



## Immunological Evaluation of HIV-1 VLP Harboring <sup>MPER-V3</sup> in BALB/c Mice Model

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original Research

#### Authors

Tohidi F.<sup>1</sup> MSc,  
Sadat S.M.\* PhD,  
Bolhassani A.<sup>2</sup> PhD,  
Yaghobi R.<sup>3</sup> PhD

#### How to cite this article

Tohidi F, Sadat S M, Bolhassani A, Yaghobi R. Immunological Evaluation of HIV-1 VLP Harboring <sup>MPER-V3</sup> in BALB/c Mice Model. Pathobiology Research. 2018;21(2):95-100.

\*Hepatitis & AIDS and Blood- borne viruses, Pasteur Institute, Tehran, Iran

<sup>1</sup>Microbiology Department, Science Agriculture & Modern Technology Faculty, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

<sup>2</sup>Hepatitis & AIDS and Blood- borne viruses, Pasteur Institute, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Shiraz Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

#### Correspondence

Address: Hepatitis & AIDS and Blood- borne viruses, Pasteur Institute, Pasteur Street, Tehran, Iran.  
Postal Code: 1316943551  
Phone: +98 (21) 66969291  
Fax: +98 (21) 66969291  
mehdi\_sadat@pasteur.ac.ir

#### Article History

Received: December 18, 2017  
Accepted: January 14, 2018  
ePublished: July 5, 2018

### ABSTRACT

**Aims** Developing an effective vaccine against Human Immunodeficiency Virus (HIV) is necessary. The aim of this study was the immunological evaluation of HIV-1 VLP harboring <sup>MPER-V3</sup> in BALB/c mice model.

**Materials & Methods** In the present experimental research, presenting 40 female mice, which were between 6 and 8 weeks old, were used for immunization with VLP <sup>MPER-V3</sup>. The mice were divided into 8 groups and in each group, 5 mice were considered. Injections were performed three times at three weeks intervals and subcutaneously in a volume of 100µl per mouse. Two weeks after last injection, mouse blood samples were collected by retro-orbital bleeding and immune responses were evaluated in serum for levels of total IgG and splenocytes for cytokine assay, using ELISA method. The data analysis was performed, using Mann-Whitney test and one-way analysis of variance.

**Findings** The level of total antibody production was very high in all groups that had VLP alone or with adjuvant immunity, having a significant difference with the control group (p<0.05). IgG1 was the predominant isotype (Th2-biased response) in groups that had VLP injections alone or with adjuvant.

**Conclusion** VLPs can stimulate the humoral immune system in mice immunized with these particles alone or formulated with adjuvant. Also, the level of production of IL-5 in the presence of the vaccine candidate as VLP increased significantly.

**Keywords** Vaccine; Nano-precipitation; VLP; HIV1-; Immunization; BALB/c

### CITATION LINKS

[1] Fact sheet-Latest statistics on the status of the AIDS epidemic [2] Virus-like particle (VLP) lymphatic trafficking and immune response generation after immunization by different routes [3] Developments in virus-like particle-based vaccines for HIV [4] Construction and production of HIV-VLP harboring MPER-V3 for potential vaccine study [5] The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: Dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design [6] Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody [7] Development and immunological assessment of VLP-based immunogens exposing the membrane-proximal region of the HIV-1 gp41 protein [8] Broadly neutralizing antibodies against HIV-1: Templates for a vaccine [9] Immunological evaluation of recombinant HIV1 virions with novel adjuvants in BALB/c mice model [10] Prime/boost immunization with HIV-1 MPER-V3 fusion construct enhances humoral and cellular immune responses [11] Current status of human immunodeficiency virus vaccines [12] Distribution of trace elements in liver and muscle of Japanese quails [13] Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies [14] Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only [15] Immunogenicity of a new HIV-1 DNA construct in a BALB/c mouse model [16] Clustered epitopes within a new poly-epitopic HIV-1 DNA vaccine shows immunogenicity in BALB/c mice [17] Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens [18] MPER-specific antibodies induce gp120 shedding and irreversibly neutralize HIV-1 [19] Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 mediated by plasma antibodies against the gp41 membrane proximal external region [20] Immunogenicity of virus-like particles containing modified human immunodeficiency virus envelope proteins [21] HIV-1 vaccine immunogen design strategies [22] Cloning, expression and purification of a novel multi-epitopic HIV-1 vaccine candidate [23] A Universal virus-like particle-based vaccine for human papillomavirus: Longevity of protection and role of endogenous and exogenous adjuvants [24] A DNA vaccine prime followed by a liposome-encapsulated protein boost confers enhanced mucosal immune responses and protection

## ارزیابی ایمنی‌زایی کاندید واکسن VLP MPER-V3 و ویروس HIV-1 در مدل موشی BALB/c

### فاطمه توحیدی MSc

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم کشاورزی و تکنولوژی‌های مدرن، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

### سیدمهدی سادات PhD\*

بخش هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران

### اعظم بوالحسنی PhD

بخش هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور، تهران، ایران

### رامین یعقوبی PhD

مرکز تحقیقات پیوند اعضا شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

### چکیده

**اهداف:** توسعه یک واکسن موثر علیه عفونت HIV امری ضروری محسوب می‌شود. هدف مطالعه حاضر، بررسی ایمنی‌زایی ذرات شبه‌ویروسی در مدل موشی BALB/c به‌منظور القای پاسخ ایمنی هومورال و دست‌یابی به آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده بود.

**مواد و روش‌ها:** در پژوهش تجربی حاضر، به‌منظور ایمنی‌زایی به‌واسطه VLP MPER-V3 از ۴۰ سر موش ماده ۸-۶ هفته‌ای استفاده شد. موش‌ها به ۸ گروه مختلف تقسیم شدند و در هر گروه ۵ سر موش در نظر گرفته شد و تزریق‌ها سه‌بار با فاصله سه هفته و به‌صورت زیرجلدی و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به ازای هر موش صورت گرفت. دو هفته پس از آخرین تزریق، خون‌گیری از سینوس چشمی موش‌ها انجام شد و پاسخ‌های ایمنی در سرم برای تعیین سطح Total IgG و سلول‌های طحال موشی به‌منظور سنجش سایتوکاین، با استفاده از روش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفتند. تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون‌های من‌ویتنی و تحلیل واریانس یک‌طرفه صورت گرفت.

**یافته‌ها:** سطح تولید آنتی‌بادی توتال در تمامی گروه‌هایی که VLP به‌تنهایی یا به‌همراه ادجوانت ایمن شده بودند بسیار بالا بود و اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشت ( $p < 0.05$ ). ایزوتایپ غالب در گروه‌هایی که تزریق VLP به‌تنهایی یا با ادجوانت داشتند از نوع IgG1 (شاخص تحریک پاسخ Th2) بود. **نتیجه‌گیری:** ذرات شبه‌ویروسی تولیدشده می‌توانند سیستم ایمنی هومورال را در موش‌های ایمن شده با این ذرات به‌تنهایی یا فرموله‌شده با ادجوانت تحریک کنند. همچنین سطح تولید IL-5 در حضور کاندید واکسن به‌صورت VLP، بسیار افزایش یافت.

**کلیدواژه‌ها:** واکسن، ذرات شبه‌ویروس، HIV-1، ایمنی‌زایی، BALB/c

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۴

\*نویسنده مسئول: mehdi\_sadat@pasteur.ac.ir

### مقدمه

یکی از چالش‌های دنیای امروز و یکی از اولویت‌های بهداشت جهانی، مبارزه با اپیدمی بیماری ایدز است. طبق گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی به‌طور میانگین در سراسر جهان ۳۶/۷ میلیون نفر آلوده به ویروس HIV هستند که این میزان نسبت به سال‌های گذشته افزایش داشته است [1]. امروزه این بیماری چهارمین عامل مرگ‌ومیر در انسان‌ها گزارش شده است، لذا واکسیناسیون بهترین راه مبارزه با این بیماری و جلوگیری از شیوع و همه‌گیری آن است.

علاوه بر این، روش‌های درمانی با استفاده از داروهای ضدویروسی، هزینه‌های بسیار سنگینی را به‌دلیل گران‌بودن و استفاده طولانی‌مدت این داروها (از زمان تشخیص این بیماری تا آخر عمر) بر دوش افراد مبتلا و در نهایت جامعه تحمیل خواهند کرد [1]. به نظر می‌رسد برای دست‌یابی به پاسخی موثر در طراحی واکسن

HIV-1 باید به‌ویژه به دنبال راهی برای القای موثر ایمنی هومورال بود و در این مسیر بحث آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده وسیع‌الطیف بسیار مهم است.

یکی از مناسب‌ترین و جدیدترین انواع کاندید واکسن در تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی، استفاده از ذرات شبه‌ویروسی (VLP) است. ذرات شبه‌ویروسی، ذرات غیرعفونی و حاوی پروتئین‌های ساختاری و فاقد نوکلئیک‌اسید ویروس هستند. ساختار آنتی‌ژنیک آنها باعث می‌شود پاسخ‌های قوی T-helper و CTL (Cytotoxic T lymphocyte) را بدون نیاز به ادجوانت القا کنند [2]. واکسن‌های VLP نسبت به تمام واکسن‌های ویروسی و واکسن‌های زیرواحدی نو ترکیب مزیت دارند، زیرا امن‌تر، ایمن‌تر و دارای قابلیت محافظتی بیشتر و عدم سمیت سلولی هستند [3].

استفاده از اپی‌توپ‌های مناسب و ایمنی‌زا به‌عنوان هدف اصلی در اتصال به آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده نیز نقش تعیین‌کننده‌ای دارد. در مطالعه قبلی، VLP حاوی توالی V3 و MPER به‌عنوان اهداف آنتی‌ژنیک برای القای آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده، طراحی و سنتز شده‌اند [4]. این نواحی از انولوپ ویروسی، نواحی محافظت‌شده بوده و قابلیت تحریک بیشتری را در کاندید واکسن مورد نظر ایجاد خواهند نمود.

لوپ V3، تعیین‌کننده اصلی در اتصال به کورسپتور است. V3 بین CCR5 و CXCR4 ویروس جابه‌جا می‌شود و می‌تواند در تروپیزم HIV-1 به سلول میزبان نقش داشته باشد [5]. همچنین، Gp41 زیرواحد ناقل غشایی (ترانس ممبران) در پروتئین Env است که باعث لنگراندازی پروتئین Env روی سطح غشای لیپیدی ویروس می‌شود. این ناحیه از توالی محافظت‌شده‌ای تشکیل شده که در تمام گونه‌ها و ساب‌تایپ‌های این ویروس ثابت مانده است [6, 7].

در عفونت حاد HIV-1 پاسخ‌های قوی علیه هر دو ناحیه gp120 و gp120 از پروتئین Env تولید می‌شود. طی این پاسخ‌ها، آنتی‌بادی‌هایی علیه نواحی محافظت‌شده پروتئین Env تولید و ترشح می‌شوند که قادرند ویروس‌های هترولوگ، از ساب‌تایپ‌های مختلف یا از گروه‌های متفاوت را خنثی کنند [8]. با توجه به ساخت و تایید ذرات شبه‌ویروسی حاوی آنتی‌ژن‌های MPER-V3 [4]، هدف مطالعه حاضر، بررسی ایمنی‌زایی این ذرات شبه‌ویروسی در مدل موشی BALB/c به‌منظور القای پاسخ ایمنی هومورال و دست‌یابی به آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده بود.

### مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، به‌منظور ایمنی‌زایی به‌واسطه VLP MPER-V3 از ۴۰ سر موش ماده ۸-۶ هفته‌ای با میانگین وزنی ۲۰ گرم استفاده شد. موش‌ها به ۸ گروه مختلف تقسیم شدند و در هر گروه ۵ سر موش در نظر گرفته شد و تزریق‌ها سه‌بار با فاصله سه هفته و به‌صورت زیرجلدی و در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر به ازای هر موش صورت گرفت (جدول ۱).

در برنامه ایمنی‌زایی به ازای هر موش، ۱۰ میکروگرم VLP و ۱۰۰ میکروگرم DNA تزریق شد. همچنین برای آماده‌سازی آنتی‌ژن با مخلوط ادجوانت‌ها (فروند و مانتانید ۵۰) نسبت ۱:۱ مورد استفاده قرار گرفت و با ورتکس نمودن مخلوط ادجوانت با آنتی‌ژن مخلوط و همگن‌سازی شد. دو هفته پس از آخرین تزریق، خون‌گیری از سینوس چشمی انجام شد و سرم موش‌ها قبل از آزمون نهایی در

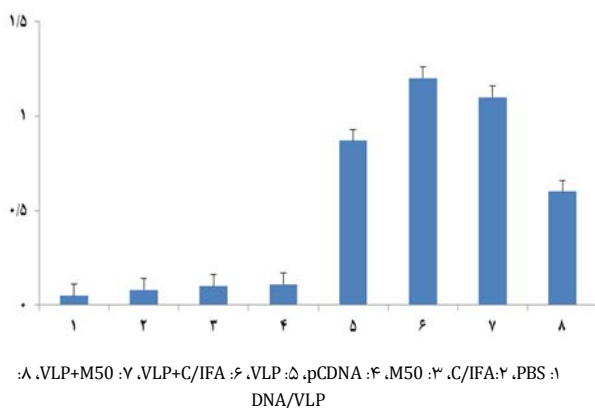
Tetramethylbenzidine) و ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 N) واکنش متوقف و قرائت جذب نوری هر نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر به وسیله الیزا ریدر انجام شد.

به منظور تعیین ساب‌کلاس‌های IgG همانند آزمون قبلی، سرم موشی در رقت معین (رقتی که میزان جذب نوری در الیزا با طول موج ۴۵۰ نانومتر برای آنالیز Total IgG به میزان ۰/۵ بوده است، انتخاب شد) افزوده و پس از شست‌وشو به هر چاهک به ترتیب آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG1، IgG2a، IgG2b و IgG3 و پس از آن آنتی‌بادی Anti-Goat Total IgG HRP براساس پروتکل کیت مربوطه (سیگما؛ ایالات متحده) افزوده شد. در نهایت قرائت هر چاهک بر اساس جذب نوری هر نمونه در طول موج ۴۵۰ نانومتر به وسیله الیزا ریدر صورت گرفت.

به منظور سنجش سایتوکاین‌های اینترلوکین ۵ (IL-5) و اینترفرون گاما (IFN-γ)، سلول‌های طحال موش‌ها به صورت مجزا در پلیت‌های کشت سلولی ۲۴ خانه‌ای به تعداد ۲×۱۰<sup>۶</sup> در یک میلی‌لیتر محیط RPMI-1640 کامل کشت داده شده و سلول‌ها با استفاده از پپتیدهای MPER و V3 با غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در دمای ۳۷°C و در حضور ۵٪ CO<sub>2</sub> به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شدند. سپس سوپ رویی کشت سلول‌ها جمع‌آوری و با استفاده از کیت‌های IFN-γ و IL-5 موشی (شرکت R&D؛ ایالات متحده) و براساس پروتکل شرکت سازنده سنجش شدند. موش‌ها براساس آیین‌نامه اخلاق کار با حیوانات و پس از تایید در کمیته اخلاق پزشکی انستیتو پاستور ایران (شناسه IR.PIL.REC.1394.18) نگهداری و آزمایش شدند. کلیه آزمون‌ها به صورت تکرار سه‌تایی انجام شدند. تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون‌های من‌ویتنی و تحلیل واریانس یک‌طرفه صورت گرفت.

### یافته‌ها

در بررسی ایمنی هومورال با تعیین میزان تولید Total Ab و ایزوتوپ‌های IgG، سطح تولید آنتی‌بادی توتال در تمامی گروه‌هایی که VLP به تنهایی یا به همراه ادجوانت ایمن شده بود، بسیار بالا بود و اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشت (p<۰/۰۵)؛ نمودارهای ۱ و ۲). بیشترین سطح اختلاف در نمودار مربوط به تزریق VLP+C/IFA و پس از آن تزریق VLP+M50 بود و در مورد VLP به صورت تنها نیز تحریک بالایی مشاهده شد (نمودار ۱).



**نمودار ۱)** میزان جذب نوری نمونه‌های سرمی به دست آمده از موش‌های واکسینه‌شده با فرمولاسیون‌های متفاوت واکسن‌های کاندید در ۴۵۰ نانومتر، به عنوان معیاری از سطح سرمی Total antibody. گروه‌های دریافت‌کننده واکسن‌های کاندید به همراه ادجوانت فروند و مانتانید و گروه کنترل PBS ارزیابی و مقایسه شدند.

جدول ۱) برنامه ایمن‌سازی گروه‌های مختلف موشی

نام گروه	تزریق اول	تزریق دوم	تزریق سوم
کنترل (PBS)	PBS	PBS	PBS
کنترل* (C/IFA)	فروند کامل (CFA)	فروند ناقص (IFA)	فروند ناقص
کنترل** (M50)	مانتانید ۵۰	مانتانید ۵۰	مانتانید ۵۰
کنترل (pCDNA)	pCDNA***	pCDNA	pCDNA
VLP	ذرات شبه‌ویروسی	ذرات شبه‌ویروسی	ذرات شبه‌ویروسی
VLP+C/IFA	VLP+CFA	VLP+IFA	VLP+IFA
VLP+M50	VLP+M50	VLP+M50	VLP+M50
DNA/VLP	rDNA#	VLP	VLP

\* ادجوانت کامل و ناقص فروند، \*\* ادجوانت مانتانید ۵۰، \*\*\* وکتور pCDNA خالی، # وکتور pCDNA حاوی آنتی‌ژن

مراحل ساخت و تایید تولید ذرات VLP MPER-V3 در مطالعه پیشین به طور کامل شرح داده شده است [4]. به منظور تولید VLP در مقیاس انبوه، به طور خلاصه پس از انتقال وکتور pEGFP-N1 حاوی ژن مورد نظر به همراه وکتورهای pSPAX2، pWPXL و pMD2G به صورت همزمان با استفاده از سیستم توربوفاکت و به روش بهینه‌شده، به سلول‌های رده HEK 293-T ترانسفکت شدند [4]. پس از کشت سلول‌ها در محیط Dulbecco's DMEM (Sigma-Aldrich) (حاوی ۱۰٪ FBS، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین، آل‌گلوتامین) و انکوباسیون آن در شرایط ۳۷°C، ۵٪ CO<sub>2</sub> به مدت ۷۲ ساعت و مشاهده ذرات تولیدی حاوی Green Fluorescent Protein (Fluorescent Protein) با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت، سوپ رویی کشت سلولی با استفاده از اولتراسانتریفوژ تغلیظ شد و بعد از تعیین تیتراژ با روش p24 ELISA، ذرات تغلیظ‌شده در ۷۰°C تا زمان تزریق به حیوانات نگهداری شدند.

موش‌های ایمن‌شده پس از بی‌هوشی با روش قطع نخاع، کشته شدند و پس از غوطه‌سازی در الکل ۷۰٪، طحالشان در شرایط استریل جدا شد و بافت طحال پس از هموژن‌شدن در محلول بافر PBS 1x به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C و دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل، ۱۰ میلی‌لیتر بافر لیزکننده گلوبول قرمز اضافه شد. سپس مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد و بلافاصله پس از آن، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 (Sigma) (حاوی ۱۰٪ FBS، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین، آل‌گلوتامین) و انکوباسیون آن در شرایط ۳۷°C، ۵٪ CO<sub>2</sub> به مدت ۷۲ ساعت و مشاهده ذرات تولیدی حاوی Green Fluorescent Protein (Fluorescent Protein) با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت، سوپ رویی کشت سلولی با استفاده از اولتراسانتریفوژ تغلیظ شد و بعد از تعیین تیتراژ با روش p24 ELISA، ذرات تغلیظ‌شده در ۷۰°C تا زمان تزریق به حیوانات نگهداری شدند.

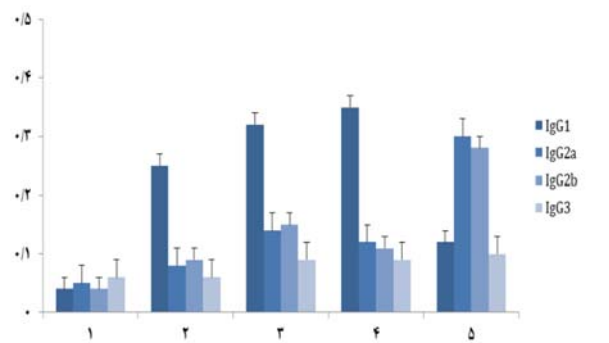
موش‌های ایمن‌شده پس از بی‌هوشی با روش قطع نخاع، کشته شدند و پس از غوطه‌سازی در الکل ۷۰٪، طحالشان در شرایط استریل جدا شد و بافت طحال پس از هموژن‌شدن در محلول بافر PBS 1x به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C و دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل، ۱۰ میلی‌لیتر بافر لیزکننده گلوبول قرمز اضافه شد. سپس مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد و بلافاصله پس از آن، ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 (Sigma) (حاوی ۱۰٪ FBS، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین، آل‌گلوتامین) و انکوباسیون آن در شرایط ۳۷°C، ۵٪ CO<sub>2</sub> به مدت ۷۲ ساعت و مشاهده ذرات تولیدی حاوی Green Fluorescent Protein (Fluorescent Protein) با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت، سوپ رویی کشت سلولی با استفاده از اولتراسانتریفوژ تغلیظ شد و بعد از تعیین تیتراژ با روش p24 ELISA، ذرات تغلیظ‌شده در ۷۰°C تا زمان تزریق به حیوانات نگهداری شدند.

موش‌های ایمن‌شده و به‌عنوان اولین آنتی‌بادی به پلیت‌ها افزوده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت یک ساعت در ۳۷°C انکوبه شده و پس از شست‌وشو، ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی کوئزوگه به عنوان آنتی‌بادی ثانویه (با رقت ۱/۱۰۰۰۰) به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت یک ساعت دیگر در ۳۷°C انکوبه شد. در نهایت با افزودن سوپسترای کروموزن TMB (3,3',5,5')

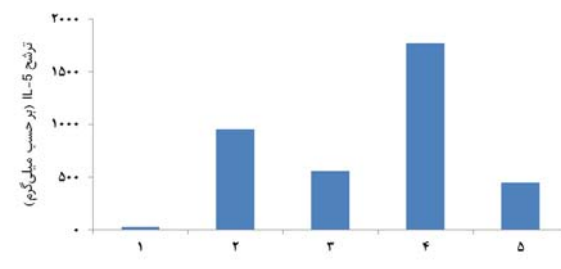
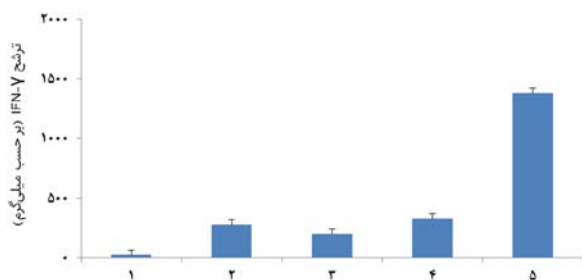
در مقابل در گروهی که VLP را به صورت پرایم- بوست (DNA/VLP) دریافت کرده بودند سطح IgG2a (شاخص تحریک پاسخ Th1) افزایش یافت که نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با میزان تولید IgG1 در همین گروه بود ( $p=0/0000$ ).

در بررسی سطح تولید سایتوکاین‌ها، سطح تولید IL-5 در حضور کاندید واکسن به صورت VLP، بسیار افزایش یافت. میزان تولید IL-5 بعد از تزریق VLP به  $1000 \text{ pg/ml}$  رسید (نمودار ۳). بیشترین میزان ترشح IL-5 مربوط به گروه ایمن‌شده با VLP به همراه ادجوانت M50 بود که میزان تولید این سایتوکاین به بیش از  $1500 \text{ pg/ml}$  رسید. این کاندید واکسن گزینه بسیار مناسبی در تحریک تولید IL-5 (پاسخ هومورال) است. در مورد تزریق VLP به صورت هتروولوگوس پرایم- بوست (DNA/VLP) اگرچه میزان ترشح این سایتوکاین به اندازه موارد دیگر نبود، اما در مقایسه با گروه کنترل (PBS) از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری داشت ( $p<0/05$ ). در مقایسه با بیان و ترشح IL-5، در گروه‌هایی که سطح تولید این سایتوکاین بالا بود میزان ترشح اینترفرون گاما کاهش داشت و برعکس در مورد تزریق واکسن کاندید به صورت پرایم- بوست DNA/VLP، میزان اینترفرون گاما به بیش از  $1300 \text{ pg/ml}$  افزایش داشت.

همچنین ایزوتایپ غالب در گروه‌هایی که تزریق VLP به تنهایی یا با ادجوانت داشتند از نوع IgG1 (شاخص تحریک پاسخ Th2) بود که بیشترین تیتیر مربوطه متعلق به گروه ایمن‌شده با VLP+M50 بود (نمودار ۲).



نمودار ۲) میزان جذب نمونه‌های سرمی به دست آمده از موش‌های واکسینه شده با فرمولاسیون‌های متفاوت واکسن‌های کاندید در  $450 \text{ ng/ml}$ ، به عنوان معیاری از سطح سرمی Antibody Isotyping. گروه‌های دریافت‌کننده واکسن‌های کاندید به همراه ادجوانت فروند و مانتانید و گروه کنترل PBS ارزیابی و مقایسه شدند.



نمودار ۳) میزان تولید سایتوکاین‌های IL-5 و IFN-γ در گروه‌های موشی ایمن‌شده. پس از ایمن‌سازی گروه‌های موشی، سلول‌های طحال به وسیله پپتیدهای V3، MPER، و gp120 (که در اینجا نشان داده شده است) با فرمولاسیون‌های متفاوت واکسن‌های کاندید کشت داده شدند.

از ورود ویروس با تیتیر بالا حضور داشته باشند مانع جایگزینی ویروس و ایجاد عفونت می‌شوند [13].

با مراجعه به آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده، روش‌هایی با تولید پوشش ویروس کاذب HIV، بیشترین اولویت را دارند. مطالعات نشان می‌دهند که تاکنون بیش از ۱۱۰ نوع VLP برای ویروس‌ها ساخته شده است که متعلق به ۳۵ خانواده متفاوت از ویروس‌ها هستند. به طور مثال واکسن‌های پیشگیری‌کننده انسانی بر مبنای VLP در ایمنی علیه عفونت‌های هپاتیت B (HBV) و پاپیلوما ویروس (HPV) کاربرد تجاری دارند [9, 12, 14]. یکی از مزیت‌های VLP نسبت به ویروس‌های زنده ضعیف‌شده، توانایی آنها برای بیان همزمان چندین اپی‌توپ ویروسی با ساختار طبیعی است [9]. از طرفی، VLP‌ها به طور مستقیم هر دو مسیر آنتی‌ژنی خارج‌ژنی (اگزوزن) که منجر به ارائه آنتی‌ژن توسط MHC (مجموعه سازگاری بافتی اصلی) کلاس I و II می‌شود را فعال می‌کنند و در نتیجه مسیر آنتی‌ژنی درون‌ژنی (پاندوزن) توسط مولکول‌های MHC II می‌تواند به طور متقاطع ارائه شود [9-13]. انتخاب اپی‌توپ‌های خاص به عنوان واکسن می‌تواند به کنترل بیماری و جلوگیری از پیشروی آن کمک کند. در راستای تحقیقات

## بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی ایمنی‌زایی ذرات شبه‌ویروسی در مدل موشی BALB/c به منظور القای پاسخ ایمنی هومورال و دست‌یابی به آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده انجام شد. بیان و ترشح سایتوکاین‌ها به عنوان شاخصی برای پاسخ ایمنی اختصاصی علیه آنتی‌ژن است، به طوری که IFN-γ به عنوان شاخص پاسخ ایمنی سلولی و IL-5 به عنوان شاخص پاسخ ایمنی هومورال در نظر گرفته می‌شود [10]. بیماری ایدز چهارمین عامل مرگ‌ومیر در انسان‌ها شناخته شده است، بنابراین پیشگیری این بیماری ضروری به نظر می‌رسد که از طریق آموزش بهداشت فردی و اجتماعی و استفاده از واکسن تامین می‌شود، گرچه واکسن‌ها بهترین استراتژی برای پیشگیری و درمان هستند [11].

مطالعات نشان می‌دهند که یک واکسن موثر و کارآمد علیه HIV باید هر دو بازوی سیستم ایمنی (ایمنی هومورال و سلولی) را به طور همزمان تحریک و فعال کند [12]. با توجه به یافته‌های اخیر به نظر می‌رسد مهم‌ترین زمینه در تحقیقات واکسن HIV-1 باید روی ساخت نواحی ایمونوژن از Env برای القای تولید آنتی‌بادی‌های نوترالیزان متمرکز شود زیرا اگر این آنتی‌بادی‌ها قبل

مطالعه ذرات HIV VLP پرداختند اشاره شد که تزریق این نوع کاندید واکسن توانسته سبب تحریک تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده شامل 2G12، b12، VRC01 و 4E10 شود.

در ارزیابی نتایج آنها مقدار IgG توتال در مقایسه با PBS بسیار متفاوت بوده و با محاسبه  $p < 0.0001$  این اختلاف معنی‌دار گزارش شده است. همچنین با سنجش تیتراژ، IgG1 در OD:450nm گزارش شد. تزریق به‌صورت پرایم-بوست DNA/VLP توانایی تحریک Th2 با ارزیابی IgG1 و نیز IgG2a در تحریک Th1 را داشته، بنابراین قابلیت استفاده به‌عنوان کاندید واکسن را داراست [3, 24].

در مطالعه حاضر نیز نه‌تنها تیتراژ آنتی‌بادی‌های توتال و IgG2a سطح بالاتری را گزارش می‌کنند بلکه نسبت به مطالعه آنها تیتراژ بیشتری را نشان می‌دهند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که فرمولاسیون VLP با اپی‌توپ‌های MPER+V3 توان پاسخ در تولید ایمنی را نیز بالا برده است.

همچنین IFN- $\gamma$  به‌عنوان شاخص پاسخ Th1 و IL-5 به‌عنوان شاخص Th2 اندازه‌گیری شدند. سطح بیان IFN- $\gamma$  نشان‌دهنده رفتن پاسخ به سمت ایمنی سلولی است و در مقایسه با بیان تولید IL-5 که پاسخ را به سمت ایمنی هومورال پیش می‌برد [24]، با توجه به نمودار ۳ مشاهده می‌شود که در القای پاسخ‌های تکثیری لنفوسیت‌های T، واکسن کاندید هتروولوگوس پرایم-بوست DNA/VLP، بیشترین مقدار IFN- $\gamma$  را نسبت به گروه‌های VLP ایجاد کرده است. بیشترین تولید IL-5 زمانی بوده که تزریق‌ها به‌صورت VLP بودند، چه به‌صورت تنها و چه به‌همراه ادجوانت، گرچه استفاده از ادجوانت M50 با تیتراژ ۱۷۰۰ pg/ml و فرمولاسیون VLP خالی با تیتراژ ۹۷۰ pg/ml بیشترین میزان تولید و پاسخ را نشان دادند و می‌توانند تعیین‌کننده انتخاب ادجوانت مناسب نیز در ایجاد افزایش پاسخ تاثیرگذار خواهد بود یا خیر. از آنجا که IL-5 سایتوکاینی است که به‌وسیله سلول‌های CD4<sup>+</sup>، Th2 و ماست، سل‌های فعال‌شده تولید می‌کند، بنابراین فرمولاسیون VLP تحریک‌زایی را به سمت ایمنی هومورال نشان می‌دهد.

استفاده از ادجوانت‌های فروند و مانتانید نیز در ایجاد تیتراژ آنتی‌بادی‌ها نقش متفاوتی داشتند، به‌طوری‌که مانتانید قابلیت ایمنی‌زایی بیشتری را نشان داد. بنابراین تعیین تفاوت اثر ادجوانت‌ها می‌تواند نقش مهمی در فرمولاسیون واکسن‌ها داشته باشد.

در مطالعه حاضر نیز تزریق به‌صورت پرایم-بوست DNA/VLP نسبت به تزریق پینتید قابلیت تحریک بیشتری از IFN- $\gamma$  را نشان داد. تولید این سایتوکاین نیز به‌منزله فعال‌نمودن ماکروفاژها در هر دو دسته پاسخ ایمنی ذاتی و پاسخ‌های ایمنی سلولی آدپتیو است. بنابراین گرچه تولید IL-5 اثر کاهشی در عمل وابسته به اینترفرون گاما و ماکروفاژها دارد (که این امر نیز در نتایج به‌دست‌آمده کاملاً مشهود است)، اما میزان تاثیر این نوع فرمولاسیون در افزایش پاسخ نیز قابل‌تأمل است.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به قیمت بالا و دسترسی مشکل به کیت‌های مورد استفاده در تحقیق اشاره نمود.

با توجه به نقش ادجوانت مانتانید ۵۰ در تحریک سیستم ایمنی هومورال و تولید آنتی‌بادی، پیشنهاد می‌شود در آینده با مطالعات گسترده‌تر و در مدل‌های حیوانی دیگر، کاندیدهای واکسن دیگر مورد بررسی قرار گیرند.

صورت‌گرفته به‌منظور تولید و توسعه واکسن‌های پلی‌اپی‌توپی، مشخص شده است که ترکیبی از پروتئین‌های ساختاری و تنظیمی HIV، نسبت به مواردی که در آنها تنها از پروتئین‌های ساختاری یا تنظیمی استفاده می‌شود، ایمنی‌زایی بیشتری ایجاد می‌کند [15-17].

در این مطالعه یکی از اهداف بسیار مهم، ناحیه MPER و V3 در نظر گرفته شد. در اثبات توانایی MPER و V3 می‌توان به مطالعه کلودیا آر و همکاران در سال ۲۰۱۱ اشاره نمود که در بررسی مکانیزم خنثی‌سازی ویروس‌ها آنتی‌بادی‌هایی چون 2F5 و 4E10 و b12 بیشترین خاصیت خنثی‌کنندگی را داشتند و همچنین اتصال این آنتی‌بادی‌ها به‌صورت برگشت‌ناپذیر تشخیص داده شد. آنها گزارش کردند که نواحی MPER، V3 و CD4 binding بیشترین اثر را در القا و تحریک تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده وسیع‌الطیف داشتند [18, 19]. از آنجا که ارزیابی سطح آنتی‌بادی‌های اختصاصی سرمی (IgG1 و IgG2) به‌عنوان معیار القای ایمنی هومورال و نیز تولید سایتوکاین‌هایی چون IFN- $\gamma$  و IL-5 به‌عنوان معیار القای ایمنی سلولی در نظر گرفته می‌شوند، بررسی و ارزیابی هر کدام از پارامترهای ذکرشده بیانگر آن است که از واکسن‌های کاندید، استفاده از واکسن‌های کاندید VLP در القای تیتراژ بالای آنتی‌بادی‌ها موفق بوده است.

در مطالعه‌ای که فوشی کوآن و همکاران در سال ۲۰۱۷ روی تزریق SHIV VLP در موش‌های BALB/c داشتند، مشاهده نمودند VLP‌هایی که سطح انولوپ آنها تغییر یافته بود قادر به افزایش تیتراژ IgG1، IgG2a، IgG2b، IgG3 و IgA شدند [19, 20].

در مطالعه حاضر نیز کاندید واکسن‌ها با فرمولاسیون VLP قادر به افزایش تیتراژ آنتی‌بادی در پاسخ ایمنی هومورال بوده‌اند [21, 22]. به‌ترتیب IgG1 و IgG2 بیانگر پاسخ Th2 و Th1 بودند و ساب‌کلاس‌های 2a و 2b نتیجه سوئیچینگ پاسخ Th1 هستند. ارزیابی نمودار ۱ نشان می‌دهد که تیتراژ آنتی‌بادی تولیدی در زمانی‌که کاندید واکسن VLP استفاده‌شده بسیار بالا رفت و در مقایسه با گروه‌های کنترل PBS، M50 V2، C/IFA، pCDNA تفاوت بسیار معنی‌داری داشت و البته با توجه به نتایج، اثبات شد که تیمار مدل حیوانی با کاندید واکسن مورد نظر که فرمولاسیون آن به‌همراه ادجوانت مانتانید بوده پاسخ بهتری نسبت به سایر گروه‌ها داشته است.

در راستای نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه/بِنزرتومبای، می‌توان گفت که حضور ادجوانت می‌تواند در رژیم تزریقی کاندید واکسن پاسخ متفاوتی نشان دهد [23]. در گروه‌هایی که تزریق VLP+M50، VLP+CIFA و VLP را داشتند به ترتیب بیشترین سطح تولید IgG1 مشاهده شد و از آنجا که تحریک و تولید این کلاس آنتی‌بادی در اثر فعالیت Th2 است، این امر نشان‌دهنده تحریک پاسخ ایمنی هومورال است.

نتایج به‌دست‌آمده از محاسبه نسبت آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG2a/IgG1، نشان می‌دهد که فرمولاسیون واکسن‌های کاندید به‌صورت VLP پاسخ سیستم ایمنی را به سمت ایمنی هومورال شیفت داده است. تزریق به‌صورت پرایم-بوست DNA/VLP توانایی تحریک Th2 با ارزیابی IgG1 را نشان می‌دهد، بنابراین این فرمولاسیون قابلیت استفاده به‌عنوان کاندید واکسن در تحریک سیستم ایمنی سلولی را دارد. در ارزیابی ایمونولوژیک کاندید واکسن DNA/VLP در مطالعه یانگ و بونگ‌ارو و همکاران که به

- 10- Bolhassani A, Kardani K, Vahabpour R, Habibzadeh N, Aghasadeghi MR, Sadat SM, et al. Prime/boost immunization with HIV-1 MPER-V3 fusion construct enhances humoral and cellular immune responses. *Immunol Lett*. 2015;168(2):366-73.
- 11- Sosa D, Dev Jayant R, Kaushik A, Nair M. Current status of human immunodeficiency virus vaccines. *Vaccin Res Open J*. 2016;1(1):e3-5.
- 12- Zhao C, Ao Z, Yao X. Current advances in virus-like particles as a vaccination approach against HIV infection. *Vaccines (Basel)*. 2016;4(1):2.
- 13- Li Y, Migueles SA, Welcher B, Svehla K, Phogat A, K Louder M, et al. Broad HIV-1 neutralization mediated by CD4-binding site antibodies. *Nature Med*. 2007;13:1032-4.
- 14- Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van Mechelen M, Morel S, Dessy F, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. 2006;24(33-34):5937-49.
- 15- Mahdavi M, Ebtekar M, Mahboudi F, Khorram Khorshid H, Rahbarizadeh F, Azadmanesh K, et al. Immunogenicity of a new HIV-1 DNA construct in a BALB/c mouse model. *Iran J Immunol*. 2009;6(4):163-73.
- 16- Jafarpour N, Memarnejadian A, Aghasadeghi MR, Kohram F, Aghababa H, Khoramabadi N, et al. Clustered epitopes within a new poly-epitopic HIV-1 DNA vaccine shows immunogenicity in BALB/c mice. *Mol Biol Rep*. 2014;41(8):5207-14.
- 17- Reguzova A, Antonets D, Karpenko L, Ilyichev A, Maksyutov R, Bazhan S. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens. *PLoS One*. 2015;10(3):e0116412.
- 18- Ruprecht CR, Krarup A, Reynell L, Mann AM, Brandenberg OF, Berlinger L, et al. MPER-specific antibodies induce gp120 shedding and irreversibly neutralize HIV-1. *J Exp Med*. 2011;208(3):439-54.
- 19- Gray ES, Madiga MC, Moore PL, Mlisana K, Abdool Karim SS, Binley JM, et al. Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 mediated by plasma antibodies against the gp41 membrane proximal external region. *J Virol*. 2009;83(21):11265-74.
- 20- Quan FS, Sailaja G, Skountzou I, Huang C, Vzorov A, Compans RW, et al. Immunogenicity of virus-like particles containing modified human immunodeficiency virus envelope proteins. *Vaccine*. 2007;25(19):3841-50.
- 21- Mann JK, Ndung'u T. HIV-1 vaccine immunogen design strategies. *Virol J*. 2015;12:3.
- 22- Arabi S, Aghasadeghi MR, Memarnejadian A, Kohram F, Aghababa H, Khoramabadi N, et al. Cloning, expression and purification of a novel multi-epitopic HIV-1 vaccine candidate. *Vacres*. 2014;1(1):10-5.
- 23- Tumban E, Peabody J, Peabody DS, Chackerian B. A Universal virus-like particle-based vaccine for human papillomavirus: Longevity of protection and role of endogenous and exogenous adjuvants. *Vaccine*. 2013;31(41):4647-54.
- 24- Yang K, Whalen B, Tirabassi RS, Selin L, Levchenko T, Torchilin VP, et al. A DNA vaccine prime followed by a liposome-encapsulated protein boost confers enhanced mucosal immune responses and protection. *J Immunol*. 2008;180(9):6159-67.

## نتیجه‌گیری

ذرات شبه‌ویروسی تولیدشده می‌توانند سیستم ایمنی هومورال را در موش‌های ایمن‌شده با این ذرات به‌تنهایی یا به‌صورت فرموله‌شده با ادجوانت تحریک کنند.

**تشکر و قدردانی:** از زحمات جناب آقای بهارعلی نورانی که در نگهداری حیوانات ما را یاری رساندند، کمال تشکر را داریم.

**تأییدیه اخلاقی:** در این مطالعه تأییدیه کمیته اخلاق پزشکی انستیتو پاستور ایران به شناسه IR.PII.REC.1394.18 اخذ شد.

**تضاد منافع:** موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.

**سهم نویسندگان:** فاطمه توحیدی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی نگارنده بحث (۴۰٪)؛ سیدمهدی سادات (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی/روش‌شناس (۳۰٪)؛ اعظم بوالحسنی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰٪)؛ رامین یعقوبی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪).

**منابع مالی:** این تحقیق در قالب رساله دکتری تخصصی و با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران (گرنٲ ۸۳۲) به انجام رسید.

## منابع

- UNAIDS. Fact sheet-Latest statistics on the status of the AIDS epidemic [Internet]. Geneva: UNAIDS; 2017 [cited 2017, October]. Available from: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>.
- Cubas R, Zhang S, Kwon S, Sevic-Muraca EM, Li M, Chen C, et al. Virus-like particle (VLP) lymphatic trafficking and immune response generation after immunization by different routes. *J Immunother*. 2009;32(2):118-28.
- Buonaguro L, Tagliamonte M, Visciano ML, Tornesello ML, Buonaguro FM. Developments in virus-like particle-based vaccines for HIV. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(2):119-27.
- Tohidi F, Sadat SM, Bolhassani A, Yaghoobi R. Construction and production of HIV-VLP harboring MPER-V3 for potential vaccine study. *Curr HIV Res*. 2017;15(6):434-9.
- Montero M, Van Houten NE, Wang X, Scott JK. The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: Dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008;72(1):54-84.
- Huang J, Ofek G, Laub L, Louder MK, Doria-Rose NA, Longo NS, et al. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature*. 2012;491(7424):406-12.
- Benen TD, Tonks P, Kliche A, Kapzan R, Heeney JL, Wagner R. Development and immunological assessment of VLP-based immunogens exposing the membrane-proximal region of the HIV-1 gp41 protein. *J Biomed Sci*. 2014;21:79.
- Van Gils MJ, Sanders RW. Broadly neutralizing antibodies against HIV-1: Templates for a vaccine. *Virology*. 2013;435(1):46-56.
- Sadat SM, Zabihollahi R, Javadi F, Vahabpour R, Siadat SD, Azadmanesh K, et al. Immunological evaluation of recombinant HIV1 virions with novel adjuvants in BALB/c mice model. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2011;21(84):13-21. [Persian]