Review Article

Therapeutic Vaccines of Hepatitis C Virus with Emphasis on DNA Vaccine

Kiana Shahzamani [1,*], Somaieh Sabzali [2]

[1] Assistant Professor, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran
[2] PhD Candidate, Hepatitis Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

ABSTRACT

Hepatitis C is a major cause of chronic hepatitis in developed countries. According to the World Health Organization, about 170 to 200 million people are infected worldwide with hepatitis C virus with 3-4 million newly infected patients annually. The approval of sofosbuvir drug by the FDA has led to new horizons ahead of non-atherosclerotic treatments in people with hepatitis C. Sofosbuvir is a NS5B (Non structural Protein 5B) polymerase nucleoside analogue inhibitor in a hepatitis C virus, which is consumed as a food. But sofosbuvir alone is not effective and should be given together with another drug such as a NS5A inhibitor. Although generic versions of sofosbuvir and other DAA (Direct Acting Anti-hepatitis C Virus) drugs are available now at cheap prices, finding patients is a major problem and treating is not enough for eradication, and a vaccine is required. Unfortunately, despite the considerable efforts so far, no vaccine has been developed for prevention and treatment of this disease. In this review, we tried to discuss the studies conducted over the past decade to develop vaccines for hepatitis C, with an emphasis on DNA vaccine.

Keywords: Therapeutic vaccines, Hepatitis C virus, DNA vaccines

please cite this paper as:
Shahzamani K, Sabzali S. Therapeutic Vaccines of Hepatitis C Virus with Emphasis on DNA Vaccine. *Govaresh* 2019:24:12-21.

Corresponding author:
Kiana Shahzamani, Ph.D
Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan
University of Medical Sciences, Khorram abad, Iran
Tel: + 98 66 33204005
Fax: + 98 66 33204007
E-mail: shahzamani.k@lums.ac.ir

Received: 17 Sep. 2018
Edited: 03 Feb. 2019
Accepted: 04 Feb. 2019

مقاله مروری

واکسن های درمانی ویروس هپاتیت C با تأکید بر DNA واکسن ها

کیانا شاهزمانی[۱،*]، سمیه سبزعلی[۲]

[۱] استادیار، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات هپاتیت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

چکیده

هپاتیت C یکی از مهمترین عوامل ایجاد هپاتیت مزمن در کشورهای توسعه یافته است. طبق آمار سازمان جهانی بهداشت، حدود ۱۷۰ تا ۲۰۰ میلیون نفر به این بیماری مبتلا هستند و هر ساله ۳ تا ۴ میلیون نفر نیز به این شمار اضافه می شود. تأیید داروی سوفوسبوویر[۱] از جانب اداره غذا و دارو[۲] افق های تازه ای را پیش روی درمان های غیر اینترفرونی در مبتلایان به هپاتیت C مزمن می گشاید. سوفوسبوویر یک بازدارنده آنالوگ نوکلئوتیدی پلیمراز NS5B در ویروس هپاتیت C است که به صورت خوراکی مصرف می شود. لازم به ذکر است که این دارو به تنهایی مؤثر نبوده و حتماً باید با داروی دیگری مانند ممانعت کننده NS5A تجویز گردد. اگرچه امروزه ورژن های ژنریک سوفوسبوویر و سایر DAA با قیمت مناسب در دسترس هستند اما معضل اصلی یافتن بیماران مبتلا است. از این رو درمان بیماران کافی نبوده و نیاز به واکسن مناسب همچنان احساس می شود. علیرغم تلاش های صورت گرفته، متأسفانه تاکنون واکسن مناسبی برای پیشگیری و درمان این بیماری تهیه نشده است. این مقاله به مروری اجمالی بر مطالعات انجام شده طی دهه گذشته برای تهیه واکسن های درمانی هپاتیت C با تأکید بر DNA واکسن ها می پردازد.

کلید واژه: واکسن های درمانی، ویروس هپاتیت C، DNA واکسن ها

گوارش/ دوره ۲۴، شماره ۱/ بهار ۱۳۹۸/ ۲۱-۱۲

1. Sofosbuvir
2. Food and Drug Administration

زمینه و مقدمه:

ویروس هپاتیت سی[۱]، در سال ۱۹۷۰ با عنوان هپاتیت non A non B نام گذاری شد. در سال ۱۹۸۹، چوو[۲] و همکاران موفق به کشف عامل هپاتیت non A non B شدند و آن را ویروس هپاتیت C نامیدند.(۱و۲) این ویروس بیماری مزمنی ایجاد می کند که حدود ۳٪ (۲۰۰-۱۷۰ میلیون نفر) از افراد جهان به آن مبتلا هستند و هر ساله ۳ تا ۴ میلیون نفر به این تعداد اضافه می شوند. تنها ۲۰٪ از افراد مبتلا، فرم حاد بیماری را نشان می دهند و حدود ۸۰٪ از موارد عفونت ناشی از ویروس به شکل بیماری مزمن پیشرفت می کند که از این بین ۵-۱٪ از بیماران به سیروز کبدی و سرطان کبد مبتلا می شوند. آمارهای سازمان بهداشت جهانی[۳] نشان می دهد که ویروس هپاتیت C عامل اصلی مرگ و میر در بین مبتلایان به ویروس نقص ایمنی اکتسابی[۴] می باشد. همچنین از بین رفتن کبد توسط ویروس هپاتیت C مهمترین دلیل پیوند کبد در آمریکا و اروپای غربی است.(۳-۵)

ویروس هپاتیت C دارای شش ژنوتیپ اصلی و بیش از ۷۰ زیرگونه مختلف است. ژنوتیپ های ۱ و ۲ ویروس در تمام دنیا شایع هستند، در حالی که ژنوتیپ های ۳ تا ۶ محدود به مناطق جغرافیایی خاصی هستند. برای مثال ژنوتیپ ۳ در هند و جنوب شرق آسیا دیده می شود، ژنوتیپ ۴ در آفریقا و خاورمیانه، ژنوتیپ ۵ در جنوب آفریقا و ژنوتیپ ۶ در جنوب آسیا دیده می شود. میزان شیوع عفونت در ایران حدود ۱٪ است.(۶-۱۰)

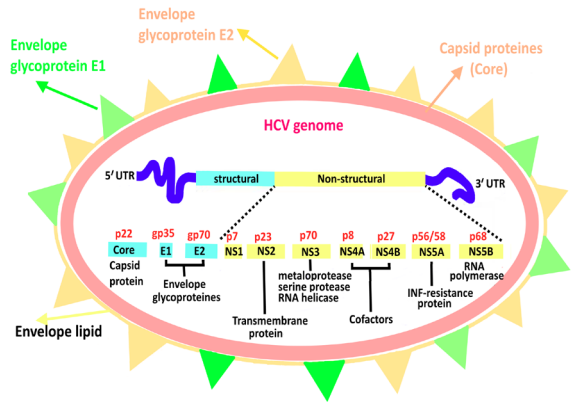
انتقال ویروس به طور عمده از طریق خون و فراورده های خونی می باشد. با پیشرفت تست های غربالگری این روش انتقال بسیار کاهش یافته است، اما انتقال بیماری توسط سرنگ های آلوده همچنان به عنوان راه اصلی انتقال بیماری در کشورهای پیشرفته مطرح است. برخلاف عفونت با ویروس هپاتیت B، انتقال جنسی و انتقال از مادر به نوزاد در هپاتیت C کمتر رخ می دهد.(۱و۲)

با توسعه و راه اندازی روش‌های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک (NAT)، تشخیص ویروس در خلال دوره پنجره میسر گردیده است. بسیاری از محققین برای تعیین کمی بار ویروسی در افراد مبتلا به هپاتیت C از روش PCR و Real-time PCR استفاده نموده اند. با بهره گیری از

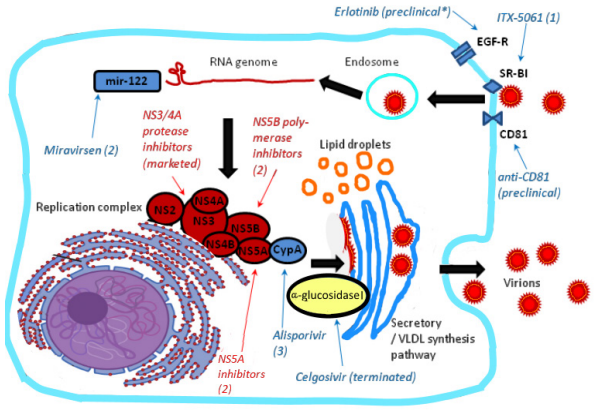
1. Hepatitis C Virus
2. Choo
3. World Health Organization
4. Human Immunodefeiciency Virus

*نویسنده مسئول: کیانا شاهزمانی
خرم آباد، انتهای خیابان رازی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
تلفن: ۰۶۶-۳۳۲۰۴۰۰۵
نمابر: ۰۶۶-۳۳۲۰۴۰۰۷
پست الکترونیک: shahzamani.k@lums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۲۶
تاریخ اصلاح نهایی: ۹۷/۱۱/۱۴
تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۵



شکل۱: سازماندهی ژنومی و پردازش پلی‌پروتئین ویروس هپاتیت C



شکل۲: مراحل همانندسازی ویروس هپاتیت C

این روش ها می توان ویروس را هم از نظر کیفی و هم از نظر کمی مورد ارزیابی و سنجش قرار داد.(۱۳-۱۱)

سازماندهی ژنوم ویروس

ژنوم ویروس هپاتیت C به صورت RNA تک رشته با پلاریته مثبت با طول تقریبی ۹/۶ kb است که در دو انتهای ′۳ و ′۵ آن نواحی ترجمه نشده کاملاً حفاظت شده ای (UTRs) قرار دارد. 5′UTR واجد ناحیه ی ورود ریبوزوم (IRES) می باشد که نقش Cap را برای پلی پروتئین ۳۰۰۰ اسید آمینه ویروس ایفا می کند.(شکل ۱) ناحیه 3′UTR به طول ۴۰ نوکلئوتید، ناحیه متغیر را تشکیل می دهد. در انتهای ′۳، یک توالی پلی پریمیدین با طول متفاوت و یک ناحیه حفاظت شده ۹۸ نوکلئوتیدی به نام دنباله X وجود دارد. هر دو انتهای ′۵ و ′۳ UTRs حاوی عناصر عملکردی سیس (CREs) هستند که برای همانندسازی ویروس ضروری می باشد.(۱)

پروتئین مرکزی[1] وگلیکوپروتئین های غشایی E1 و E2 توسط ناحیه N – ترمینال ژنوم ویروس کد می شوند. پروتئین های غیر ساختاری NS2، NS3، NS4A، NS4B، NS5A و NS5B توسط باقیمانده ژنوم کد می شوند. پروتئین NS2 به همراه ناحیه پروتئاز N – ترمینال NS3 برای برش خودبخودی اتصال NS2–NS3 مورد نیاز می باشد. NS2، یک دایمر سیستئین پروتئاز با جایگاه فعال می باشد. پروتئین NS3 حاوی ناحیه سرین پروتئازی است که به همراه کوفاکتور NS4A مسئول برش پروتئین های غیرساختاری می باشد. سرین پروتئاز NS3، دفاع سلولی ذاتی میزبان را به وسیله ممانعت از سیگنالینگ RIG-1[2] و TLR3[3] تحت تأثیر قرار می دهد. دو فعالیت آنزیمی اضافه در دو سوم پایانی از ناحیه کربوکسی ترمینال پروتئین NS3 دارای دو فعالیت RNA هلیکاز و نوکلئوتید تری فسفاتاز است. نقش متالوپروتئین فسفوریله NS5A که حاوی روی است، هنوز شناخته نشده است. NS5A در ناحیه آمینوترمینال خود دارای زنجیره آلفا است که در غشا قرار می گیرد. فسفریلاسیون NS5A به وسیله کینازهای سلولی انجام می شود. فسفریلاسیون NS5A نقش مهم این پروتئین را در همانندسازی نشان می دهد.(شکل ۲) به نظر می رسد NS5A

1. Core
2. Retinoic acid inducible gene
3. Toll-like receptor

عامل اصلی مقاومت به اینترفرون آلفا در ژنوتیپ های ۱ و ۴ ویروس باشد.(۱۴) NS5B یک پروتئین ۶۸ کیلودالتونی است که دارای فعالیت RNA پلیمراز وابسته به RNA است. ویروس با استفاده از تغییرقالب +۱ یک پروتئین به نام P7 را کد می کند که عضو خانواده ویروپورین ها بوده و عملکرد آن هنوز مشخص نیست. علاوه براین پروتئین های هتروژن با استفاده از تغییر غالب از روی RNA ویروس ساخته می شوند که این پروتئین ها نقشی در تکثیر و تولید ویروس در سلول نداشته و نقش اصلی آنها هنوز ناشناخته باقی مانده است.(۱۸-۱۵)

شروع عفونت ویروسی با اتصال گلیکوپروتئین های E1 و E2 به رسپتورهای سطح سلول شامل گیرنده های لیپوپروتئینی با چگالی پایین (LDL-R)، گیرنده های پاک کننده کلاس B تیپ I[4]، پروتئین های اکلودین در اتصالات محکم (OCLN) ، گلیکوزآمینوگلیکان ها (GAGs) و دیگر گیرنده ها متصل شده و از طریق اندوسیتوز با واسطه گیرنده وارد اندوزوم های اسیدی پوشیده شده با کلاترین سلول می شوند. اما با این وجود نقش بسیاری از گیرنده ها هنوز به خوبی شناخته نشده است.(۲۱-۱۹) سلول های کبدی هدف اصلی ویروس هپاتیت C به شمار می روند. ژنوم ویروس در سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMCs) و سلول های مغزاستخوان نیز قابل شناسایی می باشد، اما مشخص نیست که در این سلول ها عفونت زایا رخ می دهد یا خیر. از آنجایی که سلول های کبدی اولین هدف HCV هستند، فیبروز پیشرونده کبد نشان دهنده خروج از عفونت از حالت مزمن و گسترش سیروز و سرطان کبد می باشد.(۲۲و۲۳)

درمان های معمول هپاتیت C

تا سال ۲۰۱۶ (انجمن مطالعه بیماری های کبدی اروپا) اینترفرون پگیله شده و ریباویرین بهترین درمان برای هپاتیت C مزمن محسوب می شد.(۲۴و۲۵) اما این نوع درمان در طولانی مدت علاوه بر هزینه بالا، دارای اثرات جانبی فراوان و سمیت زیاد بود. به علاوه، این نوع درمان فقط روی ۵۰٪ از بیماران آلوده با ژنوتیپ های معمول تأثیر داشت.(۸) در سال ۲۰۱۷ طبق دستورالعمل APASL در درمان بیماران مبتلا به هپاتیت C، تلاپرویر[5] و بوسپرویر[6] به همراه اینترفرون پگیله و ریباویرین استفاده

4. Scavenger receptor class B type I
5. Telaprevir
6. Boceprevir

جدول ۱: درمان های رایج ویروس هپاتیت C

محل اثر دارو	نام دارو	منابع
مهار کننده های پروتئاز ویروسی	Asunaprevir, Boceprevir, Ciluprevir, Danoprevir, Faldaprevir, Glecaprevir, Grazoprevir, Narlaprevir, Paritaprevir, Simeprevir, Sovaprevir, Telaprevir, Vaniprevir,Vedroprevir,Voxilaprevir	(۳۰-۳۲)
مهار کننده پروتئین NS5A	Daclatasvir, Elbasvir, Ledipasvir, Odalasvir, Ombitasvir, Pibrentasvir, Ravidasvir, Ruzasvir, Samatasvir, Velpatasvir	(۱۴و۳۳و۳۴)
مهار کننده فعالیت RNA پلی مراز	Beclabuvir, Dasabuvir, Deleobuvir, Filibuvir, Setrobuvir, Sofosbuvir, Radalbuvir, Uprifosbuvir	(۳و۳۵)
داروهای ترکیبی	Elbasvir/grazoprevir Glecaprevir/pibrentasvir, Ledipasvir/sofosbuvir, Ombitasvir/paritaprevir/ritonavir, Sofosbuvir/daclatasvir, Sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir, Velpatasvir/sofosbuvir	(۳۶-۳۸)

شد. اما این درمان نیز هزینه زیادی داشته و در حدود ۴۰٪ از بیماران عوارض جانبی مثل راش های پوستی و کم خونی دیده می شد.(۷و۲۸-۲۶) سوفوسوبویر یک بازدارنده آنالوگ نوکلئوتیدی پلیمراز NS5B در ویروس هپاتیت C است که به صورت خوراکی مصرف می شود. این دارو بر روی تمامی ژنوتیپ های HCV خاصیت ضد ویروسی داشته و می تواند در دوز ۴۰۰ میلی گرم روزانه مصرف گردد. مطالعات کلینیکی نشان داده اند که درمان با سوفوسوبویر در بیماران دارای جهش های پاسخ دهنده و غیرمقاوم بدلیل مقاومت بالای ژنتیکی دارو به HCV بسیار مطمئن است. مزیت های این دارو در مقایسه با درمان های مبتنی بر PIs می تواند اثربخشی بیشتر در مدت زمان بسیار کوتاه تر و با اثرات جانبی کمتر باشد.(۲۹) لازم به ذکر است که این دارو به تنهایی مؤثر نبوده و حتما باید با داروی دیگری مانند ممانعت کننده NS5A تجویز گردد. اگرچه امروزه ورژنهای ژنریک سوفوسوبویر و سایر DAA با قیمت مناسب در دسترس هستند. جدول ۱ گروه های دارویی مورد استفاده بیماران مبتلا به هپاتیت C را به اختصار نمایش می دهد.

مشکلات پیش روی تولید واکسن های هپاتیت C

تنوع بالای ویروس هپاتیت C، تکثیر زیاد، نیمه عمرکوتاه و خطای بالای آنزیم ترانس کریپتاز ویروس است که یک آنزیم RNA پلیمراز وابسته به RNA است و بنابراین بالا بودن میزان موتاسیون، باعث تغییر ژنوم ویروس می شود. از آنجایی که میزان موتاسیون برای ویروس هپاتیت C حدود ۱ نوکلئوتید در هر دور همانندسازی است، این فرکانس بالای جهش زایی باعث ایجاد واریانت های مختلفی می شود که با هم ارتباط دارند.(۳۹) کواسی اسپیشز[1] که یکی از مشکلات اصلی پیش روی ساخت واکسن است، به تغییرات ژنتیکی جزیی اطلاق می‌شود که کمتر از ۵٪ نوکلئوتید ژنوم را دستخوش تغییر می‌سازد و در نتیجه در جریان عفونت، کواسی اسپیشزهای زیادی بوجود می‌آیند، ولی اکثر آنها عفونت‌زا نیستند و با شدت عوارض کبدی نیز رابطه مستقیمی ندارند. میزان پاسخ‌دهی کواسی اسپیشزها به درمان اینترفرونی متفاوت است.(۱و۲) اهمیت بالینی آنها هنوز به‌طور کامل مشخص نیست. بدین ترتیب ویروس هپاتیت C در بدن یک فرد، دایم در حال تغییر است. در اثر این موتاسیون‌های سریع در بدن، ویروس می‌تواند از حملات دفاعی بدن و اثرات دارویی تا حدی در امان بماند.(۴۰)

1. Quasispecies

رویکردهای علمی در تولید واکسن های درمانی

۱- واکسن های بر پایه پروتئین نوترکیب

اصول تولید واکسن های پروتئینی نوترکیب شامل جداسازی ژن کد کننده پروتئین مورد نظر و کلون کردن در باکتری ها، مخمر یا سلولهای یوکاریوتی است. از نظر تئوری اعتقاد بر این است که القاء پاسخ ایمنی تنها توسط چند اپی توپ ویروس برای ایجاد ایمنی کافی می باشد. GI5005، یک واکسن درمانی بر پایه پروتئین است که در فاز ۲ مطالعات بالینی قرار داشته و اثر آن به همراه درمان های استاندارد Soc [2] در حال بررسی است. واکسن دیگر بر اساس ناحیه حفاظت شده مرکزی به همراه ادجوانت ساخته شده از ساپونین، کلسترول و فسفولیپید که ISCOMATRIX نامیده می شود و در فاز اول تحقیقات در ۳۰ داوطلب سالم بررسی شده است.(۴۰) نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که واکسن Cenv3 که از ۳ پروتئین انولوپ شامل (اپی توپ ۳۱۵ از E1 و اپی توپ ۴۱۲ و ۵۱۷ از E2) تشکیل شده است، می تواند پاسخ ایمنی کافی را ایجاد کرده و میزان RNA ویروسی را در بیماران آلوده که پاسخی به Soc نمی دهند، کاهش دهد. این واکسن به نسبت بی خطر بوده و تغییرات کوچک و قابل تحملی در تعداد پلاکت ها به وجود می آورد.(۴۱)

مطالعات قبلی نشان می دهند واکسن نوترکیب gpE1/gpE2 که در خوکچه هندی و شامپانزه ایمونوژن بوده می تواند در میزبان های دیگر پاسخ ایمنی حفاظتی در برابر ویروس هپاتیت C ایجاد کند. فاز ۱ مطالعات این واکسن در بیمارستان وابسته به دانشگاه سنت لوئیس نشان داد که این واکسن می تواند در افراد سالم داوطلب ایمنی ایجاد کند.(۴۲)

۲- واکسن های بر پایه پپتید

واکسن های پپتیدی با عرضه مستقیم پپتیدهای ویروسی به سلول های T و از طریق گیرنده های حاوی مولکول HLA، پاسخ ویژه سلول های T را تحریک می کنند. این واکسن ها برای جلوگیری از خطر پنهان شدن از دید سیستم ایمنی، حاوی چندین اپی توپ هستند و به منظور القاء وسیع پاسخ سلول T کشنده (CTL) و کمکی (Th) همراه با ادجوانت ها استفاده می شوند. واکسن پپتیدی مشتق شده از ناحیه Core (C35-44) به همراه ادجوانت ISA51 توانسته تحمل بالایی را در افراد مبتلا به ویروس هپاتیت C به وجود بیاورد. اخیراً واکسن های ویروزوم با پپتید NS3 تهیه شده ولی اطلاعاتی از آن در دسترس نیست.(۳۷) برخی از اپی توپ های سلول T کشنده (CD8+) شامل اپی توپ های ۱۱۱ تا ۱۱۹، ۳۵ تا ۴۴

2. Standard of care

و ۱۳۲ تا ۱۴۰ پروتئین Core، اپی توپ های ۱۴۰۶ تا ۱۴۱۵، ۱۳۶۷ تا ۱۳۸۶ و ۱۰۳۱ تا ۱۰۳۹ پروتئین NS3 ، اپی توپ های ۱۹۹۱ تا ۱۹۹۹ پروتئین NS5A، اپی توپ های ۱۹۷۳ تا ۱۸۰۱ NS4B، و اپی توپ های ۷۷۴ تا۷۸۲ پروتئین P7 در تهیه واکسن بکار رفته اند. واکسن +mT mE1 که شامل چندین اپی توپ حفاظت شده NS3 (۱۰۳۹-۱۰۳۱ و ۱۳۷۱-۱۴۳۰ و ۱۲۳۵-۱۳۲۱) و پروتئین Core (۱-۵۳ و ۱۱۱-۱۱۹ و ۱۶۹-۱۷۷) است، mE1 بر پایه ۸ ناحیه خنثی کننده ی اپی توپ های پروتئین E1 در ژنوتیپ ۶ ویروس هپاتیت C است. این مطالعه نشان داده شده است که ایمنی زایی به وسیله ی mT+mE1 باعث القای تیتر بالایی از آنتی بادی ضد mE1 و مقادیر بالایی از سلول های T کشنده اختصاصی NS3 و Core می شود. پیشگیری و درمان هپاتیت C به وسیله ی واکسن mT+mE1 در موش های BALB/C و همچنین جلوگیری و از بین بردن تومورهای ایجاد شده به وسیله NS3 در موش ها، NS3 را به عنوان یک کاندید واکسن مناسب معرفی کرده است که در حال حاضر در مرحله Pre-clinical در حال بررسی است.(۴۳)

پپتید VAL-44 شامل ۲ اپی توپ سلول T کشنده، اپی توپ های ۱۹۹۱ تا ۱۹۹۹ پروتئین NS5A، اپی توپ های ۱۷۹۳ تا ۱۸۰۱ پروتئین NS5B و اپی توپ های سلول T کمکی می باشد. ایمن سازی با پپتید VAL-44 پاسخ سلولی قوی را القاء می کند. همچنین این پپتید تولید اینترفرون گاما (IFN-γ) را توسط سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMCS) در بیماران آلوده به ویروس هپاتیت C افزایش می دهد. این نتایج نشان می دهد که می توان پپتید VAL-44 را به عنوان یک واکسن حاوی چندین اپی توپ مورد بررسی قرار داد.(۴۴)

۳- واکسن های برپایه وکتورهای ویروسی

استفاده از وکتورهای ویروسی برای ارائه ژنوم ویروس هپاتیت C یک راه درمانی دیگر بشمار می رود. وکتورهای ویروسی همانند DNA واکسن ها هستند و تنها پروتئین ها و پپتیدهای هدف را تولید می کنند، اما از DNA واکسن ها ایمونوژن تر هستند.(۴۵) واکسن درمانی MVA [1] با بیان پروتئین های NS3/4/5B در فاز ۲ درمان تحت بررسی است. وکتور آدنوویروسی MVA از نظر عرضه پروتئین های NS3-5B به بیماران آلوده به هپاتیت C، در فاز ۱ درمان قرار دارد. مشکل استفاده از این واکسن ها، ایجاد پاسخ ایمنی علیه وکتور ویروسی استو (۴۶) از وکتورهای آدنوویروسی برای بیان اینترفرون آلفا و بتا استفاده شده است در این استراتژی که در واقع نوعی ژن درمانی است، وکتور بیانی حاوی ژن های اینترفرون تحت پروموتور حساس به همراه NS3/4A را وارد میتوکندری موش های سالم نمودند، سپس پاسخ ایمنی ایجاد شده در موش ها را در حضور ویروس بررسی کردند. این روش باعث افزایش ترشح موضعی اینترفرون شد که علاوه بر این که باعث کاهش بار ویروسی می شود عوارض جانبی ناشی از تزریق سیستمیک اینترفرون را نیز کاهش می دهد.(۴۷)

۴- واکسن های بر پایه سلول های دندریتیک

سلول های دندریتیک که در خارج از بدن برای بیان پروتئین های خارجی دستکاری می شوند، قادرند به عنوان ابزاری مطمئن و امیدوارکننده برای واکسن درمانی در نظر گرفته شوند. فنوتیپ و عملکرد ایمنی آنتی ژنی که به وسیله سلول های دندرتیک کد می شود را می توان پیش از ارائه واکسن به بیمار به صورت کامل بررسی کرد. اما با توجه به برخی از عوامل تأثیر گذار بر روی سلول های دندرتیک (اعم ازمرحله بیماری، تاریخچه درمان بیمار و نظایر آن) به دست آوردن سلول های دندرتیک عملکردی از بیماران کار مشکلی است. در حال حاضر، فاز ۱ درمان به منظور تعیین اثربخشی و ایمنی واکسن حاوی سلول های دندریتیک با اپی توپ های ویروس هپاتیت C (که باعث تحریک سلول های T کشنده می شوند) در حال اجرا است.(۴۸و۴۹)

۵- واکسن های ذرات ویروس مانند

رویکردهای دیگر مانند ذرات شبه ویروسی (VLPs) که به صورت موفقیت آمیزی برای پیشگیری از عفونت های ویروسی پایدار مثل هپاتیت B و پاپیلوما ویروس ها تولید شده اند، نیز مورد توجه قرار گرفته اند. ذرات شبه ویروسی اغلب ایمونوژن بوده و معمولاً ساختار بزرگی دارند. از نظر ساختاری از زیر واحدهای تکراری تشکیل شده اند و چون قابلیت تکثیر و ایجاد عفونت را ندارند می توان با آرامش خاطر از آنها استفاده کرد. اغلب ذرات شبه ویروسی می توانند سیستم ایمنی را بدون حضور ادجوانت ها تحریک کنند. HCV-LPs در سال ۲۰۱۱ توسط مارتین لشمن و همکاران تهیه شد که حاوی پروتئین های ساختاری ویروس بود. این ذرات ویروس مانند، با یا بدون p7 تهیه شده و به موش های BALB/C تزریق شدند. واکسن مزبور باعث ایجاد پاسخ ایمنی هومورال و سلولی شده و میزان ترشح اینترفرون گاما را افزایش داد. در نبود پارتیکل p7، پاسخ ایمنی سلولی افزایش یافت. در حالی که در حضور این پارتیکل پاسخ TH1 افزایش پیدا کرد. این ذرات شبه ویروسی به زودی وارد مرحله کارآزمایی بالینی می شوند.(۵۰و۵۱)

۶- واکسن های بر پایه باکتری ها

پروتئین های ویروسی می توانند در سطح باکتری های مهندسی شده ای که سلول های میزبان را آلوده می کنند، بیان شوند. به این ترتیب که DNA کد کننده آنتی ژن های ویروسی را در ژنوم باکتری وارد نموده و یا ژن مورد نظر را در پلاسمیدهایی که پروتئین های سطحی را بیان می کنند، وارد می نمایند. این پروتئین های ویروسی با تولید پروتئین و تکثیر ویروس تداخل ننموده و باکتری می تواند در سلول های میزبان تکثیر کرده و اپی توپ های موردنظر را بیان کند. از این دست واکسن ها می توان به واکسن های ویروس هپاتیت C بر پایه BCG اشاره کرد. در این واکسن، ژن های کدکننده پروتئین های غیرساختاری ویروس وارد باکتری مایکوباکتریوم شده و به شکل واکسن به موش ها تزریق گردید. نتایج نشان داد که پاسخ ایمنی در این موش ها افزایش پیدا کرد.(۵۲و۵۳)

۷- واکسن های بر پایه DNA

در سال ۱۹۹۰ نشان داده شد که می توان پلاسمیدها را مستقیما به عضلات موش در درون بدن فرستاد و علاوه بر این بعدها مشخص شد که پلاسمیدهایی مستقر در عضلات موش می توانند آنتی ژن نوکلئوپروتئین (NP) ویروس آنفلوانزا را بیان نموده و موجب القاء پاسخ آنتی بادی خاص آنتی ژن و پاسخ CTLs شوند. این گونه مطالعات باعث گسترش و توسعه DNA واکسن ها علیه بیماری های عفونی و تومورها شد.(۵۴)

پلاسمیدهای نوترکیب کد کننده پروتئین های آنتی ژن هپاتیت C و یا اپی توپ هایی با سایزهای مختلف می توانند پاسخ هومورال و سلولی

1. Modified Vaccinia Ankara

را تحریک کنند. DNA واکسن ها، می توانند فرایند تشکیل و تولید پروتئین های ویروسی را به طور کامل در سلول تقلید کنند. مهمترین خصوصیت DNA واکسن ها، انعطاف پذیری آنها برای کسب ژن و تولید پروتئین های نوترکیب است. همچنین مشاهده شده که بعد از چندین دوره ایمن سازی با این واکسن ها، پاسخ ایمنی علیه وکتور ایجاد نمی شود. بعلاوه بر اساس مطالعات انجام شده تاکنون پتانسیل ورود DNA به ژنوم میزبان و ایجاد بدخیمی دیده نشده است. مطالعات مختلفی در طی سال های اخیر بر روی DNA واکسن ها صورت گرفته است که در ادامه به تعدادی از آنها اشاره می شود.

در سال ۲۰۰۲ تاثیر ادجوانت ها در ترکیب با DNA در تحریک پاسخ ایمنی هومورال ایجاد شده توسط پلاسمید کد کننده پروتئین مرکزی ویروس هپاتیت C در موش ها بررسی شد. هر دو پاسخ ایمنی سلولی و هومورال به دنبال تزریق واکسن ویروسی حاوی پلاسمید کدکننده مرکزی افزایش یافت، اما پاسخ آنتی بادی ایجاد شده ضعیف و گذرا بود. تأثیر مواد افزودنی و پروتئین های مختلف در پاسخ به واکسن Core بررسی شده است. بررسی ها نشان داد که مخلوط پلاسمید با PEG 6000 و ادجوانت فروند، گسترش پاسخ آنتی بادی بر ضد پروتئین Core را تسهیل می کند. ترکیب با PEG 6000، گرایش به تولید IgG2a در بین سایر آنتی بادی ها علیه Core را افزایش داد. این مطالعه نشان داد که می توان پاسخ آنتی بادی تولید شده بر علیه پروتئین Core را با استفاده از استراتژی های مختلف اصلاح کرد.(۵۵) در همان سال افزایش پاسخ ایمنی علیه پروتئین های انولوپ ویروس هپاتیت C بعد از DNA واکسیناسیون با پلاسمیدهای کد کننده پلی پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که همه پلاسمیدها پاسخ آنتی بادی قابل شناسایی و اختصاصی ایجاد می کنند. تیتر آنتی بادی علیه پروتئین های E1، Core و E2 در هفته ۱۹ بعد از تزریق بسته به پلاسمید تلقیحی و آنتی ژن های ویروس هپاتیت C مورد بررسی قرار گرفت. سازه ی بیانی ساخته شده از پروتئین های انولوپ ویروس هپاتیت C که دارای ناحیه Core نیز بودند، از نظر آماری پاسخ ایمنی قوی تری نسبت به پلاسمیدهایی که هریک از پروتئین ها را به تنهایی کد می کردند، ایجاد کرد. سطح اینترفرون گاما افزایش یافت در حالی که سطح اینترلوکین -۴ در موشهای واکسینه تغییر نکرد.(۵۶)

در سال ۲۰۱۳ به بررسی تأثیر استفاده از الکتروپوراسیون DNA واکسن ها به درون بدن، متعاقب درمان استاندارد در افراد مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت C ژنوتیپ ۱ پرداختند. هدف از این مطالعه فعال کردن یا دوباره فعال نمودن و گسترش پاسخ سلول های T خارج از کبد با ارائه آنتی ژن های ویروس هپاتیت C در شرایط مساعد ایمنی زایی بود. با استفاده از روش هایی مثل الکتروپوراسیون درون بدن می توان میزان ایمونوژن بودن پلاسمیدهای DNA را افزایش داد. با استفاده از شوک می توان نفوذ پذیری دیواره و نیز میزان جذب DNA و بیان واکسن را افزایش داد. همچنین یک پاسخ التهابی محلی نیز ایجاد کرد. این تکنیک در افراد سرطانی استفاده می شود و باعث افزایش پاسخ سلول های T در شامپانزه های مبتلا به هپاتیت C می شود. واکسن های درمانی در ۱۲ بیمار مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت C بررسی شد. یک مرد که واکسن را دریافت کرده بود، از عفونت ویروس هپاتیت C ژنوتیپ ۱ بهبودی پیدا کرد. نتیجه این مطالعه پیشنهاد می کند که واکسن های درمانی می توانند به همراه درمان های استاندارد برای درمان هپاتیت C به کار بروند.(۵۷)

در سال ۲۰۱۳ نیز پلاسمید حاوی NS2 را ساختند و نتایج مشابه گرفتند. برای ایمنی زایی با DNA واکسن، دو پلاسمید با نام های CN2 و N25 ساخته شد که پلی پروتئین های Core/E1/E2/NS2 (aa 1-1320) و E2/NS2/3/4/5 (aa 542-3010) را تحت کنترل پروموتور CAG کد می کرد. پاسخ ایمنی در موش هایی که پلاسمیدهای نوترکیب را دریافت کرده بودند، دیده شد در حالی که در موش هایی که پلاسمید خالی را دریافت کرده بودند، دیده نشد. در موش های آلوده به ویروس هپاتیت C، کاهش چشمگیری در بیان پروتئین های ویروس دیده شد. در حالی که در نمونه کنترل این کاهش دیده نشد. همچنین مقدار +CD4 و +CD8 در موش هایی که پلاسمید N25 را دریافت کردند در مقابل کنترل منفی افزایش زیادی را نشان داد. بنابراین از ژن های کد کننده پروتئین های غیر ساختاری می توان به عنوان درمان جایگزین برای عفونت هپاتیت C استفاده کرد.(۵۸)

در سال ۲۰۱۴ ایجاد ایمنی با واکسن های DNA بیان کننده پروتئین غیر ساختاری ۲ (NS2) در موش های C57BL/6 بررسی شد. در این مطالعه اثر واکسن های DNA حاوی پروتئین NS2 و IL-12 بر موش های C57BL/6 مورد بررسی قرار گرفت. یافته ها نشان داد که ایمن سازی موش ها با پلاسمیدهای بیانی حاوی NS2 باعث القاء پاسخ CTL و تولید اینترفرون گاما و تکثیر لنفوسیت ها در مقایسه با نمونه کنترل می شود. همچنین نشان داده شد که حضور IL-12 با NS2 باعث القاء بهتر پاسخ ایمنی در موش ها می گردد. بنابراین نتیجه گرفته شد که DNA واکسن کاندید خوبی برای تحریک پاسخ ایمنی بر پایه CTL برضد ویروس هپاتیت C است. بعلاوه نتایج حاصل نشان می دهد که DNA واکسن و سیتوکاین های تحریک کننده پاسخ ایمنی می توانند پاسخ ایمنی اکتسابی علیه آنتی ژن را به طور چشمگیری افزایش دهند.(۵۹)

افزایش پاسخ ایمنی در برابر هپاتیت C در سال ۲۰۱۵ با استفاده از DNA واکسن حاوی ژن Core همراه وکتور بیانی اینترلوکین ۱۲، (IL-12) در موش ها در ایران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزودن اینترلوکین ۱۲ به عنوان ادجوانت موجب افزایش توانایی DNA واکسن حاوی Core برای تحریک پاسخ ایمنی می شود و باعث افزایش پاسخ لنفوسیت های T کشنده، تکثیر لنفوسیت ها، تغییر بازوی سیستم ایمنی به سمت فعال کردن Th-1 و در مجموع باعث بهبود پاسخ ایمنی حفاظتی می گردد. به طور خلاصه این مطالعه نشان داد که تزریق داخل عضلانی DNA واکسن به همراه اینترلوکین ۱۲، موجب افزایش قابل توجه پاسخ ایمنی سلولی در موش های C57BL/6 می شود.(۶۰)

در مطالعه ی دیگری در ایران در سال ۲۰۱۵، در پژوهشی به ساخت و ارزیابی یک سازه ی DNA بیان کننده ی پروتئین Core ویروس هپاتیت C متصل به آنتی ژن S ویروس هپاتیت B به عنوان یک کاندید واکسن پرداختند. ترکیب کردن آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B با ناحیه حفاظت شده پروتئین Core ویروس هپاتیت C برای تحریک پاسخ ایمنی هومورال و سلولی صورت گرفت. در واقع، DNA واکسن در مقابل واکسن های ساب یونیت (زیر واحدی) تهیه شد. بررسی نتایج نشان داد که پروتئین نوترکیب تولید شده در سلول های HEK293T که حدود 50KDs است، با افزایش سطح اینترفرون گاما پاسخ ایمنی را به طرف Th1 سوق می دهد. در حالی که DNA واکسن باعث تکثیر و پاسخ لنفوسیت های T کشنده می شود.(۶۱)

جدول ۲: مثال هایی از مطالعات انجام گرفته بر روی شامپانزه یا آزمایشات بالینی انسانی در زمینه واکسن ویروس هپاتیت C

نوع واکسن	مرحله مطالعات آزمایشگاهی	ایمونوژن-ادجوانت	منبع
پروتئین-پپتیدی	روی شامپانزه	E1E2	(۶۲)
پروتئینی	فاز ۱ (۳۰ نفر داوطلب)	Core-iscomatrix	(۶۳)
پروتئینی	فاز ۱ (۶۰ داوطلب)	E1E2-MF59C.1	(۶۴)
پروتئینی	فاز ۱/۲ (۱۲۸ داوطلب سالم و ۶۰ بیمار)	IC41-imiquimod	(۶۵)
لیپوپپتید ویروسی	روی شامپانزه	Core E1E2	(۶۶)
حامل DNA	روی شامپانزه	E2	(۶۷)
حامل ویروسی	روی شامپانزه	Ad6NSmut DNA-NSmut	(۶۸)
حامل ویروسی	فاز ۱ (۴۰ داوطلب)	Ad6NSmut ChAd3-NSmut	(۶۹)
حامل ویروسی	فاز ۱ (۱۵ بیمار)	TG4040	(۷۰)
حامل ویروسی	فاز ۲ (۱۵۳ بیمار)	TG4040+SOC	(۷۱)

کانیزارس[1] در سال ۲۰۱۴ و همکاران، واکسنی با عنوان CIGB-230 را طراحی کردند که در فاز اول مطالعات کلینیکی در حال بررسی است. القای پاسخ ایمنی اختصاصی ویروس هپاتیت C با استفاده از CIGB-230 به همراه اینترفرون آلفا و ریباویرین مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعات قبلی، نشان داده شده بود که CIGB-230 به عنوان DNA واکسن حاوی پروتئین های ساختاری ویروسی به همراه پروتئین Core قادر به تولید پاسخ آنتی بادی خنثی کننده و القای دوباره پاسخ ایمنی علیه Core ویروس است. در این مطالعه برای اولین بار تأثیر CIGB-230 و اینترفرون آلفا به علاوه ریباویرین و درمان های ضدویروسی بر روی پاسخ ایمنی علیه ویروس، در گروهی از بیماران دارای عفونت مزمن با ژنوتیپ ۱ بررسی شد. این درمان روی ۹۲ بیمار مبتلا به ویروس هپاتیت C با ژنوتیپ ۱ انجام شد. نتایج نشان داد که از هفته ۱۲ تا ۴۸ کاهش قابل توجهی در تعداد لکوسیت های بیماران به وجود می آید. از نظر آماری کاهش معنی داری در تیتر آنتی بادی ها دیده شد. اما آنتی بادی های خنثی کننده در افرادی که CIGB-230 را دریافت کرده بودند، تولید شد. نکته مهم این بود که کیفیت پاسخ ایمنی ایجاد شده توسط CIGB-230، وابسته به دوز و زمان تزریق و در ارتباط با درمان ضد ویروسی بود. به طور کلی ۶ بار تزریق به همراه درمان باعث افزایش آنتی بادی های خنثی کننده و ترشح مجدد اینترفرون گاما شد که با پاسخ پایدار ویروسی(SVR) مرتبط است. بنابراین چنین نتیجه گرفته شد که CIGB-230 به همراه اینترفرون آلفا موجب بهبود عملکرد پاسخ ایمنی در افراد مبتلا به عفونت مزمن هپاتیت C می شود. این مطالعه شواهدی را برای طراحی عوامل دارویی مؤثرتر در برابر ویروس هپاتیت C فراهم می کند. (۳۸) واکسن HCV بر پایه DNA به نام ChronVac-C در فاز ۲ مطالعات بالینی قرار دارد که اطلاعات دقیقی از این واکسن در دسترس نیست.(۱۵) لی[2] و همکاران یک DNA واکسن با توانایی تولید ایمنی سلولی (CMI) قوی در برابر پروتئین های NS4B، NS4A، NS3 و NS5B هپاتیت C تولید کردند. آنها با کدگذاری یک پروتئین سیتولیتیک، پروفورن (PRF) و آنتی ژن ها برروی یک پلاسمید، اثربخشی واکسن را در موش های C57BL/6 بررسی کردند، این اثربخشی توسط IFN-γ EliSpot، مطالعات تکثیر سلولی و تولید سیتوکین داخل سلولی تعیین شد. در ابتدا، نشان دادند که کدکردن پروتئین NS4A در یک واکسن که تنها NS3 را رمزگذاری می کند، ایمنی زایی NS3 را کاهش می دهد، اما هنگامی که با PRF همراه می شود موجب افزایش ایمنی-زایی NS3 می گردد، در مقابل افزودن NS4A در یک DNA واکسن کدکننده PRF ایمنی زایی پروتئین های NS4B، NS3 و NS5B را افزایش داد. در نهایت، واکسن های کد کننده PRF، پس از واکسیناسیون با DNA واکسن حاوی NS3، NS4B،NS4A و NS5B، در مقایسه با موش هایی که واکسینه شده با DNA واکسنی که تنها NS3 یا NS4B/5B را کد می نمود، سطوح ایمنی سلولی مشابهی در برابر هر پروتئین نشان داد. بنابراین، یک واکسن چندآنتی ژنی امیدوار کننده ای ایجاد شد که CMI قوی داشت. مطالعات انجام گرفته بر روی شامپانزه یا آزمایشات بالینی انسانی در زمینه واکسن ویروس هپاتیت C در جدول ۲ آمده است.

بحث:

پلاسمیدهای DNA کد کننده پروتئین های آنتی ژنی ویروس هپاتیت C و یا پپتیدهای اپی توپ با سایزهای مختلف می توانند پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را در بدن القاء کنند. پاسخ خاطره آنتی ژن اختصاصی در مطالعات حیوانی دیده شده است. تزریق داخل عضلانی و زیر جلدی به صورت ضعیفی پاسخ ایمنی را ایجاد می کند. برخی مطالعات نشان داده اند که ایمنی القاء شده در پریمات ها و یا انسان ها ضعیف تر از موش ها است. به منظور تحریک میزان انتقال داخل بدن از روش های مختلف ایمنی سازی مثل استفاده از الکتروپوراسیون ناحیه ای درون بدن در حیوانات آزمایشگاهی به کار رفته است. همه ی این رویکردها پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را نسبت به تزریق های داخل عضلانی و زیرجلدی علیه پروتئین های ویروسی بیشتر تحریک کرده است. پاسخ ایمنی میزبان

1. Canizares
2. Lee

علیه پروتئین های ویروسی را می توان با استفاده از ادجوانت هایی مثل Quila ، CpG یا تعدیل کننده های ایمنی مثل IL-2 یا IFN-α افزایش داد. موش های واکسینه شده با تعدیل کننده ها و یا ادجوانت ها پاسخ ایمنی هومورال و سلولی بهتری ایجاد می کنند. برخی از پروتئین های ویروسی می توانند به صورت مستقیم پاسخ ایمنی را سرکوب کنند. تغییر این پروتئین ها بدون حذف اپی توپ های آنتی ژنیک می تواند پاسخ مناسبی را تحریک کند. تغییراتی که در آنتی ژن های بیان شده با DNA واکسن ها به وجود آمده است، مثل فرم کوتاه شده پروتئین Core و یا فرم کوتاه شده و ترشحی پروتئین E2 و دستکاری پروتئین NS3/4A برای بهتر شدن خصوصیات ایمنی انجام شده است و باعث بهتر شدن پاسخ ایمنی نسبت به فرم طبیعی پروتئین گردیده است. مزیت اصلی استفاده از DNA واکسن، انعطاف پذیری بالای آنهاست که موجب استفاده از تکنیک های نوترکیبی و تکنیک های دیگر شده و باعث بهبود عملکرد DNA واکسن می شود.(۲)

توانایی تحریک سلول های +CD4 و +CD8 مهمترین ویژگی DNA واکسن است. همچنین این واکسن ها بهترین روش برای تاخوردن و تهیه پروتئین ها در میزبان های هترولوگ هستند. این یک ویژگی مهم برای آنتی ژن هایی مثل آنتی ژن های غشایی ویروس هپاتیت C است که برای عملکرد بیولوژیک خود به اصلاحات بعد از ترجمه و گلیکوزیلاسیون نیاز دارند. هچنین DNA واکسن راحت تر ساخته، نگهداری و در حجم بالا تولید می شوند و همچنین با خطر واکسن های زنده و تضعیف شده نیز همراه نیستند. علاوه بر اینها مطالعات نشان داده است که پس از چندین مرحله ایمن سازی، آنتی بادی ضد DNA ساخته نمی شود. خطرات همراه DNA مثل ایجاد تحمل ایمنوژنیکی، ورود DNA به ژنوم یا پتانسیل ایجاد بدخیمی تاکنون دیده نشده است. در واقع بیش از هزار ایمن سازی علیه پاتوژن های مختلف انسانی و نتایج آنها نشان می دهد که این واکسن ها بی خطر بوده و قابل تحمل هستند. ایمنی زایی با DNA یک ابزار قدرتمند برای مطالعه بیماری های مختلف از جمله ویروس هپاتیت C است. علاوه بر این تاکنون DNA واکسن ها برای بیماری های حیوانی تهیه شده است. درک نادرست، دانش ناکافی و مشکلات فن آوری و ایمنی زایی کم DNA واکسن های بدون پوشش مهمترین عوامل استفاده کمتر از DNA واکسن ها در انسان هستند. بیماری هایی مثل ایدز و هپاتیت C در صف DNA واکسن ها هستند. یکی از بهترین مزایای ایمن سازی با DNA تولید آسان و دستکاری آسان آن است.(۲و۳) اطلاعات قبلی نشان می دهد که استفاده از ادجوانت ها باعث القای بهتر پاسخ ایمنی می شود. ادجوانت های معمول مثل هیدروکسید آلومینیوم برای DNA مناسب نیستند، اما ادجوانت های دیگر مثل ادجوانت فروند و یا لیپوزوم، لیپوپپتید، ترکیبات پلی کاتیونیک، میکروذرات پلی(D-L لاکتیک- کو-گلیکولیک اسید) و نانوذرات با موفقیت بررسی شده اند.(۷۲و۷۳)

علیرغم تمام تلاش ها برای گسترش واکسن های درمانی علیه ویروس هپاتیت C در دهه گذشته هنوز هیچ واکسنی به فاز ۳ مطالعات کلینیکی نرسیده است. بیشتر مطالعات بالینی موجب کاهش سطح RNA سرمی و افزایش پاسخ ایمنی علیه آنتی ژن ها شده است، اما هنوز پاسخ درمانی قابل قبولی مشاهده نشده است. واکسن های پپتیدی/پروتئینی که ساخت و تهیه آنها راحت تر است. برای تحریک پاسخ ایمنی به ادجوانت های بهتری نیاز دارند. همچنین به صورت همزمان باید اثرات جانبی آنها را کاهش داد. واکسن های DNA به روش های بهتری برای عرضه نیاز دارند و واکسن وکتورهای ویروسی با مشکل پاسخ ضد وکتوری مواجه هستند. این مشکلات در تهیه واکسن های ضد سرطان نیز وجود دارد. با افزایش تعداد داروهای تحت مطالعه علیه هپاتیت C، ترکیب واکسن های درمانی و داروها می توانند در آینده در روند درمان قرار بگیرد. از آنجایی که هر درمانی می تواند تحت تأثیر دو فاکتور ویروس مثل ژنوتیپ، حضور کواسی اسپیشز و فاکتور میزبان مانند انواع HLA بیماران قرار بگیرد. این امر می تواند ارزش مطالعه ارتباط بین ویروس و فاکتورهای میزبانی را برای یافتن شرایط بهینه جهت درمان هر بیماری نشان دهد. برای بهبود راهکارهای واکسیناسیون، واکسن ها را می توان به صورت ترکیب با روش هایی که سیستم ایمنی و عملکرد کبد را تحریک می کنند، استفاده نمود. علاوه بر این لازم است که واکسن های درمانی بتوانند سیستم ایمنی فرسوده و خسته را با استفاده از پاسخ اختصاصی سلول های T مخصوص HCV و پاسخ متنوع و وسیع علیه اپی توپ ها تحریک کنند. در عین حال واکسن های درمانی باید بتوانند آنتی بادی خنثی کننده تولید کنند.

REFERENCES:

1. Bartenschlager R, Buhler S. Hepatitis C virus. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHVHV, editors. Encyclopedia of virology. 3rd ed: *Academic Press Inc* 2008;367-375.
2. Ip PP, Nijman HW, Wilschut J, Daemen T. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis C virus infection. *Antiviral* Res 2012;96:36-50.
3. Pauwels F, Mostmans W, Quirynen LM, van der Helm L, Boutton CW, Rueff AS, et al. Binding-site identification and genotypic profiling of hepatitis C virus polymerase inhibitors. *J Virol* 2007;81:6909-19.
4. Vezali E, Aghemo A, Colombo M. A review of the treatment of chronic hepatitis C virus infection in cirrhosis. *Clin Ther* 2010;32:2117-38.
5. Ashtari S, Vahedi M, Pourhoseingholi MA, Karkhane M, Kimiia Z, Pourhoseingholi A, et al. Direct medical care costs associated with patients diagnosed with chronic HCV. *Hepat Mon* 2013;13:e8415.
6. Carter J, Saunders V. Virology: principles and applications. 2nd ed. Chichester, England John Wiley & Sons Inc.;2007.
7. Roohvand F, Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, Part one: Advances in basic knowledge for hepatitis C virus vaccine design. *Expert Opin Ther Pat* 2011;21:1811-30.
8. Khodabandehloo M, Roshani D. Prevalence of hepatitis C virus genotypes in Iranian patients: a systematic review and meta-analysis. *Hepat Mon* 2014;14:e22915.
9. Karkhane M, Marzban A, Lashgarian HE, Zali MR. Genetic Variations in Host Factors and their Critical Role on HCV Medication. *Res Mol Med* 2017;5:6-16.
10. Merat S, Rezvan H, Nouraie M, Jafari E, Abolghasemi H, Radmard AR, et al. Seroprevalence of hepatitis C virus: the first population based study from Iran. *Int J Infect Dis* 2010; 14 suppl 3:e113-6.

11. Shahzamani K, Sabahi F, Merat S, Rezvan H, Samiee S, Karimi Arzanini M, et al. Development of a sensitive RT-Nested PCR method for detection of Hepatitis C virus. *Med J Modares* 2007;10:35-41.
12. Shahzamani K, Sabahi F, Merat S, Sadeghizadeh M, Lashkarian HE, Rezvan H, et al. Rapid low-cost detection of hepatitis C virus RNA in HCV-infected patients by real-time RT-PCR using SYBR Green I. *Arch Iran Med* 2011;14: 396-400.
13. Shahzamani K, Merat S, Rezvan H, Mirab-Samiee S, Khademi H, Malekzadeh R, et al. Development of a low-cost real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique for the detection and quantification of hepatitis C viral load. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:777-84.
14. Yahoo N, Sabahi F, Shahzamani K, Malboobi MA, Jabbari H, Sharifi H, et al. Mutations in the E2 and NS5A regions in patients infected with hepatitis C virus genotype 1a and their correlation with response to treatment. *J Med Virol* 2011; 83:1332-1.
15. Blight KJ, Kolykhalov AA, Reed KE, Agapov EV, Rice CM. Molecular virology of hepatitis C virus: an update with respect to potential antiviral targets. *Antivir Ther* 1998;3:71-81.
16. Joyce MA, Tyrrell DL. The cell biology of hepatitis C virus. *Microbes Infect* 2010;12:263-71.
17. Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, et al. Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog* 2010;6: e1001233.
18. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009;461:399-401.
19. Barth H, Schafer C, Adah MI, Zhang F, Linhardt RJ, Toyoda H, et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 2003;278:41003-12.
20. Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12766-71.
21. Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med* 2012;18:281-5.
22. Bartosch B, Thimme R, Blum HE, Zoulim F. Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2009;51:810-20.
23. Karkhane M, Mohebbi SR, Azimzadeh P, Niasar MS, Sarbazi MR, Sharifian A, et al. Lack of association between interleukin 28B gene polymorphisms (rs8099917G/T, rs12979860 C/T) and susceptibility to chronic hepatitis C virus infection, Tehran, Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2016; 9:S29.
24. Jabbari H, Bayatian A, Sharifi AH, Zaer-Rezaee H, Fakharzadeh E, Asadi R, et al. Safety and efficacy of locally manufactured pegylated interferon in hepatitis C patients. *Arch Iran Med* 2010;13:306-12.
25. Jabbari H, Zamani F, Hatami K, Sheikholeslami A, Fakharzadeh E, Shahzamani K, et al. Pegaferon in hepatitis C: Results of a Multicenter Study. *Middle East J Dig Dis* 2011;3:110-14.
26. Ahlen G, Soderholm J, Tjelle T, Kjeken R, Frelin L, Hoglund U, et al. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+ T cells. *J Immunol* 2007;179:4741-53.
27. Inchauspe G, Michel ML. Vaccines and immunotherapies against hepatitis B and hepatitis C viruses. *J Viral Hepat* 2007;14:97-103.
28. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962-73.
29. Merat S, Sharifi AH, Haj-Sheykholeslami A, Poustchi H, Fattahi B, Nateghi-Baygi A, et al. The Efficacy of 12 Weeks of Sofosbuvir, Daclatasvir, and Ribavirin in Treating Hepatitis C Patients with Cirrhosis, Genotypes 1 and 3. *Hepat Mon* 2017;17:e44564.
30. Chen KX, Njoroge FG. A review of HCV protease inhibitors. *Curr opinion Investigational drugs* 2009; 10:821-37.
31. Protease inhibitors show promise against HCV. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:11.
32. Clark VC, Peter JA, Nelson DR. New therapeutic strategies in HCV: second generation protease inhibitors. *Liver Int* 2013;33:80-4.
33. Pawlotsky JM. NS5A inhibitors in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol* 2013;59:375-82.
34. Asselah T. NS5A inhibitors: A new breakthrough for the treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011;5:1069-72.
35. Zeuzem S, Asselah T, Angus P, Zarski JP, Larrey D, Müllhaupt B, et al. Efficacy of the protease inhibitor BI 201335, polymerase inhibitor BI 207127, and ribavirin in patients with chronic HCV infection. *Gastroenterology* 2011;6: 2047-55.
36. Clay CM. Combination therapy for hepatitis C infection. *N Engl J Med* 1999;340:1207; author reply 1208-9.
37. Zeng R, Li G, Ling S, Zhang H, Yao Z, Xiu B, et al. A novel combined vaccine candidate containing epitopes of HCV NS3, core and E1 proteins induces multi-specific immune responses in BALB/c mice. *Antiviral Res* 2009;84:23-30.
38. Amador-Canizares Y, Martinez-Donato G, Alvarez-Lajonchere L, Vasallo C, Dausa M, Aguilar-Noriega D, et al. HCV-specific immune responses induced PMIDby CIGB-230 in combination with IFN-alpha plus ribavirin. *World J Gastroenterol* 2014;20:148-62.
39. Drane D, Maraskovsky E, Gibson R, Mitchell S, Barnden M, Moskwa A, et al. Priming of CD4+ and CD8+ T cell responses using a HCV core ISCOMATRIX vaccine: a phase I study in healthy volunteers. *Hum Vaccin* 2009;5:151-7.
40. El-Awady MK, El Gendy M, Waked I, Tabll AA, El Abd Y, Bader El Din N, et al. WITHDRAWN: Immunogenicity and safety of HCV E1E2 peptide vaccine in chronically HCV-infected patients who did not respond to interferon based therapy. *Vaccine* 2013. pii: S0264-410X(13)01065-7.
41. Frey SE, Houghton M, Coates S, Abrignani S, Chien D, Rosa D, et al. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* 2010;28:6367-73.
42. Yutani S, Komatsu N, Shichijo S, Yoshida K, Takedatsu H, Itou M, et al. Phase I clinical study of a peptide vaccination for hepatitis C virus-infected patients with different human leukocyte antigen-class I-A alleles. *Cancer Sci* 2009;100: 1935-42.
43. Huang XJ, Lu X, Lei YF, Yang J, Yao M, Lan HY, et al.

Cellular immunogenicity of a multi-epitope peptide vaccine candidate based on hepatitis C virus NS5A, NS4B and core proteins in HHD-2 mice. *J Virol Methods* 2013;189:47-52.

44. Tatsis N, Ertl HC. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* 2004;10:616-29.
45. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15661-8.
46. Fournillier A, Gerossier E, Evlashev A, Schmitt D, Simon B, Chatel L, et al. An accelerated vaccine schedule with a poly-antigenic hepatitis C virus MVA-based candidate vaccine induces potent, long lasting and in vivo cross-reactive T cell responses. *Vaccine* 2007;25:7339-53.
47. Joo CH, Lee U, Nam YR, Jung JU, Lee H, Cho YK, et al. Gene therapeutic approach for inhibiting hepatitis C virus replication using a recombinant protein that controls interferon expression. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54: 5048-56.
48. Cerundolo V, Hermans IF, Salio M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol* 2004;5:7-10.
49. Gowans EJ, Roberts S, Jones K, Dinatale I, Latour PA, Chua B, et al. A phase I clinical trial of dendritic cell immunotherapy in HCV-infected individuals. *J Hepatol* 2010;53:599-607.
50. Hilleman MR. Overview of the pathogenesis, prophylaxis and therapeusis of viral hepatitis B, with focus on reduction to practical applications. *Vaccine* 2001;19:1837-48.
51. Lechmann M, Murata K, Satoi J, Vergalla J, Baumert TF, Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* 2001;34:417-23.
52. Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, Hidalgo A, Cevallos W, Correa J. Safety, immunogenecity, and efficacy of an autoclaved Leishmania amazonensis vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 2004;22:1320-6.
53. Yazdanian M, Memarnejadian A, Mahdavi M, Sadat SM, Motevali F, Vahabpour R, et al. Immunization of Mice by BCG Formulated HCV Core Protein Elicited Higher Th1-Oriented Responses Compared to Pluronic-F127 Copolymer. *Hepat Mon* 2013;13:e14178.
54. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-8.
55. Duenas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Cesar Alvarez-Obregon J, Perez A, Acosta-Rivero N, Vazquez DM, et al. Enhancement of the immune response generated against hepatitis C virus envelope proteins after DNA vaccination with polyprotein-encoding plasmids. *Biotechnol Appl Biochem* 2002;35:205-12.
56. Weiland O, Ahlen G, Diepolder H, Jung MC, Levander S, Fons M, et al. Therapeutic DNA vaccination using in vivo electroporation followed by standard of care therapy in patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *Mol Ther* 2013;21:1796-1805.
57. Wada T, Kohara M, Yasutomi Y. DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model. *Vaccine* 2013;31:5968-74.
58. Saeedi A, Ghaemi A, Tabarraei A, Moradi A, Gorji A, Semnani S, et al. Enhanced cell immune responses to hepatitis C virus core by novel heterologous DNA prime/lambda nanoparticles boost in mice. *Virus Genes* 2014;49:11-21.
59. Alvarez-Lajonchere L, Duenas-Carrera S, Vina A, Ramos T, Pichardo D, Morales J. Additives and protein-DNA combinations modulate the humoral immune response elicited by a hepatitis C virus core-encoding plasmid in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:95-9.
60. Gorzin Z, Gorzin AA, Tabarraei A, Behnampour N, Irani S, Ghaemi A. Immunogenicity evaluation of a DNA vaccine expressing the hepatitis C virus non-structural protein 2 gene in C57BL/6 mice. *Iran Biomed J* 2014;18:1-7.
61. Yazdanian M, Memarnejadian A, Mahdavi M, Motevalli F, Sadat SM, Vahabpour R, et al. Evaluation of cellular responses for a chimeric HBsAg-HCV core DNA vaccine in BALB/c mice. *Adv Biomed Res* 2015;4:13.
62. Choo Q, Kuo G, Ralston R, Weiner A, Chien D, Van Nest G, et al. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1294-8.
63. Drane D, Maraskovsky E, Gibson R, Mitchell S, Barnden M, Moskwa A, et al. Priming of CD4+ and CD8+ T cell responses using a HCV core ISCOMATRIX™ vaccine: A phase I study in healthy volunteers. *Hum vaccines* 2009;5:151-7.
64. Frey SE, Houghton M, Coates S, Abrignani S, Chien D, Rosa D, et al. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* 2010;28:6367-73.
65. Taherkhani R, Farshadpour F. Global elimination of hepatitis C virus infection: Progresses and the remaining challenges. *World J Hepatol* 2017;9:1239-52.
66. Elmowalid GA, Qiao M, Jeong S-H, Borg BB, Baumert TF, Sapp RK, et al. Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:8427-32.
67. Ma X, Forns X, Gutierrez R, Mushahwar IK, Wu T, Payette PJ, et al. DNA-based vaccination against hepatitis C virus (HCV): effect of expressing different forms of HCV E2 protein and use of CpG-optimized vectors in mice. *Vaccine* 2002;20:3263-71.
68. Feinstone SM, Hu DJ, Major ME. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against hepatitis C virus. *Clin Infect Dis* 2012;55:S25-S32.
69. Chauhan V, Goyal K, Singh M. HCV Vaccine: How Far are we? *J Hum Virol Retrovirol* 2016;3:00084.
70. Wedemeyer H, Janczewska-Kazek E, Mazur WW, Stanciu C, Habersetzer F, Carreño V, et al. HCVAC study: antiviral activity of TG4040 therapeutic vaccine in genotype-1 chronic HCV patients. *Hepatology* 2011;54:989-90.
71. Ray K. Viral hepatitis: promising phase I trial results for TG4040 vaccine in patients with chronic hepatitis C. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:420.
72. Alvarez-Lajonchere L, Duenas-Carrera S. Advances in DNA immunization against hepatitis C virus infection. *Hum Vaccin* 2009;5:568-71.
73. Callendret B, Walker CM. Will there be a vaccine to protect against the hepatitis C virus? *Gastroenterology* 2012;142:1384-7.