مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره ۴، زمستان۱۳۸۹، صفحات ۴۰-۳۰

مدل‌سازی ایمونوانفورماتیکی، ساخت پلاسمیدهای حامل اپی‌توپ‌های CTL ویروس هپاتیت C و بررسی اولیه ایمنی‌زایی آنها

آرش آرش کیا، فرزین روحوند*، آرش معمارنژادیان، شهاده علیزاده، فاطمه متولی، ملانیا ابراهیمی

بخش هپاتیت و ایدز، بانک ژن نوترکیب، انستیتو پاستور ایران
نویسنده رابط: فرزین روحوند، انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز، بانک ژن نوترکیب صندوق پستی ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱
تلفن: ۰۲۱-۶۶۹۶۹۲۹۱ rfarzin@pasteur.ac.ir
تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۸ **تاریخ پذیرش:** ۸۹/۱/۲۰

چکیده:

زمینه و اهداف: تاثیرات سرکوب کنندگی برخی از کلیدی‌ترین پروتئین‌های ویروس هپاتیت C (HCV) بر سیستم ایمنی و جهش سریع ویروس، توجه را به‌واحدهای ایمونوژن کوچک و پایدار جلب نمود. لذا، واکسن‌های مولتی-اپی-توپ به‌منظور تمرکز پاسخ ایمنی بر این واحدها معرفی شدند. ولی، به‌دلیل پاسخ ایمنی نسبتاً ضعیف علیه این واکسن‌ها، افزایش ایمنی‌زایی نیازمند تمهیدات بیشتری است. این مطالعه با هدف ساخت پلاسمیدهای حامل اپی‌توپ‌های CTL ویروس هپاتیت C به‌روش مدل سازی ایمونوانفورماتیک و تعیین اولیه ایمنی‌زایی آنها انجام شد.

روش بررسی: یک اپی‌توپ $H\text{-}2D^d$ و دو اپی‌توپ HLA-A*0201 از نواحی E2، E1 و core در HCV انتخاب شد و با ابزارهای ایمونوانفورماتیک برای بهترین ترادف آنالیز شد. توالی مولتی-اپی‌توپ به‌روش SOEing-PCR ساخته شد و در ناقل pcDNA3.1+ کلون گردید. توالی‌های ارتقاء دهنده PADRE، سیگنال رتیکولوم آندوپلاسمیک (ER signal sequence: ERss) و HBsAg به‌انتهای '۵ توالی مولتی-اپی‌توپ متصل شد و بیان پلاسمیدها به‌صورت *in-vitro* به‌روش‌های RT-PCR، دات-بلات، وسترن-بلات و ایمونوفلورسانس بررسی شد. ارزیابی اولیه ایمنی‌زایی به‌صورت *in-vivo* با آزمایش ازدیاد حساسیت تاخیری (Delayed type hypersensitivity: DTH) انجام شد. نتایج با آزمون‌های Non parametric Mann-Whitney و ANOVA ارزیابی شدند.

یافته‌ها: نتایج آزمایش‌های *in-vitro*، بیان پلاسمیدها را تائید کرد و ارزیابی‌های اولیه *in-vivo*، پردازش و عرضه اپی‌توپ $H\text{-}2D^d$ را در موش BALB/c نشان داد. همچنین در حالیکه اثرات ارتقاء پاسخ برای ERss و PADRE نشان داده شدند، اتصال HBsAg تاثیری در افزایش پاسخ نداشت.

نتیجه گیری: این مطالعه ارزش پیش‌بینی‌های ایمونوانفورماتیک و آزمایش DTH را، برای آنالیز اولیه واکسن‌های داوطلب مولتی اپی‌توپی در موش‌های BALB/c، نشان داد. نتایج، تائید کافی برای بررسی بیشتر سازه‌های طراحی شده را در موش ترانس ژنیک (تراریخته) HLA-A2 فراهم می‌کند.

کلید واژه‌ها: ایمونوانفورماتیک، تقویت کننده ایمنی، مولتی-اپی‌توپ، بیان یوکاریوتی، ویروس هپاتیت C

مقدمه :

ویروس هپاتیت C (Hepatitis C Virus) یکی از عوامل اصلی بیمارهای عفونی کبد است که در بیش از ۵۰٪ موارد منجر به‌عفونت مزمن می‌شود. در حال حاضر واکسن پیشگیری کننده در برابر این ویروس وجود ندارد و روش‌های درمانی نیز به‌صورت محدود عمل می‌نمایند. با توجه به‌وضعیت حاضر، نیاز به‌روش‌های موثر پیشگیری و یا درمان احساس می‌گردد (۱). شواهد موجود حاکی از آن است که درمان موفق بیماری و یا پاکسازی خودبخود ویروس از بدن با پاسخ شدید، پایدار و چندگانه (multispecific) سلول‌های T همراه است. این در حالی است که در عفونت مزمن با این ویروس، پاسخ سلول‌های T ضعیف و محدود می‌باشد. این امر عامل ایجاد عواقب بیماری است. زیرا، سلول‌های T در این بیماران قدرت کافی برای تخریب سلول‌های کبدی آلوده را دارند ولی توان لازم جهت پاکسازی ویروس را ندارند (۲). بنابراین، تقویت پاسخ این نوع از سلول‌ها در عفونت مزمن می‌تواند به‌عنوان راهکاری در درمان بیماران مد نظر قرار گیرد. استفاده از حاملین پلاسمیدی که بیان کننده ژن‌های عامل بیماریزا باشند، از جمله روش‌هایی است که در این راستا مورد توجه قرار گرفته است (۳, ۴). آنتی‌ژن‌های مرسوم به‌کار گرفته شده در حاملین پلاسمیدی معمولاً شامل آنتی‌ژن‌های کامل است. این در حالی است که برخی آنتی‌ژن‌های ویروس هپاتیت C مانند core و E2 قابلیت سرکوب سیستم ایمنی را دارند و نیز اغلب تحت تأثیر جهش‌های ژنی سریع و مداوم قرار می‌گیرند (۲). با توجه به این خصوصیات، استفاده از اپی توپ‌های (Epitopes) ایمنی‌زا به‌جای آنتی‌ژن کامل که پایداری (conservancy) قابل قبولی در برابر جهش‌های ژنی داشته باشند، مد نظر قرار گرفت. در اینگونه واکسن‌های اپی‌توپی امکان استفاده از چندین اپی‌توپ بر گرفته از آنتی‌ژن‌های مختلف به‌صورت همزمان وجود دارد. آنها تحت عنوان واکسن‌های مولتی‌اپی‌توپی (multiepitope vaccines) شناخته می‌شوند. این واکسن‌ها قادرند پاسخ ایمنی را بر روی اپی‌توپ‌های بکار رفته متمرکز کنند و از اثرات ناخواسته آنتی‌ژن‌های کامل جلوگیری نمایند (۵).

در طراحی سازه‌های چند اپی‌توپی، عوامل متعددی دخیل هستند. از مهم‌ترین آنها می‌توان به‌ترتیب قرارگیری اپی‌توپ‌ها و وجود توالی‌های فاصله‌انداز (spacer) بین اپی‌توپی اشاره کرد که به‌طور مستقیم با پردازش و عرضه اپی‌توپ‌ها در ارتباط می‌باشند (۶, ۷). تا کنون سازه‌های مولتی‌اپی‌توپی علیه بیماری‌های عفونی مختلف و سرطان‌ها مورد آزمایش قرار گرفته است (۷). ولی ایمنی‌زایی این واکسن‌ها ضعیف است. محققین از روش‌های مختلف جهت افزایش پاسخ به این نوع واکسن‌ها استفاده می‌کنند. استفاده از عوامل کمکی جهت افزایش پاسخ ایمنی نسبت به اپی‌توپ‌ها از جمله مواردی است که در طراحی این سازه‌ها مورد مطالعه قرار می‌گیرد (۸).از جمله این عوامل کمکی می‌توان به‌توالی PADRE (Pan-DR epitope) اشاره کرد که یک اپی‌توپ عمومی (universal) با قابلیت اتصال به‌محدوده وسیعی از هاپلوتایپ‌های (Haplotypes) MHC کلاس II انسانی و موشی می‌باشد (۸). همچنین از آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) به‌عنوان حامل و منبع اپی‌توپ‌های کمکی (۹) و نیز توالی سیگنال رتیکولوم اندوپلاسمیک (ER signal sequence یا ERss) به‌عنوان عاملی که می‌تواند به‌پردازش و عرضه اپی‌توپی کمک نماید، می‌توان نام برد (۸). لازم به‌ذکر است که در مطالعات معدودی که در آنها از ناقل‌های مولتی‌اپی‌توپ علیه HCV استفاده شده است (۵, ۱۰)، نیاز به‌روش‌هایی جهت تقویت بیشتر پاسخ ایمنی مورد تاکید قرار گرفته است.

نکته قابل توجه در استفاده از اپی‌توپ‌های محدود به HLA انسانی این است که بررسی ایمنی‌زایی این واکسن‌ها در موش‌های تراریخته (Transgenic Mouse) دارای HLA انسانی امکان پذیر می‌باشد (۸). با توجه به‌هزینه بالا و محدودیت دسترسی به این نوع از موش‌ها، استفاده از اپی‌توپ‌های قابل عرضه با MHC موش‌های رایج آزمایشگاهی و انجام بررسی‌های اولیه بر روی این اپی‌توپ‌ها قبل از مطالعه بر روی موش‌های تراریخته می‌تواند راهکار مناسبی باشد. همچنین به‌دلیل سطح بیانی اندک سازه‌های مولتی‌اپی‌توپ که تا حدی ناشی از اندازه

کوچک واحدهای ژنی کد کننده می‌باشد (۱۱, ۱۲)، بررسی سطح بیان این سازه‌ها و انجام تست‌های اولیه بررسی پاسخ ایمنی می‌تواند توجیه علمی و اقتصادی لازم جهت انجام تست‌های کامل‌تر و گران‌تر را فراهم نماید.

مطالعه حاضر با هدف مدل سازی ایمونوانفورماتیکی ساخت پلاسمیدهای حامل اپی‌توپ‌های CTL ویروس هپاتیت C و تعیین اولیه ایمنی‌زایی آنها انجام شد. به این ترتیب در مطالعه حاضر با هدف طراحی و ساخت داوطلب واکسن مولتی‌اپی‌توپ علیه HCV، سعی شد بر اساس آنالیزهای ایمونوانفورماتیک دو اپی‌توپ محدود به HLA انسانی (HLA-A*0201) و یک اپی‌توپ محدود به MHC موش BALB/c ($H2\text{-}D^d$) از نواحی E1، E2 و core ویروس هپاتیت C انتخاب شود. پس از ساخت پلاسمید بیان کننده این توالی صناعی، در گام اول از بیان آن در سلول‌های یوکاریوت اطمینان حاصل شد و در گام بعد پیش از بررسی ایمنی‌زائی در موش‌های تراریخته، ابتدا پاسخ ایجاد شده علیه اپی‌توپ $H2\text{-}D^d$ با استفاده از آزمایش ازدیاد حساسیت تاخیری در موش BALB/c بررسی گردید. همچنین به‌منظور ارتقاء پاسخ ایمنی، تاثیر عوامل کمکی PADRE، ERss و HBsAg نیز با ساخت پلاسمیدهای بیان کننده مولتی اپی‌توپ متصل به این توالی‌ها بررسی شد.

مواد و روش ها :

طراحی و ساخت سازه‌های ژنی :

دو اپی‌توپ محدود به HLA-A*0201 انسانی از نواحی E1 و core ویروس هپاتیت C ($core_{35\text{-}44}$، $E1_{363\text{-}372}$)و یک اپی‌توپ محدود به $H2\text{-}D^d$ موشی از ناحیه E2 ویروس ($E2_{405\text{-}414}$) انتخاب شد و تحت ارزیابی‌های ایمونوانفورماتیک قرار گرفتند. این ارزیابی‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای مدل سازی مانند PAProC (http://www.paproc.de) و Netchop (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/) جهت بهینه‌سازی ترتیب قرارگیری اپی‌توپ‌ها و به‌منظور دستیابی به‌بهترین حالت پردازش اپی‌توپی انجام گرفت (۱۳, ۱۴). همچنین یک مدل پیش‌بینی کننده به‌نام Bimas (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) نیز به‌کار گرفته شد، تا احتمال ایجاد اپی‌توپ‌های بینابینی جدید با میل ترکیبی (Affinity) زیاد به‌حداقل برسد (۱۵). در نهایت بهینه‌سازی کدون‌های ژنتیکی جهت افزایش کارایی ترجمه در سلول‌های یوکاریوت با استفاده از جدول فراوانی کدون‌های انسانی (http://www.kazusa.org.jp/codon/) انجام شد(۱۶).

پس از بررسی ایمونوانفورماتیک تمام حالت‌های ممکن، ناشی از قرار گرفتن اپی‌توپ‌ها در کنار یکدیگر و دستیابی به‌بهترین ترتیب قرارگیری، ساخت دو توالی حدوداً ۶۰ نوکلئوتیدی با ۱۷ نوکلئوتید همپوشان سفارش داده شد (MWG Biotech, Germany). این توالی‌ها با استفاده از فن Splice Overlap Extensioning (SOEing) PCR به‌یکدیگر متصل شدند (۱۱). توالی حاصل پس از برش با دو آنزیم *BamHI*/*Eco*RI در پلاسمید یوکاریوتی pcDNA3.1+ (Invitrogen) کلون شد تا ناقل p21C به‌دست آید. همچنین توالی‌های کد کننده PADRE و نیز ERss نیز به‌همین روش به‌ترتیب به‌انتهای '۵ توالی فوق اضافه گردید و به‌ترتیب ناقل‌های pP21C و pERP21C حاصل شدند (شکل ۱). در نهایت توالی کد کننده HBsAg در ناقل pcDNA3.1+ کلون گردید تا ناقل pcHBs حاصل گردد و توالی‌های 21C و P21C نیز به‌انتهای '۳ آن متصل شدند و پلاسمیدهای pH21C و pHP21C ساخته شدند (شکل ۱).

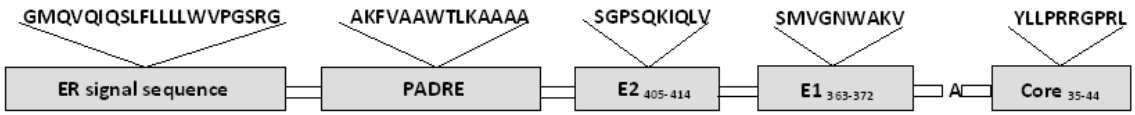
تمام ناقل‌های به‌دست آمده، در سلول *E.coli* DH5α ترانسفورم (Transform) شد و پس از توالی‌یابی و تأیید صحت، در مقیاس زیاد با استفاده از NucleoBond® PC 10000 EF Kit (MN, Germany) تخلیص شدند تا در مراحل بعد مورد استفاده قرار گیرند.

پپتیدها و تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال:

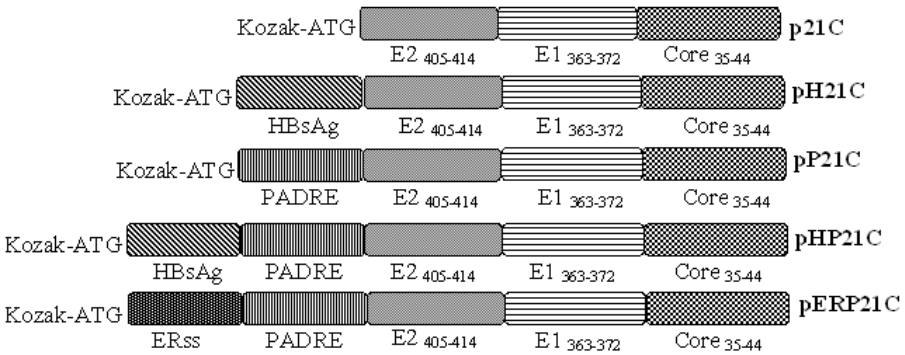
پپتیدهای اپی‌توپی PADRE، $E2_{405\text{-}414}$، $E1_{363\text{-}372}$ و $core_{35\text{-}44}$ و یک اپی‌توپ غیر مرتبط از ویروس HIV (ILKEPVHGV) به‌همراه پپتید مولتی‌اپی‌توپ E21C که حاوی سه اپی‌توپ $E2_{405\text{-}414}$، $E1_{363\text{-}372}$ و $core_{35\text{-}}$

44 به‌صورت متوالی بود، به‌روش Fmoc و درجه خلوص بیش از ۹۷٪ توسط انستیتو بیوشیمی دانشگاه لوزان سوییس (Institut de Biochimie, Université de Lausanne, Swiss) ساخته شدند. احتمال وجود شاخص آنتی‌ژنیک در پپتید E21C که بتواند پاسخ آنتی‌بادی را در خرگوش برانگیزد، با استفاده از یک مدل پیش بینی کننده (http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html) ارزیابی شد. پس از آن، تزریق پپتید به‌خرگوش انجام پذیرفت. به این صورت که ۵۰۰ میکروگرم از پپتید با اجوانت کامل فروند (Complete Freund's Adjuvant) مخلوط شد و به‌صورت زیر جلدی در مناطق مختلف در پشت حیوان تزریق گردید. دوز یادآور پس از ۴ هفته و همراه اجوانت ناقص فروند (Incomplete Freund's Adjuvant) تزریق شد و در نهایت ده روز پس از تزریق دوز یادآور، خونگیری و آزمایش سرم خرگوش به‌روش الیزا (ELISA) جهت تأیید حضور آنتی بادی انجام پذیرفت (۱۷).

(الف)



(ب)



شکل ۱: نمایش سازه‌های مولتی اپی‌توپ.

الف) توالی آمینواسیدی سیگنال رتیکولوم آندوپلاسمیک (ER signal sequence)، PADRE و سه اپی‌توپ اختصاصی CTL ($E2_{405-414}$، $E1_{363-372}$ و $core_{35-44}$) که کنار یکدیگر قرار داده شده‌اند.

ب) نمایش پنج سازه بکار رفته که توالی اپی‌توپ‌های اختصاصی CTL را به‌تنهایی یا همراه با HBsAg، PADRE و یا سیگنال رتیکولوم آندوپلاسمیک (ERss) کد می‌کنند. Koz/ATG نمایانگر توالی Kozak و کدون شروع ترجمه (ACCATG) است.

ارزیابی بیان ژن‌ها:

ارزیابی بیان در ناقل‌های فاقد HBsAg به‌روش RT-PCR و دات بلات (Dot-Blot) و در ناقل‌های حامل HBsAg توسط وسترن بلات (Western-Blot) و ایمونوفلورسانس (Immunofluorescence) انجام گرفت. تمامی ناقل‌ها بعلاوه ناقل‌های شاهد شامل

pcDNA3.1+ و pcHBs، با استفاده از محلول ترانسفکشن PolyFect (PolyFect transfection reagent, Qiagen, Germany) و طبق دستورالعمل سازنده به‌رده سلولی COS-7 ترانسفکت (Transfect) شدند. بدین‌صورت که یک روز قبل از ترانسفکشن، سلول‌های COS-7 در ظروف شش خانه‌ای (6-well plates) و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FCS،ال-گلوتامین و پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند. ترانسفکشن با استفاده از ۱/۵ میکروگرم پلاسمید انجام شد و ۷۲ ساعت بعد، سلول‌ها تریپسینه (Trypsinized) شدند. پس از شستشو و سانتریفوژ، در محلول لیزکننده (Lysis buffer) حاوی 0.1 M Tris-Cl (pH 7.8) و 0.5%(V/V) Triton X-100 حل شدند. پس از ۱۵ دقیقه گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سانتریفوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه، مایع‌رویی حاصل در نیتروژن مایع فرو برده شد (snap freeze) و جهت مصارف بعدی در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت انجام دات بلات به‌روش استاندارد (۱۸)، عصاره حاصل از تخریب سلول‌ها بر روی کاغذ نیتروسلولز (Nitrocellulose membrane) منتقل شد. پس از خشک شدن به‌مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، شستشو داده شد و با محلول BSA 3% بلوک (Block) گردید. به‌مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مجاورت آنتی‌سرم پلی‌کلونال خرگوشی (Rabbit polyclonal antiserum) که قبلاً تهیه شده بود، قرار گرفت. نهایتاً به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در معرض HRP-conjugated anti-rabbit Ab (Sigma, USA) قرار داده شد. نقاط آشکار شده به‌دنبال افزودن سوبسترای DAB (Roche, Germany) عکسبرداری شد و با استفاده از نرم‌افزار Adobe Photoshop 6.0. کنتراست (Contrast) آنها تنظیم گردید.

جهت انجام آزمایش RT-PCR، RNA سلول‌های ترانسفکت شده توسط محلول Trizol (Invitrogen, USA) تخلیص شد. ۱/۵ میکروگرم از RNA با استفاده از Random Hexamer و MMLV reverse transcriptase (Promega, USA) به cDNA تبدیل شد و نهایتاً با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مرتبط و انجام PCR، حضور باندهای مربوطه بررسی گردید.

آزمایش وسترن بلات به‌روش استاندارد (۱۹) با انجام SDS-PAGE بر روی لیزات سلولی (Cell lysate) آغاز شد. به‌ترتیب با انتقال پروتئین از ژل ۱۲٪ به‌کاغذ نیتروسلولزی، تیمار (treatment) شبانه با anti-HBs monoclonal Ab (Cedarlane, Canada) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ، مجاورت ۲ ساعته با goat anti-mouse IgG/HRP conjugate (Jackson Immunoresearch, USA) در دمای اتاق و نهایتاً آشکارسازی با سوبسترای DAB پیگیری شد.

درایمونوفلورسانس (Immunofluorescence) ، ۷۲ ساعت پس از کشت سلول‌های ترانسفکت شده بر روی لام شیشه‌ای، لام‌ها با پارافرمالدئید ۴٪ (Paraformaldehyde) ثابت شد و جهت نفوذ پذیر ساختن دیواره سلول‌ها در مجاورت Triton X- 0.1% 100 قرار گرفتند. سپس anti-HBs monoclonal Ab و به‌دنبال آن، FITC-conjugated anti-mouse IgG (Sigma) بکار گرفته شدند و تصاویر سلولی در زیر میکروسکوپ ایمونوفلورسانس بررسی شد (۲۰).

آزمایش ازدیاد حساسیت تأخیری(Delayed type hypersensitivity:DTH):

موش‌های BALB/c ماده ۸-۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور کرج تهیه شدند و به‌گروه‌های ۶ تایی تقسیم شدند. بر مبنای اصول نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی و مطابق با مصوبات کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران نگهداری شدند و در روزهای صفر، ۲۱ و ۴۲ مقدار ۱۰۰ میکروگرم از پلاسمیدها به‌صورت زیر جلدی تزریق شدند. دو هفته پس از آخرین تزریق، ۱۰ میکروگرم از پپتید اپی‌توپ موشی $E2_{405-414}$ یا مخلوط اپی‌توپ‌های $core_{35-44}$ و $E1_{363-372}$ یا پپتید E21C و یا پپتید غیر مرتبط به‌ناحیه کف پای موش‌ها تزریق شد. پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، تورم پای موش‌ها اندازه‌گیری شد. تفاوت اندازه آنها با تورم کف پای دیگر که در آن بافر (PBS) تزریق شده بود، مقایسه شد. میانگین تفاوت میزان تورم کف پای گروه‌های مختلف موشی با استفاده از آزمون‌های Non parametric Mann-Whitney و ANOVA ارزیابی شدند.

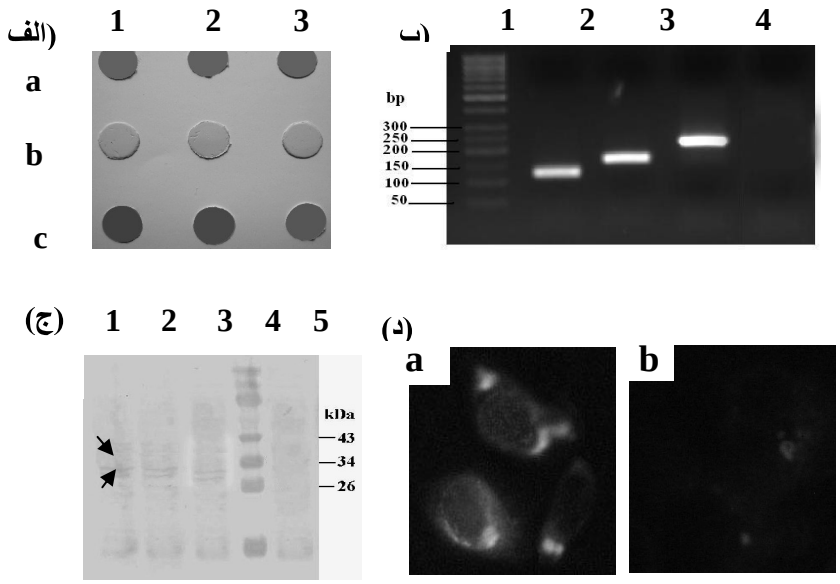
یافته‌ها:

ساخت سازه‌های پلاسمیدی:

ارزیابی‌های ایمونوانفورماتیک نشان داد که ترتیب قرارگیری اپی‌توپ‌ها به‌صورت $E2_{405-414}$، $E1_{363-372}$ و $core_{35-44}$ (E21C) بهترین حالت جهت پردازش پروتئازومی (Proteasomal processing) و حداقل احتمال ایجاد اپی‌توپ‌های جدید با میل ترکیبی (Affinity) زیاد را به‌دنبال خواهد داشت. با توجه به‌نتایج بدست آمده، یک واحد اسید آمینه آلانین به‌انتهای اپی‌توپ $E1_{363-372}$ افزوده شد تا پردازش (processing) مؤثری بر روی این اپی‌توپ انجام شود (شکل ۱-الف). ژن مولتی‌اپی‌توپ E21C پس از ساخت، به‌طور جداگانه و نیز به‌صورت متصل با توالی‌های PADRE، ERss و HBsAg در ناقل pcDNA3.1+ کلون شد و پنج سازه مجزای بدست آمده، مورد بررسی‌های بعدی قرار گرفت (شکل ۱-ب).

بررسی بیان ژن‌های مولتی‌اپی‌توپ:

بیان موقت (transient expression) پلاسمیدهای مولتی‌اپی‌توپ فاقد HBsAg به‌دلیل اندازه کوچک آنها (حدود ۴ کیلو دالتون)، با روش‌های دات بلات و RT-PCR بررسی شد. به‌منظور انجام دات بلات، پپتید E21C به‌خرگوش تزریق گردید و همگام با نتایج پیش بینی‌های ایمونوانفورماتیک، آنتی‌سرم پلی‌کلونال (Polyclonal antiserum) علیه آن تهیه شد (نتایج نشان داده نشده است). در آزمایش دات بلات، شدت رنگ لیزات سلول‌های ترانسفکت شده، قابل مقایسه با پپتید E21C لکه گذاری شده (به‌عنوان کنترل مثبت) بود که بیان پلاسمیدها را نشان می داد (شکل ۲-الف). همچنین حضور باندهای با اندازه‌های مورد انتظار در الکتروفورز محصولات RT-PCR بر روی RNA تخلیص شده از سلول‌های ترانسفکت شده، نشان دهنده نسخه‌برداری ژن‌های کد کننده مولتی اپی‌توپ‌ها بود (شکل ۲-ب).



شکل ۲: بیان پپتیدهای مولتی‌اپی‌توپ در رده سلولی COS-7. نسخه‌برداری و بیان پلاسمیدهای غیر متصل به HBsAg با استفاده از فناوری‌های دات بلات (الف) و RT-PCR (ب) ارزیابی شد.

الف) نقاط مشاهده شده مربوط به ۲۰ میکرولیتر لیزات سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمیدهای p21C، pP21C و pERP21C است (ردیف a، به‌ترتیب ستون‌های ۱، ۲ و ۳). در ردیف b نیز لیزات سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1+ به‌عنوان شاهد منفی مشاهده می‌شود.ردیف c مربوط به‌مقادیر ۱۰۰، ۲۰ و ۴ نانوگرم از پپتید E21C لکه‌گذاری شده به‌عنوان شاهد مثبت می‌باشد (ستون‌های ۱، ۲ و ۳). تکثیر mRNA سلول‌های ترانسفکت شده به‌روش RT-PCR، حضور باندهای الکتروفورزی ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۱۰ نوکلئوتیدی را نشان داد.

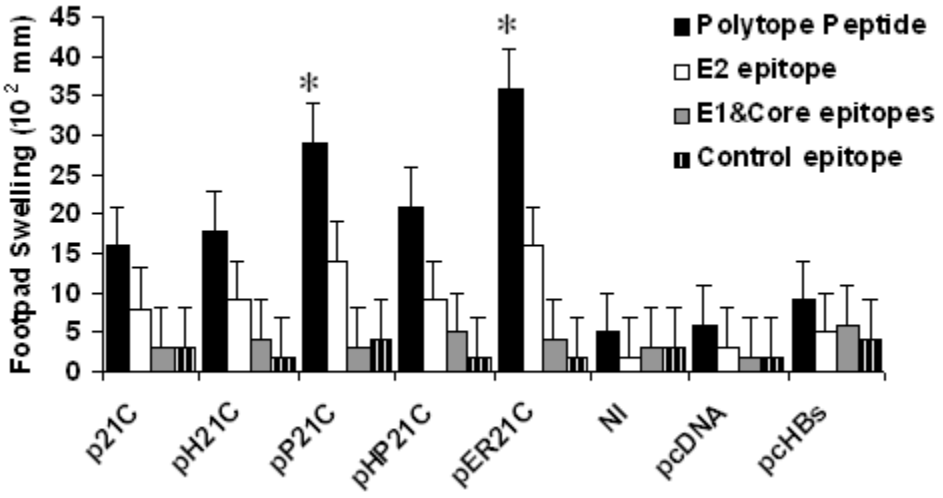
ب) (به‌ترتیب ستون‌های ۴-۲) که مربوط به‌نسخه‌برداری صحیح پلاسمیدهای p21C، pP21C و pERP21C می‌باشد. باند الکتروفورزی در سلول‌های ترانسفکت شده با pcDNA3.1+ (شاهد منفی) مشاهده نشد (ستون ۵).

آنالیز بیان ناقل‌های حاوی HBsAg به‌روش‌های وسترن بلات (ج) و ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (د) انجام شد. در ستون‌های ۱ و ۲ غشا بلات شده (ج)، باندهای دوبلت با وزن مولکولی ۳۰ و ۳۳ کیلو دالتون که با پیکان نمایش داده شده‌اند، به‌ترتیب مربوط به‌حضور اشکال گلیکوزیله و غیر گلیکوزیله HBsAg در پلاسمیدهای pH21C و pHP21C می‌باشند. در ستون ۳ باندهای ۲۷ و ۳۰ کیلو دالتونی مربوط به پلاسمید حاوی HBsAg به‌تنهایی (pcHBs) مشاهده می‌شود. سلول‌های ترانسفکت شده با پلاسمید بدون قطعه pcDNA3.1+ به‌عنوان شاهد منفی در وسترن بلات (ستون ۵ در شکل ج) و ایمونوفلورسانس (b در شکل د) استفاده شدند

بیان سازه‌های متصل به HBsAg به‌واسطه در دسترس بودن آنتی‌بادی مونوکلونال علیه HBsAg با دو روش وسترن بلات و ایمونوفلورسانس ارزیابی شد. در آزمایش وسترن بلات دو باند با تفاوت ۳ کیلو دالتون مشاهده شد. طبق گزارشات قبلی وجود دو باند نزدیک به هم می‌تواند به‌دلیل گلیکوزیلاسیون (Glycosylation) نسبی HBsAg و کنار هم قرار گرفتن باندهای مربوط به-پروتئین‌های گلیکوزیله و غیر گلیکوزیله باشد (۲۱). این الگو علاوه بر ناقل کنترل که فقط HBsAg را بیان می‌کند، در ناقل‌های کد کننده مولتی اپی‌توپ‌های متصل به HBsAg نیز مشاهده گردید (شکل ۲-ج). همچنین نتایج آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم، تایید دیگری بر بیان پلاسمیدهای حاوی HBsAg بود (شکل ۲-د).

ایمنی زائی سازه‌های مولتی‌اپی‌توپ:

پس از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از زمان تزریق پپتید صناعی E21C یا پپتید اپی‌توپی $E2_{405-414}$ یا مخلوط اپی‌توپ‌های $core_{35-44}$ و $E1_{363-372}$، تورم کف پای موش‌ها اندازه‌گیری شد. این اندازه با تورم پای شاهد مقایسه گردید. نتایج نشان داد که تورم در پای تزریق شده با پپتیدهای E21C و اپی‌توپی $E2_{405-414}$ به‌طور معنی‌دار بیشتر از پای تزریق شده با پپتید شاهد یا اپی‌توپ‌های وابسته به HLA انسانی ($core_{35-44}$ و $E1_{363-372}$) بود (نمودار۱، $p<0.05$). همچنین در مقایسه با گروه های شاهد (گروه های تزریق شده با +pcDNA3.1 و pcHBs)، پاسخ در گروه های تزریق شده با پلاسمیدهای مولتی‌اپی‌توپ به‌طور معنی‌دار بالاتر بود (نمودار۱، $p<0.05$). افزوده شدن اپی‌توپ کمکی PADRE و همچنین اتصال ERss به‌توالی مولتی‌اپی‌توپی، افزایش معنی‌داری در میزان تورم در موش‌های تزریق شده با پلاسمیدهای مرتبط ایجاد نمود ($p<0.05$). این در حالیست که اتصال HBsAg تفاوت محسوسی در پاسخ DTH ایجاد نکرد (نمودار۱). در نهایت تورم ایجاد شده نسبت به اپی‌توپ $E2_{405-414}$ در موش‌های واکسینه با پپتید E21C به‌طور معنی‌دار بیشتر از موش‌های واکسینه با پپتید اپی‌توپی $E2_{405-414}$ بود($p<0.05$).



نمودار ۱: آنالیز پاسخ DTH. دو هفته پس از آخرین تزریق DNA، گروه های موشی BALB/c با ۱۰ میکروگرم از پپتید E21C یا پپتید اپی‌توپی مخصوص موشی (E2 epitope) یا مخلوط اپی‌توپ‌های اختصاصی انسانی (E1&Core epitopes) در ناحیه کف پا تزریق شدند. یک اپی‌توپ از ویروس HIV نیز به‌عنوان اپی‌توپ شاهد منفی (control epitope) بکار گرفته شد. همچنین گروه‌های موشی غیر ایمن (NI) و گروه‌های تزریق شده با pcHBs و +pcDNA3.1 به‌عنوان گروه‌های شاهد منفی در نظر گرفته شدند. تورم کف پای موش‌ها در هفتاد و دومین ساعت پس از تزریق پپتید، به حداکثر رسید. نتایج نمایش داده شده مربوط به میانگین تورم پای شش موش در هر گروه پس از ۷۲ ساعت از زمان تزریق است. تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) بین گروه‌های آزمایش و شاهد منفی با استفاده از آزمون ناپارامتری Mann-Whitney تعیین شده و با علامت * نشان داده شده است.

بحث:

در مطالعه حاضر، پلاسمیدهای یوکاریوتی حاوی کاست بیانی (Expression cassette) مولتی‌اپی‌توپی پس از بررسی‌های ایمونوانفورماتیک با موفقیت ساخته شد و در سلول‌های یوکاریوتی بیان گردید. بررسی ایمنی‌زایی این ناقل‌ها در موش‌های BALB/c به‌روش DTH نشان داد که افزودن توالی‌های کمکی مانند PADRE و ERss توانایی تقویت پاسخ ایمنی را دارد.

جهت ساخت سازه‌های ژنی، یک اپی‌توپ محدود به MHC موشی ($H2\text{-}D^d$) از ناحیه E2 ویروس هپاتیت C ($E2_{405\text{-}414}$) و دو اپی‌توپ محدود به HLA انسانی از نواحی E1 و core ویروس ($core_{35\text{-}44}$ و $E1_{363\text{-}372}$) بر مبنای پایداری (conservancy) آنها در بین ژنوتیپ‌های مقاوم‌تر به‌درمان، یعنی ژنوتیپ‌های 1a، 1b و 4 ،انتخاب شدند. عامل دیگری که در انتخاب اپی‌توپ‌های محدود به HLA-A*0201 نقش داشت، تحت غالب (subdominant) بودن آنها در آنتی‌ژن طبیعی بود (۲۲). بر اساس برخی از مطالعات انجام شده، پاسخ نسبت به اپی‌توپ‌های تحت غالب می‌تواند پاسخ ایمنی ناکارآمد در مقابل اپی‌توپ‌های غالب را جبران نماید. این وضعیت به‌خصوص در مورد بیماری‌های مزمن عفونی مانند هپاتیت C که پاسخ سلول های CTL نسبت به اپی‌توپ‌های غالب دچار تحمل (Tolerance) می‌گردد یا حذف می‌شود، مصداق بیشتری می‌یابد (۲۳). انتخاب اپی‌توپ محدود به $H2\text{-}D^d$ نیز جهت ارزیابی‌های اولیه پاسخ ایمنی در موش‌های BALB/c، قبل از بررسی بر روی موش‌های گران قیمت تراریخته، صورت گرفت. بر این اساس این سه اپی‌توپ در تمام اشکال ممکن به‌دنبال یکدیگر قرار داده شد. سپس بررسی‌های ایمونوانفورماتیک انجام گرفت تا بهترین حالت جهت برش پروتئازومی، پیش‌بینی شده و احتمال ایجاد اپی‌توپ جدید (neoepitope) با میل ترکیبی زیاد که ناشی از کنار هم قرار گرفتن اپی‌توپ‌ها می‌باشد، به‌حداقل برسد (۱۳, ۱۴) و در نهایت توالی E21C به‌عنوان بهترین حالت تعیین شد.

یک عامل مهم که گاهی در طراحی واکسن‌های مولتی اپی‌توپ محل اختلاف می‌باشد، گنجاندن اپی‌توپ‌های کمکی ویژه سلول‌های $T\ CD4^+$ در مولتی‌اپی‌توپ‌های وابسته به CTL است. بر این اساس اپی‌توپ PADRE در سه سازه از پنج سازه‌ی ساخته شده، بکار رفت تا اثر آن بر روی پاسخ ایمنی، نسبت به اپی‌توپ‌های CTL، ارزیابی شود. این اپی‌توپ قادر است با میل ترکیبی بالایی به‌محدوده وسیعی از هاپلوتایپ‌های MHC II (MHCII Haplotypes)) انسانی و موشی متصل گردد(۸). در این مطالعه از HBsAg نیز به‌عنوان منبع دیگری از اپی‌توپ‌های کمکی $T\ CD4^+$ استفاده شد که می‌تواند با ایجاد ذرات کایمریک (Chimeric)، به‌افزایش پاسخ ایمنی کمک کند (۲۴). همچنین احتمال افزایش پاسخ سلول‌های CTL نسبت به اپی‌توپ‌ها با گنجاندن توالی سیگنال رتیکولوم آندوپلاسمیک (Endoplasmic Reticulum Signal) در انتهای '۵ یکی از سازه‌ها ارزیابی شد. اتصال این توالی، پردازش اپی‌توپ‌های ویژه CTL را در شبکه آندوپلاسمیک افزایش می‌دهد (۸, ۱۰).

نکته قابل بحث در مورد ارزیابی بیان سازه‌های مولتی‌اپی‌توپ در این پژوهش، حضور باند دو گانه (doublet) در ناقل‌های حاوی HBsAg در آزمایش وسترن بلات می‌باشد. بر اساس مطالعات قبلی، بیان HBsAg در سلول‌های یوکاریوت منجربه گلیکوزیلاسیون نسبی (partial glycosylation) این آنتی‌ژن می‌شود و یک پروتئین و یک گلیکوپروتئین با تفاوت وزن مولکولی ۳ کیلو دالتون ایجاد می‌کند(۲۵). حضور این باند دوگانه در سازه‌های حاوی مولتی‌اپی‌توپ متصل به HBsAg، نشان دهنده عدم اخلال در تغییرات پس از ترجمه این پروتئین و گلیکوزیلاسیون آن پس از اتصال اپی‌توپ‌های خارجی است.

اغلب روش‌های بررسی پاسخ سلول‌های T، منجمله الیزپات (ELISPOT)، سایتوکاین فلوسیتومتری (Cytokine flowcytometry) و بررسی سیتوتوکسیسیته ، در خارج از محیط واقعی بدن انجام می‌شود که تفسیر آنها نیازمند دقت بالایی است (۲۶). در مقابل، آزمایش DTH به‌صورت *in vivo* انجام شد که می‌تواند به‌عنوان یک تست اولیه مقرون به‌صرفه مورد

استفاده قرار گیرد (۲۷). پاسخ مثبت DTH در موش‌های واکسینه با DNA نشاندهنده پردازش و عرضه اپی‌توپ $E2_{405-414}$ و توانایی آن در تحریک پاسخ ایمنی سلولی است. همچنین ایجاد پاسخ در موش‌های واکسینه با سازه‌های حاوی مولتی‌اپی‌توپ، برخلاف گروه‌های تزریق شده با پلاسمیدهای کنترل (pcDNA3.1+ و pcHBs) یا موش‌های ایمن نشده، اختصاصی بودن پاسخ DTH را نشان می‌دهد.

افزودن اپی‌توپ PADRE در برخی مطالعات، تاثیر اندکی بر افزایش پاسخ نسبت به اپی‌توپ‌های CTL داشته است (۲۸). در این مطالعه، اتصال PADRE به توالی مولتی‌اپی‌توپ، افزایش معنی‌داری در میزان پاسخ DTH ایجاد نمود. این یافته مطابق با برخی نتایج مبنی بر اثر افزایشی این اپی‌توپ بر روی پاسخ به اپی‌توپ‌های CTL است (۸). به‌علاوه، اتصال ERss به انتهای '۵ توالی مولتی‌اپی‌توپ که اپی‌توپ‌های CTL را از مسیر غیر وابسته به TAP (TAP-independent) وارد شبکه اندوپلاسمیک می‌کند (۲۹)، نیز باعث افزایش معنی‌داری در میزان پاسخ DTH شد. این یافته نیز با نتایج برخی مطالعات دیگر مطابقت دارد(۲۹).

در مطالعه حاضر، بر خلاف انتظار و گزارشات قبلی (۹, ۲۴)، اتصال HBsAg به‌توالی مولتی‌اپی‌توپ، افزایش قابل مشاهده‌ای در پاسخ ایمنی نسبت به اپی‌توپ $E2_{405-414}$ ایجاد ننمود. در توجیه این یافته می‌توان به‌رقابت احتمالی اپی‌توپ‌های غالب HBsAg با اپی‌توپ $E2_{405-414}$ جهت عرضه به مولکول‌های MHC I اشاره نمود. این نوع رقابت که از طریق کاهش موثر پاسخ کلی به آنتی‌ژن، واکنش سلول‌های T را تغییر می‌دهد، می‌تواند ایمنی‌زایی اپی‌توپ را مهار نماید (۳۰, ۳۱).

پاسخ DTH علیه اپی‌توپ $E2_{405-414}$ در موش‌های تحریک شده با پپتید E21C به‌طور معنی‌دار بالاتر از موش‌های تحریک شده با اپی‌توپ $E2_{405-414}$ است. این حالت می‌تواند به‌دلیل اندوسیتوز، پردازش و عرضه پپتید E21C توسط سلول‌های حرفه‌ای عرضه کننده آنتی‌ژن باشد. این در حالیست که اپی‌توپ‌های تکی (minimal) CTL مستقیماً به مولکول‌های MHC I متصل شده و منجر به‌ایجاد تحمل (Tolerance) می‌شوند (۳۲). این تحمل ناشی از اتصال اپی‌توپ‌ها به MHC I سلول‌های غیر حرفه‌ای عرضه کننده آنتی‌ژن است که مولکول‌های کمکی (co-stimulatory) مناسبی بیان نمی‌کنند (۳۳). همچنین اپی‌توپ‌های کوچک در مقایسه با پپتیدهای بزرگتر، نیمه عمر کمتری در سطح سلول‌ها دارند، که می‌تواند دلیل دیگری بر ایمنی‌زایی کمتر آنها باشد (۳۴).

نتیجه گیری:

میزان جهش زیاد ژن‌های ویروس هپاتیت C، استفاده از نواحی پایدار (conserved) ژنوم ویروس جهت ساخت واکسن را به یکی از زمینه‌های فعال تحقیقاتی مبدل نموده‌است. در این راستا، استفاده از روش‌های گوناگون در بکارگیری این نواحی ژنومیک (Genomic regions) مدنظر قرار گرفته است. در پژوهش حاضر نیز جهت دستیابی به‌شرایط بهینه ایمنی زایی اپی‌توپ‌های HCV، چندین سازه ژنی پس از بررسی‌های *in silico*، ساخته شد و بیان آنها به‌صورت *in vitro* نشان داده شد. در نهایت پاسخ ایمنی اولیه به‌صورت *in vivo* با استفاده از آزمون DTH در موش‌های BALB/c ارزیابی گردید. همچنین اتصال اپی‌توپ PADRE و توالی ERss به اپی‌توپ‌ها، ایمنی سلولی نسبت به اپی‌توپ تحت بررسی را به‌طور معنی‌دار بهبود بخشید.

به‌دنبال نتایج این مطالعه، مطالعات بعدی به‌منظور بررسی ایمنی‌زائی اپی‌توپ‌های تحت غالب $E1_{363-372}$ و $core_{35-44}$ در موش‌های تراریخته ترانس ژنیک HLA-A2 و با استفاده از روش‌های دقیق‌تر بررسی پاسخ ایمنی، در حال انجام می‌باشد.

تقدیر و تشکر:

کلیه هزینه‌های این پژوهش از سوی انستیتو پاستور ایران تامین شده است.

فهرست منابع:

1.Lang K and Weiner DB. Immunotherapy for hcv infection: Next steps. *Expert Rev Vaccines* 2008; **7**(7):915-23.

2.Ishii S and Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis c virus. *Clin Immunol* 2008; **128**(2):133-47.

3.Arvin AM and Greenberg HB. New viral vaccines. *Virology* 2006; **344**(1):240-9.

4.Nagata T, Aoshi T, Uchijima M, Suzuki M and Koide Y. Cytotoxic t-lymphocyte-, and helper t-lymphocyte-oriented DNA vaccination. DNA *Cell Biol* 2004; **23**(2):93-106.

5.Martin P, Simon B, Lone YC, Chatel L, Barry R, Inchauspe G, *et al*. A vector-based minigene vaccine approach results in strong induction of t-cell responses specific of hepatitis c virus. *Vaccine* 2008; **26**(20):2471-81.

6.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** (3-4):271-6.

7.Suhrbier A. Polytope vaccines for the codelivery of multiple cd8 t-cell epitopes. *Expert Rev Vaccines* 13-207:(2)1;2002.

8.Doan T, Herd K, Ramshaw I, Thomson S and Tindle RW. A polytope DNA vaccine elicits multiple effector and memory ctl responses and protects against human papillomavirus 16 e7-expressing tumour. *Cancer Immunol Immunother* 2005; **54**(2):157-71.

9.Woo WP, Doan T, Herd KA, Netter HJ , Tindle RW. Hepatitis b surface antigen vector delivers protective cytotoxic t-lymphocyte responses to disease-relevant foreign epitopes. *J Virol* 2006; **80**(8):3975-84.

10.Shi L, Liu S, Fan GX, Sheng L, Ren HX, Yuan YK. Effective induction of type 1 cytotoxic t cell responses in mice with DNA vaccine encoding two hepatitis c virus cytotoxic t lymphocyte epitopes. *Viral Immuno*l 2006; **19**(4):702-11.

11.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**(2):822-6.

12.Thomson SA, Sherritt MA, Medveczky J, Elliott SL, Moss DJ, Fernando GJ, *et al.* Delivery of multiple cd8 cytotoxic t cell epitopes by DNA vaccination. *J Immunol* 1998; **160**(4):1717-23.

13..esmir C, Nussbaum AK, Schild H, Detours V , Brunak S. Prediction of proteasome cleavage motifs by neural networks. *Protein Eng* 2002; **15**(4):287-96.

14.Nussbaum AK, Kuttler C, Hadeler KP, Rammensee HG , Schild H. Paproc: A prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the www. Immunogenetics 2001; **53**(2):87-94.

15.Parker KC, Bednarek MA , Coligan JE. Scheme for ranking potential hla-a2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* 1994; **152**(1):163-75.

16.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):10991-1001.

17.Carter J. *Production of anti-peptide antisera*. New York: John Wiley & Sons Inc. 2003; 9.3.1-9.3.16

18.Loi PK, McGraw HF , Tublitz NJ. Peptide detection in single cells using a dot immunoblot assay. *Peptides* 1997; **18**(5):749-53.

19.Towbin H, Staehelin T , Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.

Proc Natl Acad Sci U S A 1979; **76**(9):4350-4.

20.Inada T , Yamazaki S. Replication of lactate dehydrogenase-elevating virus in cells infected with murine leukaemia viruses in vitro. *J Gen Virol* 1991; **72 (Pt 10)** 2437-44.

21.Hui J, Mancini M, Li G, Wang Y, Tiollais P , Michel ML. Immunization with a plasmid encoding a modified hepatitis b surface antigen carrying the receptor binding site for hepatocytes. *Vaccine* 1999; **17**(13-14):1711-8.

22.Himoudi N, Abraham JD, Fournillier A, Lone YC, Joubert A, Op De Beeck A, *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):12735-46.

23.Chen Y, Webster RG , Woodland DL. Induction of cd8+ t cell responses to dominant and subdominant epitopes and protective immunity to sendai virus infection by DNA vaccination. *J Immunol* 1998; **160**(5):2425-32.

24.Puaux AL, Marsac D, Prost S, Singh MK, Earl P, Moss B, *et al*. Efficient priming of simian/human immunodeficiency virus (shiv)-specific t-cell responses with DNA encoding hybrid shiv/hepatitis b surface antigen particles. *Vaccine* 2004; **22**(27-28):3535-45.

25.Jin J, Yang JY, Liu J, Kong YY, Wang Y , Li GD. DNA immunization with fusion genes encoding different regions of hepatitis c virus e2 fused to the gene for hepatitis b surface antigen elicits immune responses to both hcv and hbv. *World J Gastroenterol* 2002; **8**(3):505-10.

26.Whiteside TL, Zhao Y, Tsukishiro T, Elder EM, Gooding W , Baar J. Enzyme-linked immunospot, cytokine flow cytometry ,and tetramers in the detection of t-cell responses to a dendritic cell-based multipeptide vaccine in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; **9**(2):641-9.

27.Luo Y and Dorf ME. Delayed-type hypersensitivity. In: Ausubel FM, Brent E, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K, editors. *Current protocols in immunology*. New York: John Wiley & Sons Inc. 1993;PP: 451.

28.Velders MP, Weijzen S, Eiben GL, Elmishad AG, Kloetzel PM, Higgins T, *et al*. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J Immunol* 2001; **166**(9):5366-73.

29.Xu W, Chu Y, Zhang R, Xu H, Wang Y , Xiong S. Endoplasmic reticulum targeting sequence enhances hbv-specific cytotoxic t lymphocytes induced by a ctl epitope-based DNA vaccine. *Virology* 2005; **334**(2):255-63.

30.Chengalvala MV, Bhat RA, Bhat BM, Vernon SK , Lubeck MD. Enhanced immunogenicity of hepatitis b surface antigen by insertion of a helper t cell epitope from tetanus toxoid. *Vaccine* 1999; **17** : 1035-41.

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

32.Zwaveling S, Ferreira Mota SC, Nouta J, Johnson M, Lipford GB, Offringa R, *et al*. Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 2002; **169**(1):350-8.

33.Toes RE, van der Voort EI, Schoenberger SP, Drijfhout JW, van Bloois L, Storm G, *et al*. Enhancement of tumor outgrowth through ctl tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells. *J Immunol* 1998; **160**(9):4449-56.

34.Lanzavecchia A and Sallusto F. Antigen decoding by t lymphocytes: From synapses to fate determination. *Nat Immunol* 2001; **2**(6):487-92.