

طراحی و ساخت BCG نو ترکیب ترشح کننده پلی توپ های ویروس هپاتیت C به عنوان کاندیدای واکسن

سید عطاله سادات شاندریز^۱، مریم یزدانیان^۲، محمد رضا آقاصادقی^۲، حسین خان احمد^۴، آرش
معمارنژادیان^۲، فاطمه متولی^۳، طیبه سهرابی^۴، فرزین روحوند^{۲*}

۱) گروه زیست شناسی، موسسه آموزش عالی خاتم تهران

۲) گروه هپاتیت وایدز، انستیتو پاستور ایران

۳) بانک ژن نو ترکیب ایران، انستیتو پاستور ایران

۴) بخش تحقیقات BCG، مجتمع تولیدی-تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران

آدرس نویسنده رابط: گروه هپاتیت وایدز، بانک ژن نو ترکیب ایران، انستیتو پاستور ایران

تلفن: ۰۲۱-۶۶۹۶۹۲۹۱ -rfarzin@pasteur.ac.ir

چکیده:

زمینه و اهداف: بیماری کبدی مرتبط با عفونت مزمن ویروس هپاتیت C (HCV)، از مشکلات عمده بهداشت جهانی است. ولی هنوز واکسن تایید شده علیه HCV وجود ندارد. مشخص شده است که پاسخ های ایمنی سلولی، به خصوص پاسخ های CTL نقش ویژه ای در درمان عفونت با این ویروس دارند. نظر به اینکه واکسن BCG توانایی تحریک پاسخ ایمنی سلولی را بخوبی دارد، لذا در تحقیق حاضر تلاش بر این بود که با ساخت کاندیدای واکسن BCG نو ترکیب (recombinant BCG=rBCG) ترشح کننده اپی توپ های ایمنو دامیننت HCV پاسخ ایمنی مناسب علیه آنها ایجاد شود.

روش بررسی: قطعات ژنی HBsAg و پنج اپی توپ غالب شامل E2₆₁₄₋₆₂₂، E2₄₀₅₋₄₁₄، core₁₃₂₋₁₄₂، NS3₁₄₀₆₋₁₄₁₅ و SOEing PCR به قطعه ژنی حاوی پروموتور Hsp60 و α antigen signal sequence از طریق SOEing PCR متصل، و تکثیر شدند. سپس قطعات ساخته شده شامل ترادف HSP- α S-HPOL در شاتل وکتور pVN2 کلون شد. پلاسمید نهایی (pHSP- α S-HPOL) با روش الکتروپوریشن وارد BCG گردید. BCG نو ترکیب در محیط کشت لونشتاین جانسون حاوی کانامایسین انکوبه شد.

یافته ها: سازه نهایی از طریق هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شد. پس از گذشت ۴ هفته، کلنی های نخودی رنگ و مقاوم به کانامایسین BCG نو ترکیب در سطح محیط کشت لونشتاین جانسون نمایان شدند. تایید پلاسمید در BCG نو ترکیب حاصل حاکی از موفقیت آمیز بودن الکتروپوریشن بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که امکان ساخت rBCG مورد نظر پس از ساخت پلاسمید نهایی pHSP- α S-HPOL و ترانسفکت آن به BCG وجود دارد. کلنی های rBCG از نظر امکان ترشح پروتئین نو ترکیب مورد نظر قابل بررسی می باشند.

کلیدواژه ها: هپاتیت C، الکتروپوریشن، BCG نو ترکیب

مقدمه:

ویروس، واکسن‌های DNA بیان کننده پروتئین‌های ساختاری و غیر ساختاری علیه ویروس، در مراحل آزمایش‌های بالینی بروی انسان و شامپانزه قرار دارند (۷-۹). در این میان واکسن‌های چند اپی توپی (Multi-epitope or polytope or epitope based) با متمرکز نمودن پاسخ ایمنی بر اپی توپ‌های محافظت شده و یا مهم ویروس (۱۰ و ۱۱) پتانسیل خوبی جهت تحریک سیستم ایمنی علیه چندین اپی توپ منحصر به سلول‌های CD8+ و یا CD4+ به-طور همزمان و کاملاً اختصاصی را دارا هستند (۱۲ و ۱۳). همچنین امروزه به منظور تحریک کارایی سیستم ایمنی و ماندگاری پاسخ، استفاده از ارگانسیم‌های زنده به عنوان وکتورهای واکسن رایج شده است. در این میان باسیل کالمت-گرین (Bacillus BCG) Calmette-Guerin، که از واکسن‌های پر مصرف و رایج موجود برای پیشگیری از بیماری سل در سراسر دنیا به شمار می رود از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (۱۴). طی دو دهه گذشته توسعه سیستم‌های ژنتیکی مایکوباکتریوم‌ها شامل وکتورهای شاتل مختلف، سیستم‌های بیان و ترشح آنتی ژن‌های بیگانه و راهکارهای (استراتژی‌های) ترانسفورماسیون BCG سرآغازی برای استفاده از BCG به عنوان واکسن نو ترکیب در بیان آنتی ژن‌های خارجی است (۱۵ و ۱۶). اخیراً از BCG جهت بیان پروتئین‌های باکتریائی، انگلی و ویروسی استفاده شده است (۱۷). در بین آنتی ژن‌های مختلف HCV که تاکنون به عنوان واکسن استفاده شده‌اند؛ پروتئین core به علت حفاظت شدگی آن در بین ژنوتیپ‌های مختلف ویروس و دخالت در بیماری زایی (۱۸)، پروتئین E2 به علت شرکت در اتصال به گیرنده موجود بر سطح سلول‌های کبدی (۱۹) و پروتئین NS3 به دلیل ارتباط پاسخ ایمنی ایجاد شده با پاکسازی ویروس در طول عفونت حاد (۲۰) مورد توجه بوده‌اند. همچنین بر روی بیان آنتی ژن‌های core، E2، NS3، NS4، و NS5A ویروس به صورت اپی توپ و یا آنتی ژن کامل، به-

عفونت ویروس هپاتیت C (HCV) یکی از مشکلات عمده بهداشتی جهان به شمار می آید. این ویروس در سال ۱۹۸۹ شناخته شد. در حال حاضر قریب به ۲۰۰-۱۷۰ میلیون نفر در دنیا به آن آلوده‌اند (حدود ۳ درصد جمعیت جهان) (۱). برای HCV تاکنون هیچ واکسن تایید شده‌ای تهیه نشده است. در حال حاضر از ترکیب دارویی آلفا اینترفرون پگیله (PEG-IFN α) و ریباویرین برای درمان عفونت مزمن HCV استفاده می شود. این درمان تنها در نیمی از موارد موفقیت آمیز است. در موارد موفق نیز به دلیل مشکلاتی از قبیل گران بودن دارو، نیاز به درمان طولانی مدت و اثرات جانبی، دوره درمان عملاً کامل نمی شود (۲). عفونت با ویروس هپاتیت C یکی از دلایل اصلی ابتلا به هپاتیت مزمن، سیروز کبدی و نیز کارسینوم هپاتوسلولار است (۳).

بیشتر مبتلایان به عفونت حاد فاقد علائم بالینی‌اند. علاوه بر این، سیستم ایمنی بزرگسالان در ۸۰-۵۰ درصد موارد قادر به حذف ویروس نیست و بیماری به شکل مزمن تبدیل می شود (۴). مطالعات مختلف نشان می دهد لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک (T-CTL Cytotoxic Lymphocytes) نقش مهمی را در دفاع علیه حذف ویروس، از طریق کشتن مستقیم سلول‌های آلوده و پاکسازی عفونت در بدو شروع، ایفا می کنند (۵). یکی از مهمترین دلایل پایداری ویروس مربوط به تنوع ژنتیکی آن است. دلیل آن فقدان عملکرد تصحیح کنندگی آنزیم پلی مرز ویروسی است که منجر به پیدایش تنوع فراوان در توالی ژنوم ویروس در طول دوره اولیه عفونت می شود. توانایی بالای HCV در موتاسیون و تغییر سریع در اپی توپ‌های آنتی ژنیک آن، می تواند دلیلی بر عدم پیشرفت پاسخ‌های ایمنی کارا علیه ویروس و فرار آن از سیستم ایمنی گردد (۶). با این وجود در حال حاضر واکسن‌های متفاوتی از جمله؛ واکسن‌های وکتوری، واکسن‌های پروتئینی نو ترکیب، پروتئین‌های ساب یونیت، ذرات شبه

موشی (H-2d) و C39 (متعلق به ناحیه ۴۸-۳۹ پروتئین core) نیز به منظور فراهم نمودن امکان بررسی ایمنی ایجاد شده در موش BALB/c مورد استفاده قرار گرفتند (۲۹). بنابراین توالی پلی توپ متشکل از چهار اپی توپ Core132-E614-NS1406-E405 (CE6NE4) که براساس آنالیزهای ایمونوفورماتیک و پتانسیل استفاده در واکسن قبلا ساخته شده بودند (۲۴) انتخاب و اپی توپ ایمنودامیننت ۴۸-۳۹ Core که وابسته به CTL و قابل عرضه توسط MHC کلاس یک موشی می باشد (۲۳) برای ایجاد امکان بررسی بهتر ایمنی زائی در موش BALB/c به انتهای کربوکسیل این پلی-توپ افزوده شد. سپس با در نظر گرفتن فراوانی کدون های انسانی توالی اسید آمینه ای پلی توپ به توالی نوکلئوتیدی متناظر ترجمه معکوس شد.

سویه های باکتری، وکتورها و پرایمرها: سویه های باکتری استفاده شده در این مطالعه *E. coli* TOP10F¹ و *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173-P2 (دریافت شده از بخش BCG وبانک ژن نو ترکیب انستیتو پاستور ایران) بودند. وکتورهای مورد استفاده pcHPOL1 (دارای ژن HBsAg) (۴۱)، pUC18 ، pVN2 (تهیه شده از Fermentas) و pTZ57R/T (انستیتو پاستور پاریس) بودند. جدول ۱ پرایمر های مورد استفاده را نشان می دهد که با استفاده از نرم افزار Gene Runner و توالی ژن های مورد نظر در NCBI طراحی شد و برای تکثیر توالی پروموتور *hsp60* سیگنال ترشحی آلفا آنتی ژن (α S) و توالی پلی توپ از سازه سنتزی ساخته شده توسط شرکت Gene Cust فرانسه) مورد استفاده قرار گرفتند.

کلونینگ و ساخت پلاسمید: توالی نوکلئوتیدی پلی توپ حاوی ۵ اپی توپ به طول ۱۵۰ جفت باز و توالی *hsp60*- α S به طول حدود ۵۰۰ جفت باز که شامل ناحیه پروموتور *hsp60* و سیگنال ترشحی آلفا آنتی ژن مایکوباکتریوم بودند به صورت سنتتیک ساخته شد. اتصال ژن سازنده HBsAg به انتهای ۵ توالی پلی توپ با روش SOEing PCR و به دنبال تکثیر هر دو قطعه پلی توپ و HBsAg به منظور ایجاد ناحیه مشترک (Overlap) بین آنها صورت گرفت. برای این منظور جفت پرایمر PF HBsAg و PR HBsAg (جدول ۱) جهت تکثیر

منظور تحریک کارایی سیستم ایمنی، بررسی هایی در BCG انجام شده است (21,22). در مطالعه حاضر سعی شد BCG نو ترکیبی با توانائی ترشح پروتئین چند اپی توپی، متشکل از اپی توپ های انتخابی از آنتی-ژن های مذکور ساخته شود. برای این منظور شاتل وکتور مایکوباکتریال بیانی-ترشحی که پروتئین چند اپی توپی متصل به آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت بی (HBsAg) را تحت تاثیر پروموتور heat shock protein (hsp)60، به محیط ترشح می کند، ساخته شد و با روش الکتروپوریشن به BCG ارائه گردید تا بتواند توانایی تحریک پاسخ های ایمنی علیه اپی توپ-های HCV را داشته باشد.

مواد و روش ها:

انتخاب اپی توپ ها: با توجه به گزارش های قبلی در بانک اطلاعاتی HCV (HCV immunology) <http://HCVimmunology.com> (database) و نیز بررسی های مبتنی بر برنامه های ایمونوفورماتیک، توالی پلی توپ مرکب از پنج اپی توپ ایمنودامیننت برگرفته از آنتی ژن های core، E2 و NS3 ویروس هپاتیت C طراحی شدند (۲۳ و ۲۴). با توجه به اهمیت پاسخ های CTL (T cytotoxic) در پاکسازی HCV، اپی توپ های مذکور همگی جزء اپی توپ های وابسته به CTL هستند. همچنین برای جلوگیری از پدید آمدن غلبه ایمونولوژیکی حتی المقدور سعی شده که این اپی توپ ها دارای تمایل یکسان برای MHC موشی (H2d) و انسانی (HLA-A2) باشند. همچنین با استفاده از الگوریتم پیش بینی اتصال پپتید به HLA و نیز پردازش پروتئازوم (<http://paproc.de>) سعی شد که در حد فاصل بین اپی توپ های مجاور تا آنجا که ممکن است اپی-توپ اضافی (Junctional) ایجاد نشود. به این ترتیب سه اپی توپ انسانی انتخاب شده از نواحی E2، NS3 و core در کنار دو اپی توپ موشی core و E2 قرار گرفتند. اپی-توپ های انسانی عبارت بودند از: C132 (متعلق به ناحیه ۱۴۰-۱۳۲ پروتئین core) (۲۶، ۲۵)، E614 (متعلق به ناحیه ۶۲۲-۶۱۴ پروتئین E2) (۱۸ و ۲۰) و N1406 (متعلق به ناحیه ۱۴۱۵-۱۴۰۶ پروتئین NS3) (۲۷ و ۲۸). اپی توپ غالب موشی E405 (متعلق به ناحیه ۴۱۴-۴۰۵ پروتئین E2 و محدود به سیستم MHC

سایت برش *HindIII* و *NdeI* در پلاسمید pUC18 کلون شد. قطعه ژنی پروموتور hsp60- α S نیز با استفاده از جفت پرایمرهای PF hsp60-ss و PR hsp60-ss (جدول ۱) از روی الگوی سنتتیک تکثیر شد و به ترتیب در وکتور pTZ57R/T کلون و سپس در جایگاه‌های آنزیمی *HindIII* و *SalI* وکتور pUC18 ساب کلون شدند.

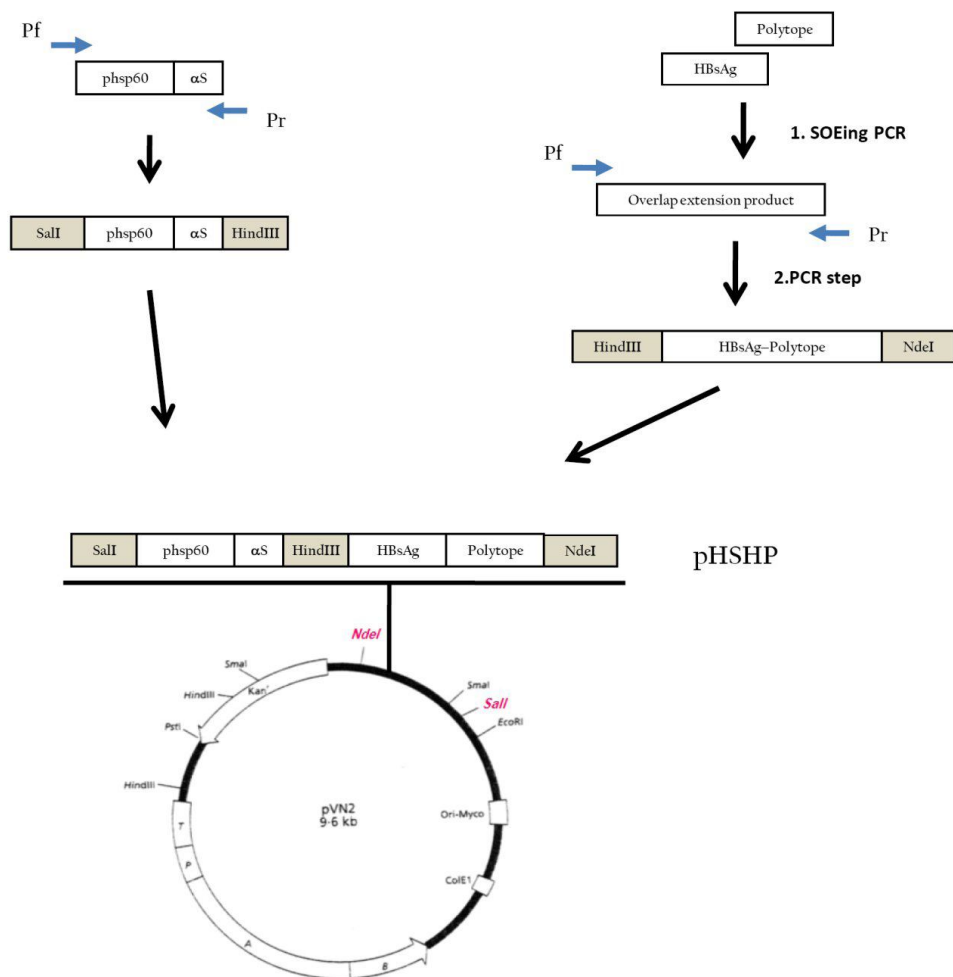
HBsAg-S از روی پلاسمید الگوی pcHPOL1 (۲۳) و جفت پرایمر PR Poly, PF Poly (جدول ۱) جهت تکثیر قطعه پلی توپ ساخته شده استفاده شدند. محصول این دو واکنش با آنزیم *pfu DNA polymerase* (Fermentase)، dNTP و اعمال یک سیکل حرارتی ۹۴، ۵۸ و ۷۲ درجه سانتی گراد به تعداد ۳۰ سیکل به یکدیگر متصل شد و قطعه HBsAg-Polytope در

جدول ۱: فهرست توالی پرایمرهای استفاده شده

کاربرد	توالی در جهت ۵' به ۳'	آغازگر
تکثیر قطعه ژنی HBsAg از روی پلاسمید pcHPOL1	TTAAAGCTTGAGAACATCACATCAGGATTCC <i>HindIII</i>	PF HBsAg
	ATCAGGTCAATGTATACCCAAAGACAGAAG	PR HBsAg
تکثیر قطعه Phsp60-ss از روی سازه سنتزی	AATGTCGACAATGGTGACCACAACGACG <i>SalI</i>	PF hsp60-ss
	AATAAGCTTCGCGCCCCGCGTTGCC <i>HindIII</i>	PR hsp60-ss
تکثیر قطعه ژنی پنج ای پی توپی از روی سازه سنتزی	TCTTCTGTCTTTGGGTATACATTGACCTG	PF Polytop
	ATTACATATGTTTAGGCCCGCACGC <i>NdeI</i>	PR Polytop

و *SalI* شاتل وکتور pVN2 منجر به ساخت پلاسمید pHSHP شد (شکل ۱).

جداسازی سازه ژنی HSP- α S- HBsAg-PoLytope از وکتور pUC18 و کلونینگ آن در جایگاه‌های آنزیمی *NdeI*



شکل ۱: نمایش شماتیک از مراحل ساخت شاتل پلاسمید pHSHp کدکننده پلی توپ‌های CTL متصل به ژن HBsAg. مراحل تکثیر و اتصال قطعات ژنی مربوط به *HBsAg* و *polytope* با روش SOEing PCR. تکثیر دو قطعه فوق به منظور ایجاد ناحیه مشترک بین آنها با توجه به توالی پرایمرهای مربوطه صورت گرفت. سپس با اعمال سیکل حرارتی نواحی همپوشان همانند سازی شدند. مرحله PCR قطعه حاصل تکثیر شد و توالی برش آنزیم در دو سر آن اضافه شد. قطعات ژنی *phsp60- αS* نیز به وسیله پرایمرهای مربوطه تکثیر شد و توالی‌های لازم برای برش آنزیمی بروی آن ایجاد شد. در نهایت توالی پلی توپ به صورت متصل به ژن HBsAg و آلفا آنتی ژن تحت کنترل پروموتور *hsp60* در جایگاه‌های آنزیمی *Sali* و *NdeI* شاتل وکتور اشریشیاکلی-مایکوباکتریوم pVN2 کلون شد. این وکتور دارای ژن مقاومت به کانامایسین، مبدا همانندسازی اشریشیاکلی Ori ColE1 و مبدا همانندسازی مایکوباکتریوم Ori M(PAL5000) جهت تکثیر و همانندسازی در هردو سیستم اشریشیا کلی و مایکوباکتریوم را دارد.

روش‌های متعددی برای آماده سازی DNA پلاسمیدی از سویه‌های میکوباکتریوم وجود دارد. به دلیل تعداد نسخه کم و کتورهای میکوباکتریوم ممکن است بازده آن برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی کم باشد. بنابراین، اغلب پیشنهاد می‌شود که پلاسمیدها از میکوباکتریوم‌ها به *E. coli* ترانسفورم و سپس تخلیص شوند. یک روش ساده، الکتروداکشن از میکوباکتریوم به *E. coli* است (۴۲). برای این منظور به اندازه یک حلقه فیلدوپلاتین کلنی rBCG از محیط لونشتاین جانسن که پیش از این کشت داده شده برداشت شد و با ۲۰ میکرولیتر گلیسرول ۱۰٪ سرد مخلوط شد. پس از ورتکس و ۱۰ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ، ۰/۴ میلی لیتر از باکتری *E. coli* مستعد شده به آن اضافه شد و پس از مخلوط نمودن کامل مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه بروی یخ قرار داده شد. سوسپانسیون حاصل به کوت ۰/۲ سانتی متر منتقل شد و یک پالس الکتریکی با ولتاژ ۲/۵ کیلو ولت، ۴۵ میکروفاراد و مقاومت ۲۰۰ اهم بر آن اعمال شد. سلول‌ها با رعایت شرایط استریل به ۵ ml از محیط مایع LB (-Luria bertani medium) منتقل شد و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. به دنبال سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰rpm رسوب حاصل بروی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت ۲۰ $\mu\text{g/ml}$ پخش شد و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. کلنی‌های حاصل از نظر دارا بودن پلاسمید بررسی شدند (۴۳).

یافته‌ها:

طراحی، ساخت و تأیید شاتل وکتور نو ترکیب pHSHP: پلاسمید بیانی Expression pHSHP vector با قابلیت بیان و ترشح توالی پلی توپ CE6NE4C متصل به HBsAg در سلول‌های BCG، به دنبال مراحل تناوبی کلونینگ ساخته شد. این پلاسمید دارای مبدا همانندسازی Ori ColE1، ژن مقاومت به کانامایسین و مبدا همانندسازی میکوباکتریومی Ori M (PAL5000) جهت تکثیر و همانند سازی در هر دو میزبان اشرشیاکلی و میکوباکتریوم بویس می باشد. وکتور حاصل pHSHP نامگذاری شد (شکل ۱). صحت کلونینگ

کشت BCG: به ۵ میلی لیتر از محیط broth - Middlebrook 7H9 واجد ۱۰٪ OADC و ۰/۰۵ Tween80 به اندازه یک حلقه فیلدوپلاتین از سویه BCG (pasteur1173P2) اضافه شد، پس از ورتکس به مدت ۷ روز در انکوباتور شیکر دار ۱۰۰ rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. سپس ۱۰ میلی لیتر از محیط 7H9 واجد OADC و Tween80 به محیط قبلی اضافه شد و به مدت یک هفته در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با دور ۱۰۰ rpm قرار داده شد. پس از ۲ هفته از Scale up نهایی، حجم محیط کشت به ۳۰۰ میلی لیتر رسانده شد و طی ۱۴ تا ۲۸ روز در انکوباتور شیکر دار با دور ۱۰۰ rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا زمانی که در طول موج ۶۰۰ نانومتر OD حدود ۰/۵ تا ۱ داشته باشد (۹).

ساخت سلول‌های مستعد و الکتروپوریشن BCG: ۲۴ ساعت قبل از برداشت (Harvest) سلول‌های BCG، ۰/۱ حجم محیط کشت، گلیسین ۲ مولار اتوکلاو شده به آن اضافه شد. سپس ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در این مرحله سلول‌ها با مقادیر ۵۰، ۲۵ و ۱۵ میلی لیتر محلول گلیسرول ۱۰٪ شستشو داده شدند. در نهایت سلول‌ها در یک میلی لیتر از این محلول حل شدند. مقدار ۱ میکروگرم از پلاسمید عاری از نمک pHSHP (۵ میکرولیتر) به ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون BCG اضافه شد و به کوت با قطر ۰/۲ سانتی متر انتقال داده شد. یک پالس الکتریکی با ولتاژ ۲۵۰۰، شدت جریان ۲۵ میکروفاراد و مقاومت ۱۰۰۰ اهم توسط دستگاه الکتروپوریشن (Bio Rad) Gene Pulser Xcell™ به سوسپانسیون اعمال شد. سپس سوسپانسیون به یک لوله استریل حاوی ۵ میلی لیتر محیط مایع 7H9 غنی شده با OADC و Tween80 منتقل شد و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از آن، سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند و بعد از انتقال به محیط لونشتاین جانسن حاوی ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین به مدت ۴ هفته در انکوباتور ۳۷°C سانتی گراد قرار داده شدند (۱۵).

الکتروداکشن بین BCG و *E. coli*:

درمان‌های موثر بر ضد هپاتیت C مزمن از ضروریات غیر قابل انکار می باشد (۲۶). در مطالعات متعدد نقش کلیدی لنفوسیت‌های سایتوتوکسیک T (CTL) در دفاع علیه عفونت‌های ویروسی به خصوص ویروس‌های غیر سایتوپاتیک، مانند HCV نشان داده شده است (۲۷). همچنین در مرحله حاد آلودگی ویروسی، پاسخ همه جانبه، قوی و پایدار سلول‌های T CD4+, CD8+ به آنتی‌ژن‌های ویروس در بیمارانی که از عفونت پاک شده‌اند دیده می شود (۲۸). موفقیت در بکارگیری از راهکار واکسن‌های چند اپی‌توپی در القاء پاسخ ایمنی سلولی ایجاد شده در ارتباط با پاتوژن‌هایی با موتاسیون زیاد، همچون برخی عفونت‌های ویروسی به خوبی نشان داده شده است (۲۹). علاوه بر این، کنار هم قرار گیری توالی نوکلئوتیدی سازنده در یک ساختار ساده، نه تنها در برانگیختن هم زمان پاسخ ایمنی علیه چندین اپی‌توپ نامتغییر و مهم پاتوژن موثر است، بلکه می تواند در حذف نواحی ناخواسته سرکوب کننده ایمنی به خصوص در مورد تضعیف عملکرد برخی از سلول‌های ایمنی نیز موثر باشد (۳۰). با این وجود توسعه این نوع واکسن‌ها نیازمند یافتن راه حل‌های مناسب در جهت افزایش بیان برای توالی‌های مصنوعی و افزایش ایمنی زایی آنها است. علاوه بر این، ناپایداری و بیان کم پروتئین در نتیجه فقدان ساختمان‌های دوم و سوم پروتئین‌های چنداپی‌توپی یکی از مشکلات پیش رو در طراحی این نوع واکسن هاست که می تواند بر ایمنوژنیسیته آنها تاثیر گذار باشد (۳۲). از سویی دیگر جزئیات مربوط به نحوه اثر و برش پروتئازوم در درون سلول و تاثیر اسیدآمینو مجاور بر پردازش یک اپی‌توپ هنوز به طور کامل مشخص نشده است (۳۱). بکارگیری HBsAg به عنوان پروتئین ارتقاء دهنده پاسخ ایمنی به صورت فیوژن با پپتیدهای هدف واکسن یکی از تمهیداتی بود که در این مطالعه اتخاذ شد. گزارش‌ها نشان می دهند اتصال توالی‌های هتروولوگ به این پروتئین نه تنها باعث افزایش پاسخ ایمنی، در نتیجه عرضه و جذب ذرات هیبرید توسط سلول‌های APC حرفه‌ای می شود، بلکه پایداری و حفظ ایمنوژنیسیته توالی آنتی‌ژن افزوده شده را نیز به دنبال دارد (۳۸). این پروتئین توانائی سرهم شدن (assembling) و تشکیل خود بخود ذرات شبه ویروسی

قطعات در پلاسمید بیانی pHSHP با روش Colony PCR و هضم آنزیمی و به دنبال برش با آنزیم‌های *NdeI* و *SalI* تائید شد (شکل‌های ۳ و ۲). در نهایت با روش‌های تعیین توالی صحت قطعه کلون شده *hsp60-αS*- polytope-HBsAg تائید شد.

ترانسفورماسیون BCG با پلاسمید pHSHP: به دنبال الکتروپوریشن سلول‌های مستعد BCG در مجاورت پلاسمید pHSHP پس از گذشت ۴ هفته، کلنی‌های نخودی رنگ درشت و تپیک BCG بر روی محیط لوشتاین جانسن حاوی ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر کانامایسین ظاهر شدند. رشد این کلنی‌ها در حضور کانامایسین دلیلی بر ترانسفورم شدن آنها با پلاسمید pHSHP بود. با این وجود به منظور تایید نهائی ورود پلاسمید به سلول‌های BCG، از روش الکتروداکشن و انتقال پلاسمید به سلول‌های *E. coli* استفاده شد. پس از انجام الکتروداکشن از rBCG به *E. coli* و غربالگری کلنی‌های حاصل از رشد *E. coli* نوترکیب حاوی پلاسمید بر محیط دارای کانامایسین پلاسمید pHSHP از کلنی‌های رشد کرده تخلیص و با هضم آنزیمی تائید شدند. نتایج نشان داد که پلاسمید pHSHP از سلول‌های rBCG به سلول‌های *E. coli* وارد شده است.

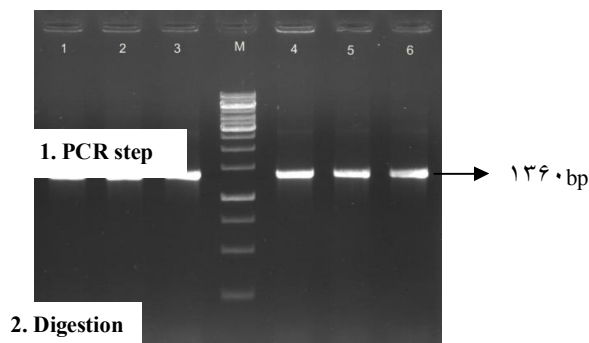
بحث:

ویروس‌های مرتبط با بیماری هپاتیت (به ویژه هپاتیت‌های B و C) به دلیل فراگیری جهانی به طور وسیع تحت مطالعه و تحقیق هستند. برخلاف هپاتیت‌های B و A؛ نبود واکسن پیشگیری کننده علیه HCV، عوارض کشنده بالا، پاسخ نامناسب به درمان و گسترش روز افزون، این ویروس را به یک معضل بهداشتی جهانی تبدیل نموده است. دلایل مختلف؛ از جمله پایداری ویروس به علت تنوع ژنتیکی آن، عدم وجود سیستم کشت سلول کارآمد جهت تکثیر ویروس، و فقدان اطلاعات کافی در مورد ایمنولوژی مرتبط با حفاظت ویروس، می توانند موانع تولید واکسن پیشگیری کننده علیه هپاتیت C باشد (۲۵). در سال‌های اخیر واکسن‌های مختلفی طراحی و ساخته شده است، اما هیچ کدام مجوز استفاده برای واکسیناسیون را نداشتند. بنابراین، تلاش برای دستیابی هرچه سریع‌تر به

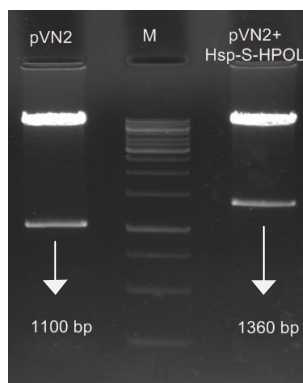
ژن Core بریده شده (truncated)، توالی mimotope از ناحیه E2 و شش اپی توپ پروتئین‌های غیر ساختاری حفاظت شده و ایمونودامینت و ویروس، منجر به تحریک هر دو پاسخ ایمنی همورال و سلولی در موش‌های تراریخته شد (۳۷). در مطالعه حاضر نه تنها اپی توپ‌های ایمونودامینت و حفاظت شده مربوط به مناطق Core، E2 و NS3 ویروس انتخاب شدند، بلکه بکارگیری ژن HBsAg به عنوان پروتئین ارتقاء دهنده پاسخ ایمنی در کنار این پلی توپ یکی از راهکارهایی است که برای اولین بار در BCG انجام شد. برتری استفاده از پروموتور *hsp60* در طراحی و ساخت وکتور شاتل مایکوباکتریومی نه تنها در افزایش بیان ژن‌های خارجی، بلکه در حفاظت پروتئین بیان شده از هیدرولیز توسط پروتئازها و تشدید پاسخ ایمنی ایجاد شده در زمان تجمع زیاد پروتئین‌های بیان شده در فاگوزوم، موثر است. همچنین وجود سیگنال پپتید قبل از توالی پروتئین مورد نظر می تواند باعث ترشح هدایت شده و حفظ پاسخ ایمنی مفید علیه آن شود. به علاوه، در بررسی‌های مختلف بیان سطح بالایی از آنتی ژن‌های ویروسی و باکتریایی تحت کنترل پروموتور *hsp60* نشان داده شده است. بنابراین از این حیث یکی از مورد استفاده ترین پروموتورهای موجود در شاتل وکتورهای مایکوباکتریایی به شمار می رود (۴۰). تائید وجود این شاتل وکتور در BCG با انجام روش الکتروداکشن به *E. coli* دلیلی بر صحت عمل الکتروپوریشن و ترانسفورم شدن سلول‌های BCG می باشد. با این وجود بررسی بیان پلی توپ در محیط کشت BCG ترانسفورم شده با روش‌های SDS-PAGE و وسترن قبل از انجام تحقیقات مربوط به ایمنی‌زایی این باکتری‌ها در حیوان ضروری به نظر می رسد.

در ادامه این مطالعه و به دنبال ساخت rBCG دارای پلاسمید بیان کننده پلی توپ HCV، بررسی بیان و ترشح polytope-HBsAg به محیط کشت و آنالیز ایمنی‌زایی این واکسن اقداماتی هستند که مورد توجه خواهند بود.

را بدون دخالت نوکلئوکپسید ویروس هپاتیت B با کمک لپیدهای سلول دارد. HBsAg با داشتن ذخیره غنی از اپی توپ‌های کمکی (Th) و نیز مجوز استفاده برای واکسیناسیون جهانی علیه بیماری هپاتیت B می تواند گزینه مناسبی برای انتقال و عرضه اپی توپ‌های خارجی به سیستم ایمنی باشد (۳۹). امروزه استراتژی‌های متنوعی در ساخت واکسن‌های نو ترکیب بر علیه HCV گزارش شده است (۲۷). ولی هر کدام به نوبه خود دارای مزایا و معایبی هستند. بر پایه بررسی‌های اخیر در مکانیسم‌های کنترلی عفونت ویروسی، توانایی یک واکسن را در القاء پاسخ آنتی‌بادی‌های خنثی کننده در جهت جلوگیری از گسترش ویروس، و پاسخ همه جانبه و قوی ایمنی سلولی میزبانی اعم از CD4+، CD8+ در پاکسازی ویروس امری ضروری می داند (28). از این رو انتخاب یک وکتور مطلوب به منظور تحریک کامل سیستم ایمنی در جهت بیان پایدار اپی توپ‌های HCV بسیار حائز اهمیت است. در بین وکتورهای باکتریایی، وکتورهای BCG کارایی بهتری دارند. زیرا توانایی تکثیر *in vivo* در ماکروفاژ به عنوان میکروارگانیسم داخل سلولی را دارند. واکسن BCG با دارا بودن خاصیت ادجوانتی بالای خود توانایی فعال سازی هر دو پاسخ ایمنی همورال و ایمنی وابسته به سلول را دارد. علاوه بر این، درمان بالینی ایتراوزیکال با BCG به عنوان یک عامل ضد توموری در درمان سرطان سطحی توموری و ملانوما بدخیم به طور موفقیت آمیزی مورد استفاده قرار گرفته است (۳۴ و ۳۵). از مزایای دیگر آن می توان به استفاده ارزان، بالا بودن گنجایش برای قطعات بزرگ DNA و پایداری در گرما اشاره نمود (۳۷) در سال ۲۰۰۳ اولین گزارش مربوط به بیان پروتئین‌های ویروس HCV در BCG توسط Uno-furuta و همکارانش انجام شد که نتایج حاصل حاکی از بیان افزایشی سایتوکین‌ها و تحریک پاسخ ایمنی سلولی به وسیله این واکسن در حیوانات آزمایشگاهی بود (۳۶). گزارش دوم در سال ۲۰۰۸ به وسیله H. Wei و همکاران ارائه شد. بدین صورت که ایمنی‌زایی BCG نو ترکیب ترشح کننده آنتی -



شکل ۲: تایید کلونینگ قطعه نهایی در وکتور pHSHP با روش Colony PCR. باندهای ۱ تا ۶ مربوط به کلون‌های مثبت حاوی قطعه ۱۳۶۰ جفت بازی HSP-S-HPOL (M) مارکر وزن مولکولی ۱kb



شکل ۳: تایید کلونینگ قطعه نهایی HSP- α S-HPOL در وکتور pVN2 با استفاده از آنالیز آنزیمی. باند سمت راست واکنش هضم آنزیمی با *NdeI* و *SalI* برای تایید قطعه نهایی HSP-S-HPOL باند سمت چپ ایجاد قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی در نتیجه هضم آنزیمی *NdeI* و *SalI* بروی وکتور pVN2 (M) مارکر وزن مولکولی ۱kb

کلنی‌های حاصل قابلیت بررسی از نظر امکان ترشح پروتئین نوترکیب مورد نظر را دارا است.

تقدیر و تشکر:

این مقاله حاصل بخشی از نتایج پایان نامه دکتری تخصصی (phD) مصوب شورای آموزشی انستیتو پاستور ایران می باشد.

نتیجه گیری:

در این مطالعه نتایج حاصل از بررسی پلاسمید از طریق الکتروداکشن پس از ساخت شاتل وکتور نهایی pHSHP و ترانسفکت آن به BCG نشان داد که امکان ساخت BCG نوترکیب ترشح کننده پلی‌توپ‌های HCV وجود دارد.

فهرست مراجع:

1. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:215-29.
2. Houghton M, Sergio A. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus, *Nature* 2006; **436**:961-966.
3. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *New Engl J Med* 2001; **345**:41-52.
4. Pawlotsky J.M, Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease, *Trends Microbiol.* 2004; **12**:96-102.
5. Inchauspe G, Bach G, Martin P, Bonnefoy JY, Vaccination Against Hepatitis B and C: Towards Therapeutic Application, *Informa Healthcare* 2009; **28**:7-19.
6. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder J.C, et al The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies, *Science* 2000; **288**: 339-344.
7. Nelson Acosta-Rivero, Santiago Due~nas-Carrera. HCV core protein-expressing DNA vaccine induces a strong class I-binding peptide DTH response in mice. *Bioch Bio Res Comm* 2004; **314** :781-786.
8. Yu Ch, Chiang BL, A new insight into Hepatitis C vaccine Development, *J Biomed Biotech*, 2010, doi: **10.1155**.
9. Chen JY, Fan Li, Development of hepatitis C virus vaccine using hepatitis B core antigen as immunocarrier. *World J Gastroenterol* 2006 **12**: 7774-7778
10. Sette A, Fiks J. Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Curr opin immunol* 2003; **15**:461-70.
11. Yuanding Chen, Xinyu Xiong. Immunoreactivity of HCV/HBV epitopes displayed in an epitope-presenting system. *Molecular Immunology* 2006; **43**:436-442.
12. Tine JA, Firat H, Payne A, Russo G, Davis SW, Tartaglia J, et al. Enhanced multi-epitope-based vaccines elicit CD8+ cytotoxic T cells against both immunodominant and cryptic epitopes. *Vaccine* 2005; **23**:1085-1091
13. Yuanding Chen, Xinyu Xiong. Immunoreactivity of HCV/HBV epitopes displayed in an epitope-presenting system. *Molecular Immunology* 2006; **43**:436-442.
14. Rezende CA, De Moraes MT, De Souza Matos DC, McIntoch D, Armoa GR. Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens. *J Virol Methods* 2005; **125**:1-9.
15. Cho SN, Hwang JH, Park S, Chong Y, Kim SK, Song CY, et al. Factors Affecting Transformation Efficiency of BCG with a *Mycobacterium-Escherichia coli* Shuttle Vector pYUB18 by Electroporation, *Yonsei medical J* 1998; **39**:141-147.
16. Dennehy M, Williamson AL, Factors influencing the immune response to foreign antigen expressed in recombinant BCG, *vaccines* 2005; **23** :1209-1224.
17. Bastos RG, Borsuk S, Seixas F, Dellagostin OA, Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG, *vaccine* 2009; **27**: 6495-6503.
18. Hahn YS. Subversion of immune responses by hepatitis C virus: immunomodulatory strategies beyond evasion? *Curr Opin Immunol* 2003; **15**:443-9.
19. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; **282**:938-41.
20. Lechman M, Liang TJ. Vaccine development for hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2000; **20**:211-26.
21. Wei SH, Yin W, An QX, Lei YF, Hu XB, Yang J, et al. A novel hepatitis C virus vaccine approach using recombinant *Bacillus Calmette-Guerin* expressing multi-epitope antigen. *Arch Virol* 2008; **153**:1021-9.
22. 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**:429-440.
23. GJ Hu, RY-H Wang, D.S. Han, H J Alter, J.W.K Shih, Characterization of the humoral and cellular immune responses against hepatitis C virus core induced by DNA-based immunization, *Vaccine* 1999; **17**:3160-3170.
24. Memarnejadian A, Roohvand F, Fusion of HBsAg and prime/boosting augment Th1 and CTL responses to HCV polytope DNA vaccine, *Cellular immunology* 2010; **261**:93-98
25. Davis GL, Albright JE, Cook SF, Rosenberg DM Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transp* 2003; **19**:331-338
26. Yu H, Huang H, Xiang J, Babiuk LA, den Hurk S. Dendritic cells pulsed with hepatitis C virus NS3 protein induce immune responses and protection from infection with

- recombinant vaccinia virus expressing NS3. *J Gen Virol* 2006;**87**:1-10
27. Stoll-Keler F, Barth H, Fafi-Kremer S, Zeisel M, Baumert T, Development of hepatitis C virus vaccines: challenges and progress, *Expert Rev.vaccines* 2009;**8**: 333-345.
28. Irshad M, Khushboo I, Singh Sh, Hepatitis C Virus(HCV): A Review of Immunological Aspects, *Informa Healthcare* 2008;**27**:497-517.
29. Woodberry T, Gardner J, Mateo L, Immunogenicity of a Human Immunodeficiency Virus(HIV) Polytope Vaccine Containing Multiple HLA A2 HIV CD8+ Cytotoxic T-Cell Epitopes. *J virol* ,1999; **73**:5320-5325.
30. 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**:6409-6419.
31. Suhrbier A. Polytope vaccines for the co delivery of multiple CD8 T-cell epitopes. *Expert Rev Vaccines* 2002;**1**: 207-213.
32. 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.
33. Sallberg M, Frelin L, Weiland O, DNA vaccine therapy for chronic hepatitis C virus infection: immune control of a moving target, *Expert opinion* 2009; **9**:805-815.
34. Mastrangelo MJ, Baker AR, Katz HR. Cutaneous melanoma in cancer. In: Devita Jr VT, editor. Principles and practice in oncology. 2nd ed. Philadelphia: *J.B. Lippincott*; 1985. p 1371-442.
35. Morales A, Nickel JC. Immunotherapy for superficial bladder cancer. A developmental and clinical overview. *Urol Clin North Am* 1992;**19**:549-56.
36. Uno-Furuta S, Matsuo K, Tamaki S, Takamura S, Kamei A, Kuromatsu I, et al Immunization with recombinant Calmette-Guerin bacillus (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine* 2003; **21**:3149-3156.
37. A.D. Groot, H. Sbai, C.S. Aubin, J. McMurray, W. Martin, Immuno-informatics: Mining genomes for vaccine components, *Immunol Cell Biol.* 2002; **80**:255-69.
38. N. Himoudi, J.D. Abraham, A. Fournillier, Y.C. Lone, A. Joubert, A.O. De Beeck, D. 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**:12735-46.
39. Baez-Astua A, Herraiz-Hernandez E, Garbi N, HA, Juarez V, Zur HH, et al. Low-dose adenovirus Pa-solli vaccine encoding chimeric hepatitis B virus surface human papillomavirus type 16 E7 proteins induces anti-gen-enhanced E7-specific antibody and cytotoxic T-cell re-sponses. *J Virol* 2005; **79**: 12807-12817.
40. Bao L, Chen W, Zhang H. Virulence, immunogenicity, and protective efficacy of two recombinant Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin strains expressing the antigen ESAT6 from Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 2003;**71**:1656-1661.
41. Memarnejadian A, Roohvand F, Arashkia A, Rafati S, Shokrgozar, M. A, Polytope DNA Vaccine Development Against Hepatitis C Virus: A Streamlined Approach from *In Silico* Design to *In Vitro* and Primary *In Vivo* Analyses in BALB/c Mice, *Protein & Peptide Letters* 2009;**16**: 435-446.
۴۲. Baulard A, Jourdan C, Mercetier A, Ionch C, rapid mycobacterial plasmid analysis by electrotransformation between mycobacterium spp and *Esherichia coli* ,*Nucleic acids Res* 1992; **20**: 4105.
43. transferring plasmid DNA between differed bacterial species with electroporation *Nucleic Acids Res* 1990 ;**18**: 6165.