیستم ایمنی ایجاد می‌شود که یکی از دلایل آن مهار ایمنی توسط پروتئین‌های ویروس است [۳]. از جمله این مکانیسم‌های مهاری ویروس می‌توان به مهار تولید اینترفرون آلفا، مهار فعالیت سلول‌های NK (Natural Killer Cells)، مهار شدن پاسخ به TLR-3 (Toll-Like Receptor 3) یا RIG-1 (Retinoid-Inducible Gene 1) توسط پروتئین NS3/4A ویروس و همچنین کاهش اثر هپاتوسیت‌ها (Hepatocytes) نسبت به TNF-α (Tumor Necrosis Factor- Alpha) و به دنبال آن تضعیف پاسخ ایمنی ذاتی اشاره نمود [٤].

مطالعات روی شامپانزه ارتباط قوی بین ماندگاری ویروس در بدن فرد و گسترش جهش‌های پی در پی در اپی‌توپ‌های وابسته به T-Cell را نشان داده است [۵]. از طرفی تحریک فعالیت سلول‌های TR (Regulatory T Cell) توسط ویروس مهار فعالیت سلول‌های CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) را به دنبال خواهد داشت [٦]. به‌طور خلاصه حذف ویروس و بهبودی فرد وابسته به ثبات پاسخ سلول‌های CD4+ و CD8+ در مقابل اپی‌توپ‌های ساختمانی و غیر ساختمانی است. به این ترتیب به‌نظر می‌رسد ایجاد پاسخ سریع، قوی و چند جانبه لنفوسیت‌های CD4+ و CD8+ علیه اپی‌توپ‌های مهم و نامتغیر ویروس و افزایش توانایی این سلول‌ها در پاک‌سازی عفونت می‌تواند در تحقیقات واکسن مد نظر قرار گیرد [۵]. اخیراً استفاده از واکسن‌های اپی‌توپی (Epitope-based Vaccines) با به‌کارگیری اپی‌توپ‌های ایمنی‌زای منحصر به سلول‌های CD8+ و CD4+ و تحریک سیستم ایمنی علیه اپی‌توپ‌های مذکور به‌صورت همزمان و کاملاً اختصاصی از جمله روش‌هایی است که در این راستا مورد توجه قرار گرفته است. این استراتژی در دو شکل واکسن‌های DNA و واکسن‌های پپتیدی صنعتی تحت بررسی و مطالعه است. از مزایای مهم

استفاده از اپی‌توپ‌های پپتیدی ساختگی می‌توان به تولید آسان، ثبات آن‌ها و همچنین عاری بودن از هرگونه آلودگی ویروسی یا میکروبی اشاره کرد [۷]. مهم‌ترین مزیت این گروه از واکسن‌ها حذف نواحی ناخواسته‌ای است که سبب ایجاد پاسخ‌های ایمنی مضر می‌شوند [۸].

با وجود مزایای بالقوه واکسن‌های اپی‌توپی ابهاماتی در طراحی این واکسن‌ها وجود دارد که نیازمند مطالعه و بررسی بیشتر است. به‌عنوان مثال می‌بایست مشخص شود که آیا اثربخشی این نوع واکسن‌ها به شکل پپتیدهای اپی‌توپی مجزا بیشتر است یا در قالب توالی‌های پلی‌پپتیدی متشکل از اتصال اپی‌توپ‌ها. همچنین مواردی همچون ترتیب قرارگیری اپی‌توپ‌ها در یک توالی پلی‌پپتیدی، تأثیر وجود توالی‌های فاصله انداز و همچنین غلبه ایمنولوژیکی (Immunodominance) برخی از اپی‌توپ‌ها بر سایر اپی‌توپ‌ها از جمله ابهامات قابل بررسی است [۹-۱۱].

در مطالعه حاضر با هدف پاسخ‌گویی به برخی از ابهامات فوق، کیفیت پاسخ ایمنی نسبت به اپی‌توپ‌های وابسته به CD8+ برگرفته از آنتی‌ژن‌های Core، E2 و NS3 از HCV که براساس تجزیه و تحلیل‌های ایمنوانفورماتیک انتخاب شده‌اند بررسی شد و آثار ایمنی‌زایی آن‌ها را در قالب اپی‌توپ به تنهایی یا مخلوط چند پپتید اپی‌توپی یا یک پلی‌پپتید متشکل از چند اپی‌توپ در موش BALB/c مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب و ساخت اپی‌توپ‌ها

چهار اپی‌توپ از آنتی‌ژن‌های NS3، Core و E2 ویروس هپاتیت C براساس تشابه توالی آن‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف به‌ویژه ژنوتیپ‌های مقاوم به درمان (1a و 1b) و با توجه به ویژگی اتصال آن‌ها به HLA-A2.1 و $MHC\text{-}H2\text{-}D^d$ از بین توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی HCV (www.hcv.lanl.gov) انتخاب شد. ویژگی‌های هر اپی‌توپ در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ مشخصات کامل اپی‌توپ‌های انتخاب شده شامل نام قراردادی اپی‌توپ، توالی اسید آمینه‌ای، آنتی‌ژن مربوط از ویروس هپاتیت C، ناحیه انتخابی از آنتی‌ژن مذکور و نیز وابستگی اپی‌توپ به نوع MHC

نام اپی‌توپ	توالی اسید آمینه‌ای	متعلق به آنتی‌ژن	ناحیهٔ اسید آمینه‌ای	وابستگی به MHC
C1	DLMGYIPLVGA	Core	۱۳۲-۱٤۲	$A2/H\text{-}2^d$
E6	RLWHYPCTI	E2	٦۱٤-٦۲۲	A2
N	KLSGLGLNAV	NS3	۱٤۰٦-۱٤۱٥	A2
E4	SGPSQKIQLV	E2	٤۰٥-٤۱٤	$H\text{-}2^d$

توالی پلی‌توپ شامل اتصال پی در پی چهار اپی‌توپ انتخابی با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای ایمنوانفورماتیک SYFPEITHI (www.syfpeithi.de/scripts/MHCServer.dll/home.htm) MIF (http://immunax.dfci.harvard.edu/bioinformatics/Tools) و Bimas (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind) طوری طراحی شد که از تشکیل اپی‌توپ‌های بینابینی در فواصل اتصال جلوگیری شود. در نهایت توالی‌های کاندید با استفاده از نرم‌افزار PAProc (www.paproc.de) از نظر برش پروتئازوم بررسی شدند و بهترین توالی به‌صورت $C_1E_6NE_4$ بدون فاصله گذار و به‌صورت پشت سرهم برای ادامه کار انتخاب شد.

پپتیدهای اپی‌توپی C_1، E_6، E_4 و N به‌علاوه پپتید پلی‌توپ $C_1E_6NE_4$ به روش سنتز پپتید روی فاز جامد (fmoc) و درجه خلوص بیش از ۹۷ درصد توسط انستیتو بیوشیمی دانشگاه لوزان سوئیس ساخته شد.

ایمن‌سازی موش‌ها

موش‌های ماده BALB/c به سن ٦-٨ هفته در ٦ گروه ٦تایی تقسیم شده و براساس اصول نگهداری و کار با حیوان آزمایشگاهی (مصوبه کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران) نگهداری و مطالعه شدند. گروه‌های موشی طبق جدول ۲ با مخلوط همگنی از ایمنی‌زا شامل ۱۰ میکروگرم پپتید به‌علاوه ۵۰ میکروگرم از CpG1826 (Prim Labs., Italy) و ۷۰ درصد اجوانت روغنی Montanide ISA720 (Montanide ISA720 Oil Adjuvant) (Seppic, France) به‌صورت زیرجلدی ۳ بار، هر ۳ هفته یک تزریق در ناحیه قاعده دم ایمن شدند. در مورد گروه دریافت کننده مخلوط پپتیدی هریک از چهار پپتید به میزان ۱۰ میکروگرم تزریق شد. دو گروه دریافت کننده PBS به‌همراه مخلوط اجوانتی CpG+M720 و گروه دریافت کننده PBS تنها به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

جداسازی سلول‌های طحال

سه هفته پس از آخرین تزریق، طحال موش‌ها به‌صورت استریل خارج شده و به‌صورت جداگانه در همسان‌ساز (Homogenizer) خرد شد. بعد از حذف گلبول‌های قرمز با محلول ۰/۸٤ درصد NH_4Cl سلول‌ها در محیط کشت کامل RPMI 1640 (شامل ۱۰ درصد FBS، ۲ میلی‌مول ال-گلوتامین، ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین) شستشو داده شده و به حالت معلق در آمدند.

آزمون ELISpot

برای تعیین فرکانس سلول‌های ترشح کننده اینترفرون گاما و اینترلوکین ٤ درطحال موش‌های ایمن شده و کنترل آزمون سنجش ELISpot به‌وسیله کیت ELISpot تجاری موش (Diaclone, France) و طبق دستورالعمل راهنما برای هر موش به‌طور جداگانه انجام شد و همچنین به‌منظور کاهش خطای تکنیکی آزمایش برای هر موش به‌صورت سه‌گانه (Triplicate) انجام شد. در هر گروه انحراف معیار به‌دست آمده ناشی از پراکندگی داده‌ها در موش‌های آن گروه بود. پلیت‌های ۹٦ چاهک به‌طور جداگانه توسط آنتی بادی اولیه (مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک) پوشانده شده و به‌مدت یک شب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از تخلیه آنتی‌بادی و شستشوی کامل با بافر PBS پلیت به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل RPMI 1640 دارای ۱۰ درصد FBS مهار شد. پس از خارج کردن محیط سلول‌های طحال (۲×۱۰^{۵} سلول در هر چاهک) به پلیت‌ها اضافه شده و به‌مدت ٤۰ ساعت در حضور یا عدم حضور پپتیدهای آنتی‌ژنی (۱۰ ماکرومولار) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. پلیت‌ها ۳ بار به‌وسیله بافر مخصوص (PBS-0.1% Tween-20) شسته شده و بعد از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی ثانویه کونژوگه با بیوتین با غلظت ۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به هر خانه به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از ٤ بار شستشو و اضافه کردن ۱۰۰ ماکرولیتر آویدین کونژوگه با آنزیم آلکالین فسفاتاز پلیت برای ٤۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شستشو، نقاط رنگی مربوط به کلون‌های مترشحه اینترفرون گاما یا اینترلوکین ٤ به دنبال افزودن سوبسترای BCIP/NBT در کف چاهک‌ها مشخص شد.

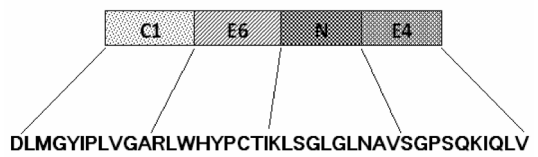
مطالعات آماری

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از آزمون ELISpot توسط نرم‌افزار Graphpad Prism 4 انجام شد. داده‌ها با آزمون غیرپارامتری من‌ویتنی (Mann-Whitney) با هم مقایسه و $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

هدف از مطالعه حاضر بررسی ایمنی‌زایی اپی‌توپ‌های انتخابی از نواحی آنتی‌ژنیک ویروس هپاتیت C و نیز مقایسه

ایمنی ایجاد شده در اثر تزریق ایمنی زا با سه فرمولاسیون مختلف (پپتید اپی‌توپی تنها، مخلوط چند پپتید اپی‌توپی و پپتید پلی‌اپی‌توپ یا پلی‌توپ) بود. بر این اساس چهار اپی‌توپ وابسته به سلول‌های T سیتوتوکسیک $CD8^+$ که در مطالعات قبلی گزارش شده بودند از سه ناحیه آنتی‌ژنیک Core، E2 و NS3 ویروس هپاتیت C انتخاب شدند. در این انتخاب به فاکتورهایی نظیر توانایی ایمنی زا بودن، توانایی اتصال به شایع‌ترین آلل HLA (Human Leukocyte Antigen) در جمعیت سفیدپوست (HLA-A2.1) و توانایی اتصال به MHC (Major Histocompatibility Complex) موش BALB/c ($H2-D^d$) توجه شد. همچنین توالی اسیدآمینه‌ای اپی‌توپ‌ها به گونه‌ای انتخاب شد که حتی‌المقدور دو ژنوتیپ 1a و 1b ویروس که به درمان مقاوم‌تر هستند را پوشش دهد. چهار پپتید متناظر با اپی‌توپ‌ها به‌صورت ساختگی ساخته شد. از بین آن‌ها دو پپتید C_1 و E_4 وابسته به $H2-D^d$ موش و دو پپتید E_6 و N وابسته به HLA-A2.1 انسانی بود. ضمناً توالی پپتید C_1 طوری انتخاب شد که براساس گزارش‌های قبلی و مطالعات ایمونوانفورماتیک با HLA-A2.1 نیز قابل عرضه باشد (جدول ۱). توالی پلی‌توپ ٤٠ اسید آمینه‌ای شامل اتصال پی در پی چهار اپی‌توپ مذکور نیز براساس بهترین حالت برش پروتئازوم و نیز کمترین احتمال پیدایش اپی‌توپ‌های بینابینی طراحی و به‌صورت ساختگی ساخته شد (شکل ۱).



شکل ۱ نمایش شماتیک ترادف و توالی اسید آمینه‌ای اپی‌توپ‌ها در توالی پلی‌توپ $C_1E_6NE_4$

در مرحله بعد گروه‌های موشی طبق برنامه ارایه شده در جدول ۲ با یکی از اپی‌توپ‌های موشی به تنهایی (C_1 یا E_4)، مخلوط چهار اپی‌توپ ($C_1+E_4+N+E_6$)، پپتید پلی‌توپ ($C_1E_6NE_4$) یا مخلوط کنترل (PBS و یا PBS مخلوط شده با اجوانت) ایمن شدند.

جدول ۲ گروه‌بندی موش‌های واکسینه بر مبنای ترکیب ایمونوژن تزریقی (شامل آنتی‌ژن و اجوانت)

گروه موشی	ایمنی‌زای تزریقی
PBS	PBS
اجوانت	PBS + M720/CpG
A	پپتید پلی‌توپ $C_1E_6NE_4$ و M720/CpG
B	مخلوط پپتیدهای اپی‌توپی $C_1+E_4+E_6+N$ و M720/CpG
C	پپتید اپی‌توپی C_1 و M720/CpG
D	پپتید اپی‌توپی E_4 و M720/CpG

با توجه به نتایج قبلی [۱۲] به‌منظور افزایش پاسخ ایمنی سلولی کلیه ایمنی‌زاها با مخلوط اجوانتی CpG+Montanide ISA720 تزریق شدند. سه هفته پس از آخرین تزریق، پاسخ سلولی ایجاد شده در موش‌های واکسینه با دو آزمون ELISpot اینترفرون گاما و اینترلوکین ٤ ارزیابی شد. همان‌طور که در جدول ۳ الف مشاهده می‌شود سلول‌های طحال کلیه گروه‌های موشی ایمن شده با پپتیدها قادر به ترشح اینترفرون گاما در برابر این پپتیدها بودند به‌طوری که فرکانس سلول‌های اختصاصی ترشح کننده (Spot Forming Cell: SFCs) در مقایسه با دو گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. به این ترتیب استراتژی واکسیناسیون (شامل پپتیدها، اجوانت‌های استفاده شده، نوع و دفعات تزریق) برای تحریک ایمنی سلولی مناسب بود. همان‌طورکه انتظار می‌رفت سلول‌های طحالی دو گروه موشی C و D که به‌ترتیب فقط با پپتید C_1 یا E_4 ایمن شده بودند، تنها قادر به ترشح اینترفرون گاما در مقابل پپتید مربوط بودند و نسبت به پپتید دیگر پاسخی ایجاد نکردند. نکته قابل توجه این بود که فرکانس سلول‌های اختصاصی علیه پپتید E_4 (در گروه D) به‌طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های اختصاصی علیه پپتید C_1 (در گروه C) بود که این امر احتمالاً به دلیل گرایش بیشتر پپتید E_4 برای اتصال به $H2-D^d$ بوده و تا حدودی قابل پیش‌بینی بود.

در گروه B که دریافت کننده مخلوط پپتیدها

(C_1+E_4+E_6+N) بود پاسخ سلولی بر علیه هر دو اپی‌توپ C_1 و E_4 ایجاد شده بود که میزان آن تقریباً شبیه به پاسخ‌های ایجاد شده در دو گروه دریافت کننده پپتیدهای تنها (C و D) بود. مقایسه پاسخ سلولی در این سه گروه نشان می‌دهد که نه تنها حضور پپتیدهای دیگر وابسته به HLA انسانی در مخلوط ایمونوژن تأثیر چشمگیری بر پاسخ علیه دو اپی‌توپ موشی نداشته است، بلکه خود دو اپی توپ موشی مورد بررسی نیز در حالت مخلوط بر پاسخ ایجاد شده علیه یکدیگر تأثیری نداشته‌اند. نکته دیگر حایز اهمیت این است که در گروه B نیز همانند دو گروه قبل فرکانس سلول‌های اختصاصی علیه پپتید E_4 به‌طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های اختصاصی علیه پپتید C_1 بود که نشان دهنده وقوع پدیده غلبه ایمنولوژیکی (Immunodominance) به علت گرایش بیشتر اپی‌توپ E_4 برای اتصال به $H2\text{-}D^d$ است.

در گروه A که توسط پپتید پلی‌توپ ٤٠ اسید آمینه‌ای ایمن شده بود نیز همانند گروه B پاسخ سلولی علیه هردو اپی‌توپ C_1 و E_4 ایجاد شده بود، با این تفاوت که برخلاف گروه‌های قبلی فرکانس سلول‌های اختصاصی اپی‌توپ E_4 کاهش یافته و در حد سلول‌های اختصاصی اپی‌توپ C_1 بود. این یافته نشان داد که با وجود پیش‌بینی‌های کامپیوتری انجام شده برای بهینه‌سازی نواحی برش پروتئازوم، احتمالاً اپی‌توپ E_4 به‌خوبی پردازش نشده و به این دلیل پاسخ اختصاصی علیه آن کاهش یافته و به حد اپی‌توپ C_1 رسیده است. نکته جالب این بود که به دلیل همین تأثیر پردازش پروتئازوم پاسخ ایجاد شده علیه هر دو اپی‌توپ C_1 و E_4 تقریباً شبیه بود و به این ترتیب غلبه ایمنولوژیکی مشاهده شده در گروه B در این گروه وجود نداشت.

به‌منظور تعیین نوع پاسخ سلولی (Th1/Th2) آزمون ELISPOT هم برای اینترفرون گاما (به‌عنوان شاخص فعال شدن پاسخ Th1) و هم برای اینترلوکین ٤ (به‌عنوان شاخص فعالیت سلول‌های Th2) انجام شد (جدول ٣ ب). مقایسه نتایج نشان داد که برخلاف اینترفرون گاما، تعداد سلول‌هایی که قادر به ترشح اینترلوکین ٤ در مقابل پپتیدهای اپی‌توپی بودند بسیار اندک بود. این یافته بیانگر آن است که ایمنی زاهای تزریقی و استراتژی به‌کار گرفته شده پاسخ ایمنی سلولی را با محوریت بازوی Th1 فعال نموده است که با توجه به اطلاعات موجود در واکسیناسیون علیه ویروس هپاتیت C از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

جدول ٣ نتایج آزمون ELISpot اینترفرون گاما (الف) و اینترلوکین ٤ (ب)؛ در هر گروه واکسینه پس از مواجهه سلول‌های طحال با پپتیدهای E_4 و C_1 میانگین تعداد نقاط شمارش شده برای موش‌های گروه ± خطای استاندارد نمایش داده شده است.

الف

گروه تزریقی	میانگین تعداد *SEM*+SFC	
	E4	C1
PBS	٢/٦ ± ١/٠٢	٣ ± ١/٥٢
اجوانت	٥ ± ١/١٥	٥ ± ١/٧٣
$C_1E_6NE_4$	٧٩ ± ٣/٢١	٧٢ ± ٦/٥٥
C_1+E_4+E_6+N	١٥٨/٦ ± ٦/٨٨	٧٠/٦ ± ٧/٢٦
C_1	٥/٣ ± ١/٧٦	٩١/٣ ± ٦/٨٨
E_4	١٦٦ ± ١٥/١٤	٧ ± ١/٥٢

ب

گروه تزریقی	میانگین تعداد SEM+SFC	
	E4	C1
PBS	٢/٦ ± ١/٢	٣ ± ١/٥٢
اجوانت	٥ ± ١/١٥	٥ ± ١/٧٣
$C_1E_6NE_4$	١٢/٦ ± ٢/٤	١٦/٦ ± ٢/٨٤
C_1+E_4+E_6+N	٥/٣ ± ٢/٠٢	٣ ± ١/٥٢
C_1	٥/٣ ± ١/٧٦	٤ ± ١/٧٣
E_4	٤ ± ٠/٥٧	٣/٦ ± ٢/١٨

SFC: Spot-forming cells
SEM: Standard error of mean

بحث

امروزه سهولت ساخت پپتیدهای صنعتی و نیز توانایی مهندسی آن‌ها این گونه واکسن‌ها را به کاندیدهای مناسبی برای واکسیناسیون تبدیل کرده است. استفاده از واکسن‌های اپی‌توپی براساس سنتز پپتید یکی از استراتژی‌های نوین در تحقیقات واکسن است که تمرکز پاسخ ایمنی بر اپی‌توپ‌های مهم و ارزشمند را موجب می‌شود. استفاده از پپتیدهای اپی‌توپی برای

واکسیناسیون علیه ارگانیسم‌های مختلفی همچون HIV (Human Immunodeficiency Virus)، HBV (Hepatitis B Virus)، مالاریا و مدل‌های مختلف سرطان مد نظر بوده است [۱۳]. این روش با وجود پتانسیل‌های زیاد همچنان با محدودیت‌هایی مواجه است که طراحی مطلوب را می‌طلبد. از جمله این محدودیت‌ها رقابت اپی‌توپ‌ها و بروز پدیده غلبه ایمنولوژیکی است که منجر به ایجاد پاسخ ایمنی تنها علیه تعدادی از اپی‌توپ‌های به‌کارگرفته شده در واکسن می‌شود [۱٤]. به‌عبارت دیگر ایمنی‌زایی قوی برخی از اپی‌توپ‌ها پاسخ را به‌خود معطوف داشته و اثر بقیه اپی‌توپ‌ها را می‌پوشاند. با توجه به ماهیت این نوع واکسن‌ها طراحی ایده‌آل می‌بایست به‌گونه‌ای باشد که سیستم ایمنی علیه کلیه اپی‌توپ‌های به‌کار گرفته شده به‌خوبی تحریک شود.

در مورد برخی بیماری‌های عفونی ویروسی و به‌طور مشخص هپاتیت C مقایسه پاسخ ایمنی در عفونت‌های خودبه‌خود محدود شونده و نیز موارد مزمن بیماری نشان داده است که تحریک همزمان سلول‌های T سیتوتوکسیک علیه چندین اپی‌توپ مهم برای پاک‌سازی عفونت ضروری است [۱۵]. با توجه به این‌که در عفونت هپاتیت C به‌کارگیری آنتی‌ژن‌های کامل ویروس می‌تواند با آثار نامطلوب سرکوب سیستم ایمنی همراه باشد واکسن‌های اپی‌توپی گزینه مناسبی در این مورد است به شرط آن‌که طراحی و استراتژی واکسیناسیون به‌گونه‌ای باشد که سیستم ایمنی علیه کلیه اپی‌توپ‌های گنجانده شده در واکسن به‌خوبی تحریک شده و از بروز غلبه ایمنولوژیکی بین اپی‌توپ‌ها که رقابت بین سلول‌های CTL (Cytotoxic T Lymphocytes) و محدودیت دامنه پاسخ را به‌دنبال دارد، جلوگیری شود [۱٦].

بر این اساس مطالعه حاضر با هدف بررسی مقایسه‌ای فرمولاسیون‌های مختلف پپتیدهای اپی‌توپی از نظر پاسخ ایجاد شده علیه تک تک اپی‌توپ‌ها طراحی شد. پپتیدهای اپی‌توپی از آنتی‌ژن‌های مختلف ویروس انتخاب شده و ایمنی‌زایی آن‌ها به‌صورت مخلوط اپی‌توپی، توالی پلی‌توپی طولانی و اپی‌توپ‌های تکی در موش بررسی شد. به‌منظور امکان استفاده اپی‌توپ‌ها در مطالعات آتی بر موش‌های تراریخته با HLA انسانی، سه اپی‌توپ C_1، E_6 و N از بین اپی‌توپ‌های قابل عرضه با HLA-A2.1 انتخاب شدند و این مطالعه صرفاً بر ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی علیه اپی‌توپ موشی E_4 و C_1 (که با MHC موشی نیز قابل عرضه است) متمرکز شد. نتایج این مطالعه تفاوت معنی‌داری را در پاسخ ایجاد شده علیه اپی‌توپ‌های تکی، مخلوط چند اپی‌توپی یا پپتید پلی‌توپ طولانی نشان داد، به‌طوری که پاسخ ایمنی ایجاد شده علیه اپی‌توپ E_4 در گروه واکسینه شده با پپتید پلی‌توپ در مقایسه با دو گروه دیگر تقریباً به نصف کاهش یافته بود و با توجه به این‌که اپی‌توپ‌های انتخابی در این مطالعه به اندازه ۹-۱۱ اسیدآمینه بودند و نیز وجود گزارش های قبلی مبنی بر وابستگی آن‌ها به پاسخ سلول‌های $CD8^+$ پیش‌بینی می‌شود که نتایج ترشح اینترفرون گاما و اینترلوکین ٤ مشاهده شده مربوط به سلول‌های $TCD8^+$ باشد. این در حالی است که بیجکر (Bijker) و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که پپتیدهای طولانی در مقایسه با اپی‌توپ‌های تکی توانایی بیشتری برای تحریک سیستم ایمنی دارد [۱۷]. در مطالعه مذکور پپتید اپی‌توپی وابسته به MHC-I به تنهایی، به همراهی پپتید وابسته به MHC-II و به‌صورت توالی پپتیدی طولانی به موش تزریق شده و پاسخ سلول‌های CD8 سنجیده شد. نتایج نشان داد که در حالت همراهی پپتید وابسته به MHC-II و نیز استفاده از پپتید طویل، پاسخ سلولی قوی‌تر و کاراتر از زمانی است که موش‌ها فقط با پپتید اپی‌توپی وابسته به MHC-I ایمن شوند. علت اختلاف نتایج مطالعه بیجکر با مطالعه حاضر می‌تواند مربوط به ادجوانت مورد استفاده در این دو مطالعه باشد. در گزارش بیجکر تنها از اجوانت روغنی ناقص فروند (Incomplete Freund's Adjuvant) استفاده شده بود که نقش ذخیره و آزادسازی آرام آنتی‌ژن را به عهده داشته و هیچ‌گونه نقشی در تحریک سیگنال‌های خطر ندارد [۱۷]، اما در تحقیق حاضر از مخلوط CpG و Montanide ISA720

استفاده شد که علاوه بر ذخیره آنتی‌ژن، تحریک سیگنال‌های خطر به‌واسطه گیرنده TLR9 موجب درگیری سلول‌های T کمکی (Th) و عرضه بهتر آنتی‌ژن توسط سلول‌های APC (Antigen-Presenting Cell) نیز می‌شود [۱۲، ۱۸]. علت دیگر ذکر شده برای ایمنی‌زایی بیشتر پپتیدهای طولانی پلی‌توپ در مقایسه با پپتیدهای تک اپی‌توپی نیمه عمر بیشتر پپتیدهای بزرگ‌تر و امکان به‌هم پیوستن و توده‌ای شدن آن‌ها است [۱٤، ۱۹] که باز هم می‌تواند تحت تأثیر اجوانت مورد استفاده، محل و نحوه تزریق متغیر باشد.

مطالعات قبلی به وضوح نشان داده‌اند که طبیعت ایمنی زا (شامل طول پپتید و محتوای اپی‌توپی) و همچنین نوع اجوانت مورد استفاده به شدت بر نوع و میزان پاسخ ایمنی القا شده مؤثر خواهد بود [۱۳]. بر این اساس نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حداقل در مورد اپی‌توپ‌های انتخاب شده C و E_4 از HCV (Hepatitis C Virus) و شرایط ایمنی‌زایی به‌کار گرفته شده در این تحقیق شدت پاسخ سلولی علیه پپتیدهای پلی‌توپ اندکی کمتر از پپتیدهای تک اپی‌توپی بود. در عین حال نکته جالب توجهی که توسط نتایج مطالعه حاضر مورد تأکید قرار می‌گیرد این است که در صورت استفاده از پپتیدهای پلی‌توپ طویل و طراحی مناسب این امکان وجود خواهد داشت که از غلبه ایمنولوژیکی و تورش (Bias) پاسخ ایمنی به سمت برخی از اپی‌توپ‌ها جلوگیری شود. به‌عبارت بهتر، از آن‌جا که برش پروتئازوم و رهاسازی اپی‌توپ نیز در ایجاد پاسخ نقش دارد، در صورتی‌که اپی‌توپ‌های مورد استفاده در واکسن از نظر ایمنی‌زایی (گرایش اتصال به MHC و حضور سلول‌های T اختصاصی آن‌ها در مخزن سلول‌های T حیوان) متفاوت باشند، می‌توان پپتید طویل پلی‌توپ را به‌گونه‌ای طراحی نمود که نقش برش پروتئازوم بتواند این اختلاف ایمنی‌زایی را جبران کرده و در نهایت پاسخ ایمنی علیه همه اپی‌توپ‌ها به‌صورت تقریباً یکسان ایجاد شود.

بنابراین با وجود اینکه کمیت پاسخ ایمنی سلولی علیه پپتیدهای پلی‌توپ ضعیف‌تر از پپتیدهای تکی بوده است، اما کیفیت این پاسخ‌ها بهتر بوده است به‌طوری که از غلبه ایمنولوژیکی جلوگیری شده است. به‌طور خلاصه نتایج حاصل از این تحقیق بر مزایای استفاده از پپتیدهای پلی‌توپ به‌عنوان کاندیدهای واکسن دلالت دارد و نشان داد که مهم‌ترین چالش این گونه واکسن‌ها یا همان پدیده غلبه ایمنولوژیکی با طراحی مناسب و بهینه‌سازی محل قرارگیری اپی‌توپ‌ها قابل پیشگیری است. ادامه این مطالعه برای بررسی ایمنی‌زایی اپی‌توپ‌های وابسته به HLA-A2.1 و نیز بررسی بروز پدیده ایمنی‌زایی روی موش‌های تراریخته دارای HLA-A2.1 در حال طراحی است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل از بخشی از نتایج پروژه تحقیقاتی مصوب انستیتو پاستور ایران (طرح ۳۹۱) است.

منابع

[1] Lang K, Weiner DB. Immunotherapy for HCV infection: next steps. Expert Rev Vaccines 2008; 7(7): 915-23.

[2] Roohvand F, Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, Part one: Advances in basic knowledge for hepatitis C virus vaccine design. Expert Opin Ther Pat 2011; 21(12): 1811-30.

[3] Hepatitis C. World Health Organization. Fact sheet N 164 June 2011. Available from: http://www.who.int/mediacentre/ factsheets/fs164/en/index.html [Last accessed in 22 July 2011]

[4] Yu CI, Chiang BL. A new insight into hepatitis C vaccine development. J Biomed Biotechnol 2010; 2010:548280.

[5] Mikkelsen M, Bukh J. Current status of a hepatitis C vaccine: encouraging results but

significant challenges ahead. Curr Infect Dis Rep 2007; 9(2): 94-101. Curr Infect Dis Rep 2007; 9(2): 94-101.

[6] Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. Clin Immunol 2008; 128(2): 133-47.

[7] van der Burg SH, Bijker MS, Welters MJ, Offringa R, Melief CJ. Improved peptide vaccine strategies, creating synthetic artificial infections to maximize immune efficacy. Adv Drug Deliv Rev 2006; 58(8): 916-30.

[8] Sachdeva R, Banerjea AC, Malla N, Dubey ML. Immunogenicity and efficacy of single antigen Gp63, polytope and polytopeHSP70 DNA vaccines against visceral Leishmaniasis in experimental mouse model. PLoS One 2009; 4(12): e7880.

[9] Bergmann CC, Yao Q, Ho CK, Buckwold SL. Flanking residues alter antigenicity and immunogenicity of multi-unit CTL epitopes. J Immunol 1996; 157(8): 3242-9.

[10] Le TT, Drane D, Malliaros J, Cox JC, Rothel L, Pearse M, Woodberry T, Gardner J, Suhrbier A. Cytotoxic T cell polyepitope vaccines delivered by ISCOMs. Vaccine 2001; 19(32): 4669-75.

[11] Suhrbier A. Polytope vaccines for the codelivery of multiple CD8 T-cell epitopes. Expert Rev Vaccines 2002; 1(2): 207-13.

[12] Qiu Q, Wang RY, Jiao X, Jin B, Sugauchi F, Grandinetti T, Alter HJ, Shih JW. Induction of multispecific Th-1 type immune response against HCV in mice by protein immunization using CpG and Montanide ISA 720 as adjuvants. Vaccine 2008; 26(43): 5527-34.

[13] Fournillier A, Dupeyrot P, Martin P, Parroche P, Pajot A, Chatel L, Fatmi A, Gerossier E, Bain C, Lone YC, Trépo C, Inchauspé G. Primary and memory T cell responses induced by hepatitis C virus multiepitope long peptides. Vaccine 2006; 24(16): 3153-64.

[14] Yewdell JW. Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. Immunity 2006; 25(4): 533-43.

[15] Vajdy M, Selby M, Medina-Selby A, Coit D, Hall J, Tandeske L, Chien D, Hu C, Rosa D, Singh M, Kazzaz J, Nguyen S, Coates S, Ng P, Abrignani S, Lin YL, Houghton M, O'Hagan DT. Hepatitis C virus polyprotein vaccine formulations capable of inducing broad antibody and cellular immune responses. J Gen Virol 2006; 87(Pt 8): 2253-62.

[16] Sette A, Fikes J. Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. Curr Opin Immunol 2003; 15(4): 461-70.

[17] Bijker MS, van den Eeden SJ, Franken KL, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH. CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity. J Immunol 2007; 179(8): 5033-40.

[18] Memarnejadian A, Roohvand F. Fusion of HBsAg and prime/boosting augment Th1 and CTL responses to HCV polytope DNA vaccine. Cell Immunol 2010; 261(2): 93-8.

[19] Alexander J, Oseroff C, Dahlberg C, Qin M, Ishioka G, Beebe M, Fikes J, Newman M, Chesnut RW, Morton PA, Fok K, Appella E, Sette A. A decaepitope polypeptide primes for

multiple CD8+ IFN-gamma and Th lymphocyte responses: evaluation of multiepitope poly-peptides as a mode for vaccine delivery. J Immunol 2002; 168(12): 6189-98.