

افزایش پاسخ سیستم ایمنی با تجویز همزمان الیگوداکسی نوکلئوتیدهای حاوی CpG و توکسوئید کزاز، در میکروسفر PLGA

*دکتر سید ابوالقاسم سجادی، دکتر محمود رضا جعفری، دکتر محسن تقفدی، *دکتر مانیش دیوان، دکتر جان ساموئل
*دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
**دانشکده داروسازی، دانشگاه آلبرتا، کانادا

خلاصه

یک گروه از ادجوانتهای قوی الیگوداکسی نوکلئوتیدهای (ODNs) سنتتیک حاوی جفت باز CpG هستند. تقریباً در تمام گزارشهایی که در مورد استفاده از CpG ODN و آنتی ژن منتشر شده است، شکل محلول این ادجوانت و آنتی ژن استفاده شده است. مشخص شده است که تجویز همزمان CpG-ODN و آنتی ژن به یک سلول ارائه دهنده آنتی ژن (APC) پاسخ ایمنی علیه آن آنتی ژن را افزایش می دهد. هدف این مطالعه انکیپسولاسیون همزمان توکسوئید کزاز (TT) و CpG-ODN درون میکروسفر PLGA (Poly(lactide-co-glycolide)) و بررسی پاسخهای ایمنی به دست آمده در اثر تجویز همزمان این دو به صورت انکیپسوله در یک میکروسفر است.

۲ Lf توکسوئید کزاز و ۴ میکروگرم CpG-ODN به صورت زیر جلدی به صورتهای زیر به گروههای چهارتایی از موش تزریق شد: (۱) TT و CpG-ODN به صورت انکیپسوله همزمان درون یک میکروسفر، (۲) TT انکیپسوله درون میکروسفر، (۳) TT انکیپسوله همراه با محلول CpG-ODN (غیر انکیپسوله)، (۴) محلول TT و CpG-ODN، (۵) محلول TT، (۶) جذب شده بر روی آلوم (واکسن معمول). سلولهای T جدا شده از موشهای گروه ۱ تکثیر بسیار بالایی از سلولهای T (ضریب تکثیر = ۴۵ در آزمون تکثیر سلولهای T) و همچنین تیترا بالایی از اینترفرون γ (۴۱/۱ pg/ml \pm ۲۶۹۴/۷) نشان دادند که به صورت معنی داری بالاتر از گروههای دیگر بود. سرم جدا شده از موشهای این گروه نیز تیترا بسیار بالایی از IgG ضد توکسوئید کزاز نشان دادند (end point titer = ۲۵۶۰۰۰۰) که برابر بیشتر از گروه این شده با محلول TT و CpG-ODN بود. همچنین تیترا IgG1، IgG2b و IgG3 به دست آمده از گروه ۱ به میزان قابل ملاحظه ای بالاتر از گروههای دیگر بود. قابل توجه این که پاسخ ایمنی ایجاد شده در موشهای تزریق شده با واکسن جذب شده بر روی آلوم بسیار کمتر از گروه ۱ بود. این مطالعات به وضوح نشان می دهد که تجویز همزمان TT و CpG-ODN به صورت انکیپسوله در یک میکروسفر ایجاد ایمنی بسیار بالایی از نوع Th1 (IgG2b، IgG3، INF- γ) و همچنین Th2 (IgG1) می نماید. براینکه پاسخ ایمنی بیشتر متمایل به سمت Th1 بود. این نتایج حاکی از این بود که تجویز همزمان CpG-ODN و آنتی ژن به صورت انکیپسوله در یک میکروسفر در مقایسه با تجویز محلول این دو، کارآیی بیشتری در تحریک پاسخ ایمنی دارد. کلمات کلیدی: توکسوئید کزاز، CpG، الیگوداکسی نوکلئوتیدها، میکروسفرها، آلوم، ادجوانت.

مقدمه

کمک می کنند. برخی از ادجوانتها در انکیپسولاسیون همزمان (co-entrapment) و ارائه همزمان (co-presentation) آنتی ژن و انواع دیگر ادجوانتها به یک APC نقش دارند و برخی دیگر روی سلولهای سیستم ایمنی اثر می کنند و فرآوری و ارائه یا شبکه سایتوکاین (cytokine) را تعدیل می نمایند (۱). DNA باکتری بر خلاف DNA مهره داران دارای اثرات تحریکی مستقیم روی سیستم ایمنی می باشد. این اثر به خاطر

ادجوانتها (Adjuvants) پاسخ ایمنی را از راههای مختلفی افزایش می دهند. برخی به عنوان یک سیستم تجویز (delivery system) که ایمنوژن را از تخریب محافظت می کند، عمل می کنند. برخی به رسانیدن آنتی ژنها به هدف مورد نظر و افزایش برداشت آنتی ژن توسط سلولهای ارائه دهنده آنتی ژن (Antigen presenting cells = APCs)

شاخه از ایمنی عیار بالای IgG2a و سایتوکاینهای نوع Th1 از جمله اینترلوکین ۱۲ و اینترفرون گاما است (۲۷، ۳۵، ۴۵). این مساله هنگام تجویز همزمان CpG-ODN با آنتی ژنهای مختلف مانند لیشمانیا ماژور (Leishmania major) (۴۰)، واکسن کوئزوگه پلی ساکاید- پروتئین پنوموکوکی (۶)، توکسوئید کزاز (۳۶) و HBsAg (۱۵) مشاهده شده است.

کاربرد درمانی ODNs دارای محدودیتهایی از جمله پایداری بیولوژیک کم، نیمه عمر کوتاه در جریان گردش خون و جذب سلولی محدود می باشد (۳۰). تغییرات شیمیایی انجام شده برای افزایش پایداری بیولوژیک و نیمه عمر بیشتر منجر به افزایش سمیت و کاهش فعالیت بیولوژیک شده است، به همین خاطر استفاده از یک سیستم تجویز برای محافظت ODNs در مقابل تجزیه و همچنین هدفدار کردن تجویز می تواند مفید باشد (۳۰).

مکانیسم اثر ادجوانتی CpG-ODN به خوبی مشخص نشده است. تحریک سیستم سلولهای B با CpG محلول و اتصال آن به گیرنده Toll-like شماره ۹ گزارش شده است (۱۸). از دست رفتن اثر تحریک ایمنی با ثابت و غیرمتحرک کردن CpG نشان داده شده است (۳۲). Yi و همکاران جذب سلولی CpG-ODN پس از جذب سطحی شدنش را گزارش کرده اند (۵۰). نتایج نشان می دهند که اتصال سطحی مولکولهای CpG برای ایجاد اثر آنها ضروری است ولی اثرات تحریک سیستم ایمنی احتمالاً پس از جذب آن توسط سلولها اعمال می شود. پس از وارد شدن به سلول، به سرعت مسیره های چندگانه علامت دهی فعال می شود. از جمله آنها می توان به تولید گونه های واکنشگر اکسیژن، فعالسازی مسیره های علامت دهی پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (mitogen-activated protein kinase) و فعالسازی پروتئین های تنظیم کننده نسخه برداری (transcription) همانند عوامل هسته ای کاپا B (kappa B) و AP-1 اشاره کرد (۱۶، ۲۹، ۳۳). چنانچه وارد سلول شدن CpG برای ایجاد اثراتش روی سیستم ایمنی ضروری باشد، به نظر می رسد وارد

حضور دی نوکلئوتید سیتوزین-گوانین (CpG)، P مابین G و C اشاره به پیوند فسفات دارد) درون یک زمینه مشخص از بازهای دیگر می باشد (به مجموع CpG و بازهای اطرافش اصطلاحاً CpG motif گفته می شود). CpG هایی که اثر تحریکی روی سیستم ایمنی دارند، معمولاً قبل از آنها ۲ باز پورین و ترجیحاً ApA و GpA و بعد از آنها دو باز پیریمیدین به ویژه TpT قرار می گیرد (۶، ۲۷، ۳۶، ۳۷، ۴۵). بر اساس اثر تحریک سیستم ایمنی مشاهده شده در DNA باکتری، الیگوداکسی نوکلئوتاید های (ODNs) حاوی CpG سنتز شده اند. این CpG-ODNs معمولاً دارای اسکلت فسفورو تیوات (phosphorothioate) هستند که مقاوم به نوکلئاز می باشد. در اسکلت فسفورو تیوات یک اکسیژن غیر پیوندی در اسکلت فسفودی استر با یک اتم گوگرد جایگزین شده است. تفاوت ODNs دارای این اسکلت با انواع دارای اسکلت فسفودی استر مقاومت در مقابل نوکلئاز و نقطه ذوب است (۳۱، ۳۵).

اثر تحریکی سیستم ایمنی توسط CpG-ODN از چند طریق اعمال می شود، از جمله به تحریک سلولهای B و در نتیجه تکثیر و تمایز این سلولها و ترشح ایمنوگلوبولینها (Igs)، اینترلوکین-۶ و ۱۲ (IL-6 و IL-12)؛ ایجاد مقاومت در مقابل آپوپتوزیس (apoptosis) ناشی از فعالیت؛ افزایش بیان MHC class II و مولکولهای هم تحریکی B7 که منجر به افزایش ارائه آنتی ژن می شود، می توان اشاره نمود. فعالسازی مستقیم سلولهای کشنده طبیعی (Natural Killer Cells=NKCs)، ماکروفاژها و سلولهای دندریتیک (DCs) توسط CpG-ODN منجر به ترشح سایتوکاینها و کموکاینهای (chemokines) متنوعی همانند اینترفرون گاما (INF- γ) و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF- α = tumor necrosis factor) می شود (۶، ۲۶، ۲۷، ۳۸، ۴۵). در این سازی تزریقی حیوانات با آنتی ژنهای مختلف دیده شده است که افزودن CpG-ODN بیشتر پاسخهای ایمنی از نوع سلولی [تحریک لنفوسیت های T-helper نوع اول (Th1)] را ایجاد می کند. مشخصه تحریک این

کردن CpG-ODN و آنتی ژن درون سیستم های دارورسانی ذره ای همانند میکروسفرهای PLGA می تواند باعث تحریک بیشتر سیستم ایمنی در مقایسه با CpG و آنتی ژن محلول شود. در بسیاری از تحقیقات محلولی از CpG و آنتی ژن برای این سازی استفاده شده است. تمامی این مطالعات نشان دهنده اثر ادجوانتی بالایی برای CpG-ODN بوده اند. مشخص شده است که انکیسولاسیون همزمان CpG-ODN و آنتی ژن در یک سیستم تجویز یا اتصال فیزیکی آنتی ژن به CpG-ODN باعث افزایش قابل توجه در پاسخ ایمنی می شود (۱۵، ۲۴، ۴۵).

مواد و روش کار

میکروسفر PLGA (Poly(lactide-co-glycolide)) یکی از پر کاربردترین سیستمهای آنتی ژن رسانی است. از مزایای عمده میکروسفرهای PLGA در این راستا می توان به موارد زیر اشاره کرد:

- ۱- این پلیمر زیست تجزیه پذیر (biodegradable) و زیست سازگار (biocompatible) است. این پلیمر دارای سابقه طولانی استفاده در پزشکی (به عنوان نخ بخیه و...) بوده و دارای مجوز برای استفاده در انسان می باشد (۲۱، ۳۹).
- ۲- میکروسفرهای PLGA با قطر کمتر از ۱۰ میکرون توسط سلولهایی نظیر ماکروفاژها برداشت می شوند و ارائه آنتی ژن به سیستم ایمنی را تسهیل می کنند (۱۷). این میکروسفرها در تحریک ایمنی سیستمیک و مخاطی و همچنین ایمنی هومورال و سلولی بسیار مؤثر بوده اند (۲۱).
- ۳- هنگام تجویز مخاطی یا تزریقی پلاسمید DNA و ODNs مشاهده شده است که با قرار دادن آنها درون میکروسفر PLGA، پایداری آنها نسبت به حالت آزاد در حد قابل توجهی افزایش می یابد و بنابراین میکروسفر PLGA می تواند به عنوان یک عامل محافظت کننده در مقابل تجزیه و همچنین کنترل کننده رهش مورد استفاده قرار گیرد (۱۷، ۲۱، ۳۰).
- ۴- مطالعات قبلی نشان داده است که روش امولسیون دوگانه w/o/w که در تهیه میکروسفر PLGA مورد استفاده قرار می گیرد، روی فعالیت بیولوژیک ODN اثر منفی نمی گذارد (۳۰). در این تحقیق این فرضیه که تجویز همزمان آنتی ژن و

CpG-ODN با استفاده از سیستمهای دارورسانی می تواند باعث تحریک بیشتر سیستم ایمنی در مقایسه با CpG و آنتی ژن محلول شود. در بسیاری از تحقیقات محلولی از CpG و آنتی ژن برای این سازی استفاده شده است. تمامی این مطالعات نشان دهنده اثر ادجوانتی بالایی برای CpG-ODN بوده اند. مشخص شده است که انکیسولاسیون همزمان CpG-ODN و آنتی ژن در یک سیستم تجویز یا اتصال فیزیکی آنتی ژن به CpG-ODN باعث افزایش قابل توجه در پاسخ ایمنی می شود (۱۵، ۲۴، ۴۵).

میکروسفر PLGA (Poly(lactide-co-glycolide)) یکی از پر کاربردترین سیستمهای آنتی ژن رسانی است. از مزایای عمده میکروسفرهای PLGA در این راستا می توان به موارد زیر اشاره کرد:

- ۱- این پلیمر زیست تجزیه پذیر (biodegradable) و زیست سازگار (biocompatible) است. این پلیمر دارای سابقه طولانی استفاده در پزشکی (به عنوان نخ بخیه و...) بوده و دارای مجوز برای استفاده در انسان می باشد (۲۱، ۳۹).
- ۲- میکروسفرهای PLGA با قطر کمتر از ۱۰ میکرون توسط سلولهایی نظیر ماکروفاژها برداشت می شوند و ارائه آنتی ژن به سیستم ایمنی را تسهیل می کنند (۱۷). این میکروسفرها در تحریک ایمنی سیستمیک و مخاطی و همچنین ایمنی هومورال و سلولی بسیار مؤثر بوده اند (۲۱).
- ۳- هنگام تجویز مخاطی یا تزریقی پلاسمید DNA و ODNs مشاهده شده است که با قرار دادن آنها درون میکروسفر PLGA، پایداری آنها نسبت به حالت آزاد در حد قابل توجهی افزایش می یابد و بنابراین میکروسفر PLGA می تواند به عنوان یک عامل محافظت کننده در مقابل تجزیه و همچنین کنترل کننده رهش مورد استفاده قرار گیرد (۱۷، ۲۱، ۳۰).
- ۴- مطالعات قبلی نشان داده است که روش امولسیون دوگانه w/o/w که در تهیه میکروسفر PLGA مورد استفاده قرار می گیرد، روی فعالیت بیولوژیک ODN اثر منفی نمی گذارد (۳۰). در این تحقیق این فرضیه که تجویز همزمان آنتی ژن و

مواد: الیگو داکسی نوکلئوتید حاوی CpG (شماره ۱۸۲۶، سکانس (۳-۵): TCCATGACGTTCTGACGTT) از شرکت Operon Technologies (Alameda, CA, USA) خریداری شد. توکسوئید کزاز (۹۰۰ Lf/ml) و توکسوئید کزاز جذب شده بر آلوم (۵۰ Lf/ml) از موسسه رازی (کرج، ایران) دریافت شد. کپلیمر PLGA (۵۰:۵۰) از شرکت BPI (Birmingham, AL, USA) خریداری شد. پلی وینیل الکل (PVA، ۸۷-۸۹٪ هیدرولیز شده) با وزن مولکولی ۳۱۰۰۰-۵۰۰۰۰ g/mol از Aldrich (Milwaukee, WI, USA) تهیه شد. واکنشگرهای مورد استفاده در تعیین مقدار سایتوکاینها (IFN- γ و IL-4) از شرکت Biomira (Edmonton, Alberta, Canada) خریداری شدند.

تهیه میکروسفرهای حاوی توکسوئید کزاز (TT) و CpG ODN: میکروسفرها با استفاده از روش امولسیون دوگانه w/o/w و تبخیر حلال تهیه شدند (۳۹). ۶۰ میکرولیتر از محلول CpG-ODN در بافر تریس-EDTA (TE buffer، pH ۸/۳، ۱۰ mM) با ۶۰ میکرولیتر از محلول TT در بافر PBS که حاوی ۶۴ Lf TT بود، با هم مخلوط شدند. مخلوط این دو به ۶۰۰ میکرولیتر محلول ۳۰٪ w/v PLGA در کلروفورم اضافه شد. برای تهیه امولسیون w/o اولیه، مخلوط فوق به مدت ۲۰ ثانیه با استفاده از یک پروب سونیکاتور (Heat Systems Inc., XL2010, USA) امولسیون شد. این امولسیون با ۴ ml از محلول ۷/۵ w/v از PVA در PBS مخلوط و با انجام ۴۰ ثانیه سونیکاسیون،

مقدار مشخصی از محلول CpG-ODN مخلوط و فرایند استخراج همانند بالا بر روی آنها انجام شد.

تعیین مقدار توکسوئید کزاز (TT) انکپسوله شده درون میکروسفرها: برای استخراج TT از میکروسفرها روش مشابه روش بالا استفاده شد. تنها برای حل کردن رسوب TT به جای استفاده از بافر TE از بافر PBS استفاده شد. مقدار TT با استفاده از روش پروتئین اسی میکرو-BCA (Micro-BCA protein assay) اندازه گیری شد. صحت این روش استخراج برای TT همانند روش ذکر شده برای CpG-ODN بررسی شد.

بررسی رهش برون تن: ۲۵ mg میکروسفر PLGA حاوی TT در ۶۰۰ میکرولیتر بافر PBS با pH ۷/۴ سوسپانسیون شد. سوسپانسیون در شیکر-انکوباتور 37°C در حال همزدن ملایم قرار داده شد و در فواصل زمانی معین، پس از سانتیفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm، ۵۰۰ μl از مایع رویی برداشته شده و تا انجام تعیین مقدار نهایی در فریزر نگهداری شد. پس از افزودن ۵۰۰ میکرولیتر بافر تازه به میکروسفرها و سوسپانسیون کردن میکروسفرها، به هم زدن در 37°C ادامه یافت. این مطالعه به مدت یک ماه ادامه داشت. مقدار TT رهش شده درون PBS با استفاده از روش تعیین مقدار پروتئین میکرو-BCA اندازه گیری می شد.

رهش CpG-ODN نیز با سوسپانسیون کردن مقدار مشابه از میکروسفرهای حاوی CpG-ODN درون بافر TE بررسی شد. مقدار CpG-ODN آزاد شده درون بافر با اندازه گیری جذب محلول در ۲۶۰ nm تعیین مقدار شد.

ایمن سازی موشها: برای مطالعات درون تن از موشهای نژاد C57BL/6 با سن ۲۰-۱۶ هفته استفاده شد. به هر موش ۲ Lf توکسوئید کزاز و ۴ میکروگرم CpG-ODN در روزهای صفر و ۷ تزریق شد.

واکسنهای ۶ گانه زیر (۴ موش در هر گروه) برای مطالعات استفاده شد:

امولسیون ثانویه w/o/w تشکیل شد. این امولسیون ثانویه به صورت قطره قطره به یک بشر حاوی ۱۶ ml محلول PVA w/v ۷/۵٪ اضافه شد. عمل هم زدن امولسیون به مدت ۲-۱/۵ ساعت تا تبخیر کامل کلروفرم ادامه یافت. میکروسفرها با سانتیفوژ در ۱۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه جدا شدند و دو بار با آب دیونیزه شستشو داده شدند. در نهایت میکروسفرها در ۱-۲ ml آب دیونیزه سوسپانسیون شدند و پس از انجماد با مخلوط یخ خشک-استن، فریز-درای شدند (۳۹).

بررسی خصوصیات میکروسفرهای PLGA

اندازه ذره ای: مقدار کمی میکروسفر (حدود ۱ mg یا کمتر) درون آب دیونیزه فیلتر شده سوسپانسیون شد و توزیع ذره ای به وسیله روش پراش اشعه ایکس و با دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر (Particle Size Analyzer, Zetasizer 2000, Malvern, UK) بررسی شد.

تعیین مقدار CpG-ODN انکپسوله شده درون میکروسفرها: با توجه به روش تعیین مقدار CpG-ODN که اندازه گیری جذب در ۲۶۰ nm می باشد (۴) و با توجه به تداخل TT در این طول موج، میکروسفرهای PLGA که تنها دارای CpG-ODN بودند با روش مشابه میکروسفرهای حاوی TT و CpG-ODN ساخته شدند. ۵ mg از این میکروسفرهای فریز-درای شده به ۰/۵ میلی لیتر استونیتریل افزوده و با هم زدن به مدت نیم ساعت حل شدند. CpG-ODN رسوب کرده در این حلال با سانتیفوژ در ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه جداسازی شد. پس از دور ریختن استونیتریل حاوی PLGA و تبخیر باقیمانده استونیتریل با استفاده از جریان هوا، ۰/۵ ml بافر TE به رسوب، مقدار CpG-ODN با استفاده از بررسی جذب در ۲۶۰ nm و در حضور متحنی استاندارد مربوط به غلظتهای مختلف CpG-ODN تعیین شد. برای بررسی صحت این روش استخراج ۵ mg از میکروسفر PLGA فاقد CpG-ODN با

افزایش پاسخ ایمنی در برابر توکسوئید کزاز توسط CpG-ODN

درون محیط کشت تکمیل شده RPMI 1640 (حاوی ۱ mM/l Gibco BRL, Ontario, Canada) گلوتامین، $20/55 \mu\text{M}$ -مرکاپتوتانول، ۵۰ IU پنی سیلین، $50 \mu\text{g}$ استرپتومایسین، ۷۵ mg جنتامایسین و ۱۰٪ سرم جنین گاوی) وارد شدند. برای جداسازی سلولهای T، سلولهای غدد لنفاوی از ستونهای حاوی پشم نایلون (nylon wool) گذرانیده شدند. برای شستشوی ستونهای حاوی سلولهای لنفاوی و جداسازی سلولهای T از محیط کشت تکمیل شده RPMI 1640 استفاده شد. سلولهای T خالص شده در $200 \times$ به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ شدند و سپس با غلظت 10^7 سلول در هر میلی لیتر، در محیط RPMI 1640 تکمیل شده سوسپانسیون شدند. به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه کشت سلولی 5×10^5 سلول T، $2/5$ میکروگرم آنتی ژن و 1×10^6 سلول ارائه دهنده آنتی ژن (APCs) اضافه شد.

برای تهیه APCs یک گروه ۸ تایی از موشهای تزریق نشده کشته شدند و طحال آنها در شرایط استریل خارج و پس از هموژن و سوسپانسیون کردن در محیط کشت تکمیل شده RPMI 1640 تحت تابش 300 rad اشعه رادیواکتیو از منبع سزیوم 137 قرار داده شدند. در این زمان تشعشع، ضمن زنده باقیماندن سلولهای APC، قدرت تکثیر این سلولها از بین می رود (۱۴، ۳۹).

سلولهای طحال پس از تشعشع، به مدت ۷ دقیقه در $200 \times$ سانتریفوژ شدند و سپس در محیط کشت تکمیل شده RPMI 1640 سوسپانسیون شدند. غلظت سلولها در محیط کشت به گونه ای تنظیم شد که برای افزودن 10^7 سلول به هر خانه پلیت مناسب باشد. سلولهای APC استخراج شده از طحال حیوان، در محیط کشت آنتی ژن را فراوری کرده و به سلولهای T ارائه می دهند. به دلیل از دست رفتن قدرت تکثیر این سلولها در اثر تشعشع رادیواکتیو، در محیط کشت تنها سلولهای T تکثیر پیدا می کنند (۱۴، ۳۹).

آنتی ژنهای اضافه شده شامل TT به عنوان آنتی ژن مربوط و BSA به عنوان آنتی ژن نامربوط بود. به خانه هایی

گروه ۱- میکروسفرهای حاوی توکسوئید کزاز و CpG-ODN ($(\text{TT} + \text{CpG})_{\text{ms}}$)

گروه ۲- میکروسفرهای حاوی TT ($(\text{TT})_{\text{ms}}$)

گروه ۳- میکروسفرهای حاوی TT مخلوط با محلول CpG-ODN ($(\text{TT})_{\text{ms}} + \text{CpG}$)

گروه ۴- محلول TT + محلول CpG-ODN ($\text{TT} + \text{CpG}$)

گروه ۵- محلول TT (TT)

گروه ۶- TT جذب شده بر روی آلوم (Alum-TT)

تزریق به هر موش در روزهای صفر، ۷ و ۱۲ صورت گرفت. برای تزریق میکروسفر به موشها، 5 mg میکروسفر درون $100 \mu\text{l}$ بافر PBS سوسپانسیون شد و $50 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون در ناحیه contra-lateral هر یک از پاهای عقب به صورت زیر جلدی تزریق شد. در مورد گروههای فاقد میکروسفر، حجم محلول $100 \mu\text{l}$ در نظر گرفته شد و به طریق بالا تزریق گردید.

سنجش های ایمنی

سنجش تکثیر سلولهای T (T-cell proliferation assay=TCP):

اختصاصی بودن پاسخ ایمنی ناشی از میکروسفرهای حاوی آنتی ژن با استفاده از این آزمایش تعیین می شود. در این روش ex vivo سلولهای T با آنتی ژنهایی که قبلاً با آنها تماس داشته اند و همچنین آنتی ژنهای نامربوط به عنوان شاهد منفی مورد چالش قرار می گیرند. برحسب سابقه قبلی تماس سلولهای T با آنتی ژن مورد نظر (TT)، حضور آنتی ژن به عنوان یک محرک عمل می نماید و باعث تکثیر سلولهای T می شود. بنابراین هرچه سیستم آنتی ژن رسانی و ادجوانت مربوطه بهتر آنتی ژن را به سیستم ایمنی ارائه داده باشند، سلولهای T در هنگام تماس با TT در محیط کشت، تکثیر بیشتری از خود نشان خواهند داد.

در روز ۱۲ پس از دومین تزریق، موشها به روش خفه کردن با گاز CO_2 و جابجایی گردن (CO_2 asphyxiation-cervical dislocation) کشته شدند. غدد لنفاوی ناحیه inguinal در شرایط استریل برداشته شد و سلولهای لنفاوی

چاهک از پلیت ۵۰ میکرولیتر اضافه شد. پلیت ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور 37°C قرار داده شدند و یک بار شستشو داده شدند. ۵۰ میکرولیتر از مایعات برداشت شده از محیط کشت بدون رقیق شدن به هر چاهک اضافه شد. برای ترسیم منحنی استاندارد برای هر یک از سایتوکاینها، غلظتهای $156-5000$ pg/ml از IFN- γ و $13-1666$ pg/ml از IL-4 نوترکیب به عنوان استاندارد به خانه های جداگانه اضافه شدند ($50 \mu\text{l/well}$) (۱۴، ۳۹).

پلیتها مجدداً به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه و ۲ بار شستشو داده شدند. سپس $50 \mu\text{l}$ از آنتی بادی ثانویه بیوتینیل شده (biotinylated) اینترفرون گاما (XMG1.2) $0.5 \mu\text{g/ml}$ و اینترلوکین ۴ (BVD6.24G2) $0.5 \mu\text{g/ml}$ به هر خانه اضافه شد. پس از ۴۵ دقیقه انکوباسیون و ۳ بار شستشو، به هر چاهک $50 \mu\text{l}$ از محلول $0.2 \mu\text{g/ml}$ از استرپتاویدین کتزوگه با پروکسیداز (peroxidase-conjugated streptavidin) اضافه شد. پلیت ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور 37°C گذاشته و ۴ بار شستشو داده شدند. به عنوان معرف رنگ زا، نسبتهای مساوی از محلولهای A (TMB) - (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) و B (هیدروژن پروکساید) از سوبسترای peroxidase-TMB مخلوط 100 میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد. پس از ظهور رنگ با نگهداری پلیتها در تاریکی، واکنش رنگ زایی با افزودن $100 \mu\text{l/well}$ از اسید فسفوریک 1 M متوقف شد و جذب محلولها با استفاده از الیزا ریدر (ELISA Reader, Molecular Devices, USA) در 450 nm خوانده شد (۱۴، ۳۹).

تعیین مقدار آنتی بادیهای ضد TT: مقدار آنتی بادیهای ضد TT در سرم موشها با الیزا و به روش تیتراسیون ختم عمل (end point titration) اندازه گیری شد (۹). پلیتهای ۹۶ خانه الیزا با $100 \mu\text{l/well}$ از محلول 0.1 w/v از TT در بافر فسفات 0.5 M ($\text{pH } 7.4$) روکش داده و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور 37°C قرار داده شد. پس از شستشوی پلیت، محلهای واکنش نداده با افزودن $300 \mu\text{l/well}$ از محلول

از پلیت که به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شده بودند، مقدار 150 ng ماده کونکاناوالین A (concanavalin A) که یک ماده میتوزن قوی است و باعث تکثیر سلولهای T خواهد شد، اضافه گردید. شاهد منفی خانه هایی بودند که تنها حاوی سلولهای T و سلولهای APC هستند و هیچ گونه آنتی ژن به آنها اضافه نشده بود.

هریک از آنتی ژنها و شاهدها در سه ردیف از خانه های پلیت افزوده شدند. پلیت ها به مدت ۷۲ ساعت درون انکوباتور 37°C دارای $5\% \text{ CO}_2$ قرار داده شدند. پس از این مدت تایمیدین نشاندار با ترتیوم (^3H -labeled thymidine) به خانه های پلیت اضافه شد ($1 \mu\text{Ci/well}$) و پلیت ها مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در شرایط $5\% \text{ CO}_2$ و 37°C انکوبه شدند. پس از این مدت با استفاده از دستگاه سل هاروستر (cell harvester) سلولها بر روی صافی های filtermat برداشت شدند. در این فرایند سلولهای موجود در محیط کشت (سلولهای T و سلولهای APC) بر روی صافی جمع می شوند و بقیه اجزاء محیط کشت از طریق شستشو های مکرر، شسته و حذف شدند. سپس فیلتر درون دستگاه بتا کاتر قرار داده شد و مقدار تایمیدین نشاندار وارد شده به سلولهای در حال تکثیر اندازه گیری و برحسب شمارش در دقیقه (decay count per minute = CPM) گزارش می شود. با توجه به این که تنها سلولهای T قدرت تکثیر دارند، این پارامتر نشان دهنده میزان تکثیر سلولهای T خواهد بود (۱۴، ۳۹).

جمع آوری و تعیین مقدار سایتوکاینها: در یک پلیت ۹۶ خانه آنتی ژنها و سلولهای مشابه با پلیت مورد استفاده در تکثیر سلولهای T اضافه شد. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون اولیه، مایع موجود در خانه های محیط کشت ($300 \mu\text{l}$) برداشت شد و مقدار اینترفرون گاما و اینترلوکین-۴ (IL-4) موجود در آنها با استفاده از یک روش ساندریج الیزا تعیین مقدار شد.

برای تعیین مقدار این سایتوکاینها از پلیت ۹۶ خانه الیزا استفاده شد. ابتدا آنتی بادی اولیه مربوط به IFN- γ (R46A2) و IL-4 (11B11) به ترتیب تا غلظت $1/5$ و 0.5 میکروگرم در میلی لیتر در PBS رقیق شدند و به هر

آنالیز آماری: آنالیز آماری به وسیله unpaired t-test انجام شد.

نتایج

میکروسفرهای حاوی TT, CpG

اندازه ذره ای میکروسفرهای حاوی TT و CpG یا TT تنها به وسیله آنالیز کننده اندازه ذره ای تعیین شد. قطر میانگین حجمی میکروسفرها $1/5 - 1/1 \mu m$ بود. درصد انکپسولاسیون توکسوئید کزاز در میکروسفرهای PLGA $73/5\%$ و مقدار TT موجود در میکروسفرها $0/24 Lf/mg$ بود. درصد انکپسولاسیون برای CpG-ODN $53/3\%$ و مقدار موجود در میکروسفرها $0/8 \mu g/ml$ بود. مقدار میکروسفر به دست آمده برابر 85% w/w وزن اولیه PLGA مصرفی بود. برای معتبر سازی فرایند دو مرحله ای استخراج با استفاده از استونیتریل، مقدار معینی TT و CpG-ODN به میکروسفر PLGA خالی اضافه و فرایند استخراج تکرار گردید. نتیجه این روش برای TT و CpG-ODN به ترتیب برابر $11/3 \pm 10/7\%$ و $10/3 \pm 4/5\%$ بود.

بررسی رهش برون تن TT و CpG-ODN از میکروسفرهای PLGA

با بررسی شکل A-1 مشخص می شود که حدود $2/04 \pm 9/6\%$ از توکسوئید در 30 دقیقه اول به درون محیط رهش آزاد شده است. پس از 30 روز، $20/5 \pm 0/76\%$ از مقدار TT موجود در میکروسفر به درون محیط رهش آزاد شده است.

رهش CpG-ODN از میکروسفرها بسیار سریعتر از TT بود. این مسئله به دلیل جرم مولکولی کمتر CpG ODN ($6363 Da$) در مقایسه با TT ($15000 Da$) است.

با رجوع به شکل A-2 مشخص می شود که پس از یک رهش اولیه 18 درصدی، مقدار کل رهش پس از اتمام دوره 12 روزه آزمایش برابر $2/4 \pm 54\%$ مقدار انکپسوله شده بود. این احتمال وجود دارد که سرعت تجزیه پلیمر و در نتیجه رهش پروتئین در درون تن سریعتر باشد. با بررسی محل تزریق زیرجلدی میکروسفرها در موش، پس از گذشت 12 روز میکروسفری در محل باقی نمانده بود.

1 w/v آلومین سرم گاو (BSA) و انکوباسیون به مدت 60 دقیقه در انکوباتور $37^\circ C$ مهار شدند. پس از دو بار شستشوی پلیت ها، سرمهای مورد آزمایش (هر نمونه در 2 خانه) اضافه شدند. سرمهای اضافه شده شامل سرم طبیعی که از موشهای این نشده گرفته شده بود (شاهد منفی) و سرم مربوط به گروههای 6 گانه مورد آزمایش بود.

یک سری رقت از هر یک از سرمها به پلیت ها اضافه شد و پلیت ها به مدت 60 دقیقه در انکوباتور $37^\circ C$ قرار داده شدند. پس از 3 بار شستشوی پلیت ها، 100 میکرولیتر از رقتهای مناسب از آنتی بادهای بزی ضد IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b و IgG3 (به صورت کنژوگه با پراکسیداز) به پلیتهای مختلف اضافه شد و پلیت ها به مدت 60 دقیقه در $37^\circ C$ انکوبه شدند (برای هر آنتی بادی یک پلیت جداگانه استفاده شد). پس از 4 بار شستشوی پلیت ها $100 \mu l$ واکنشگر رنگی TMB به هر چاهک اضافه شد. پس از ظهور رنگ مناسب، واکنش رنگ زایی با افزودن $50 \mu l/well$ از اسید فسفریک $1 M$ متوقف و جذب ها در $450 nm$ اندازه گیری شد. در تمام شستشوهایی انجام شده از بافر $0/05 M$ PBS ($7/4 pH$) که حاوی $0/2 v/v$ تویین 20 بود، استفاده شد. بالاترین رقت سرم که جذبی 2 برابر بیشتر از سرم فاقد آنتی بادی داشت به عنوان رقت ختم عمل در نظر گرفته شد. برای بررسی تکرار پذیری روش، در هر پلیت یک نمونه از سرم موش هیپرایمیون در مقابل TT اضافه شد.

نسبت عیار IgG2b: IgG2a برحسب سویه موش مورد استفاده تفاوت می کند. به عنوان مثال در موشهای A/J، عیار IgG2a بالاتر از IgG2b است، حال آن که در موشهای C57BL/6 عکس این حالت است و عیار IgG2b بسیار بیشتر است (42).

ژن مسئول IgG2a در موشهای C57BL/6 کاملاً متفاوت با ژن کنترل کننده در موشهای Balb/c است. واکنشگرهای تجارقی برای IgG2a واکنش کاملی با این ایزوتایپ در سویه های C57BL/6 نمی دهند (14، 34). به همین خاطر در بررسی نتایج بیشتر بر روی IgG2b تأکید شده است.

جدول ۱. تولید *ex vivo* اینترفرون گاما به وسیله سلولهای T به دست آمده از موشهای واکسینه شده با TT و CpG-ODN.

نوع واکسن	IFN- γ (pg/ml) \pm SD	P
گروه ۱: میکروسفر حاوی CPG , TT	۲۶۹۴/۷ \pm ۴۱/۱	-
گروه ۲: میکروسفر حاوی TT	۱۰۴۹/۴ \pm ۲۵/۳	$4/9.09 \times 10^{-7}$
گروه ۳: میکروسفر حاوی TT + محلول CpG	۱۹۳۵/۶ \pm ۵۷/۹	$5/0.00 \times 10^{-5}$
گروه ۴: محلول TT + محلول CpG	۸۱۴/۷ \pm ۵۰/۲	$9/0.00 \times 10^{-7}$
گروه ۵: محلول TT	۶۲۵/۹ \pm ۲۳/۹	$3/2.00 \times 10^{-7}$
گروه ۶: Alum TT	۶۲۵/۹ \pm ۲۳/۹	$1/85.00 \times 10^{-7}$
موشهای تزریق نشده (خطای زمینه ای)	۱۳۷/۲ \pm ۲۹/۱	-

هر خانه مورد آزمایش دارای 1×10^6 APCs از موشهای ایمن نشده و 1×10^6 سلول T از موشهای مورد آزمایش در $300 \mu\text{l}$ محیط تکمیل شده RPMI 1640 بود. IFN- γ موجود در مایع رویی محیط کشت پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در مجاورت TT (به عنوان آنتی ژن فراخوان) تعیین مقدار شد. خطای زمینه ای آزمایش مقدار IFN- γ ترشح شده در غیاب هرگونه آنتی ژن فراخوان در نظر گرفته شد. این مقادیر برای هر گروه محاسبه و میانگین محاسبه شد. تست Student t برای تعیین میزان معنی دار بودن در گروههای مختلف در مقایسه با گروه ۱ استفاده شد.

سنجش تکثیر سلولهای T (TCP assay)

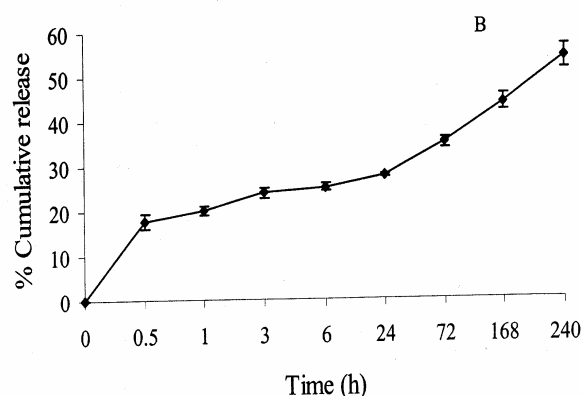
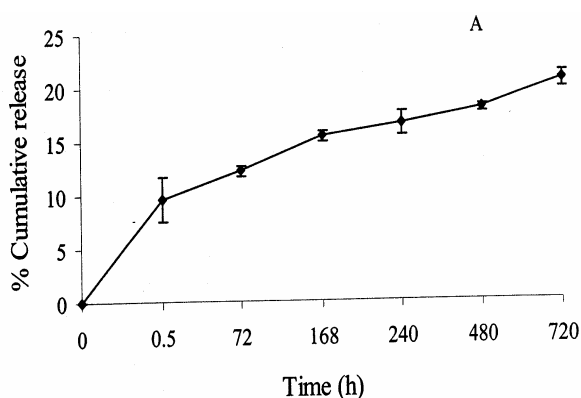
اختصاصی بودن پاسخ ایمنی با اندازه گیری تکثیر سلولهای T جدا شده از موشهای ایمن شده با TT و CpG ODN به صورت انکپسوله در میکروسفر یا محلول تعیین شد. به عنوان آنتی ژن فراخوان (recall antigen) از توکسوئید کزاز و یک پروتئین غیرمرتبط (BSA) استفاده شد. شکل A-۳ نشان دهنده مقادیر نسبی از تاییدین ملحق شده در نفوسیتهای T تقسیم شده در پاسخ به آنتی ژنهای مختلف است. مقدار تاییدین نشاندار شده با ترتیوم بر حسب CPM بیان شده است. سلولهای T جدا شده از موشهای ایمن شده با میکروسفرهای حاوی TT و CpG-ODN (گروه یک شکل A-۳-۱) در پاسخ به آنتی ژن TT پاسخ تکثیری شدیدی نشان داده اند در حالی که در حضور یک آنتی ژن غیر مرتبط (BSA) پاسخ تکثیری بسیار اندکی مشاهده شد. در آزمایشهای جداگانه دیگر، چند آنتی ژن غیر مرتبط دیگر از جمله لیزوزیم تخم مرغ، آلبومین سرم انسان (HSA) و اوالبومین مورد آزمایش قرار گرفتند

و در هیچ یک از این گروهها نیز پاسخ تکثیری اختصاصی مشاهده نشد (ضریب تکثیر $1/8-1$). ضریب تکثیر (SI=stimulation index) عبارتست از نسبت CPM در گروه مورد نظر به CPM خانه هایی که فاقد آنتی ژن و تنها دارای APC هستند. ضریب تکثیر سلولهای T به دست آمده از گروه ۱ برابر با ۴۵ بود که این مقدار در حد قابل توجهی بیشتر از بقیه گروهها شامل میکروسفرهای حاوی TT (گروه ۲)؛ مخلوط میکروسفرهای حاوی TT و محلول CpG-ODN (گروه ۳)؛ محلول TT و CpG-ODN (گروه ۴)؛ محلول TT (گروه ۵) و TT جذب شده بر سطح آلوم (گروه ۶) بود. همانگونه که در شکلهای A-۳-۲ تا A-۳-۶ مشخص شده است، در تمامی گروهها هنگامی که CpG-ODN به TT (انکپسوله یا محلول) اضافه می شود، پاسخ بالاتری نسبت به محلول TT به تنهایی دیده می شود. این یافته ها به وضوح نشان می دهند که وارد کردن TT درون میکروسفر در مقایسه با محلول TT به تنهایی اثر ایمنی زایی بیشتری دارد (مقایسه گروه ۲ و گروه

افزایش پاسخ ایمنی در برابر توکسوئید کزاز توسط CpG-ODN

تنها محلول TT به آنها تزریق شده بود، مقدار IFN- γ در حد خطای زمینه ای آزمایش بود.

مقدار IL-4 در تمامی گروهها پایین تر از حد قابل ردیابی Th1 (۱۳ pg/ml) بود. این نتایج نشان دهنده تقدم پاسخ ایمنی Th2 بر Th1 است.



شکل ۱. رهش برون تن توکسوئید کزاز (A) و CpG ODN (B) از میکروسفرهای PLGA. ۲۵ mg میکروسفر PLGA حاوی TT در ۶۰۰ میکرولیتر بافر PBS با pH ۷/۴ سوسپانسیون شد. سوسپانسیون در شیکر-انکوباتور ۳۷ °C در حال همزدن ملایم قرار داده شد و در فواصل زمانی معین نمونه برداری شد. این مطالعه به مدت یک ماه ادامه داشت. مقدار TT رهش شده درون PBS با استفاده از روش تعیین مقدار پروتئین میکرو-BCA اندازه گیری می شد. رهش CpG-ODN نیز با سوسپانسیون کردن مقدار مشابه از میکروسفرهای حاوی CpG-ODN درون بافر TE بررسی شد. مقدار CpG-ODN آزاد شده درون بافر با اندازه گیری جذب محلول در ۲۶۰ nm تعیین مقدار شد.

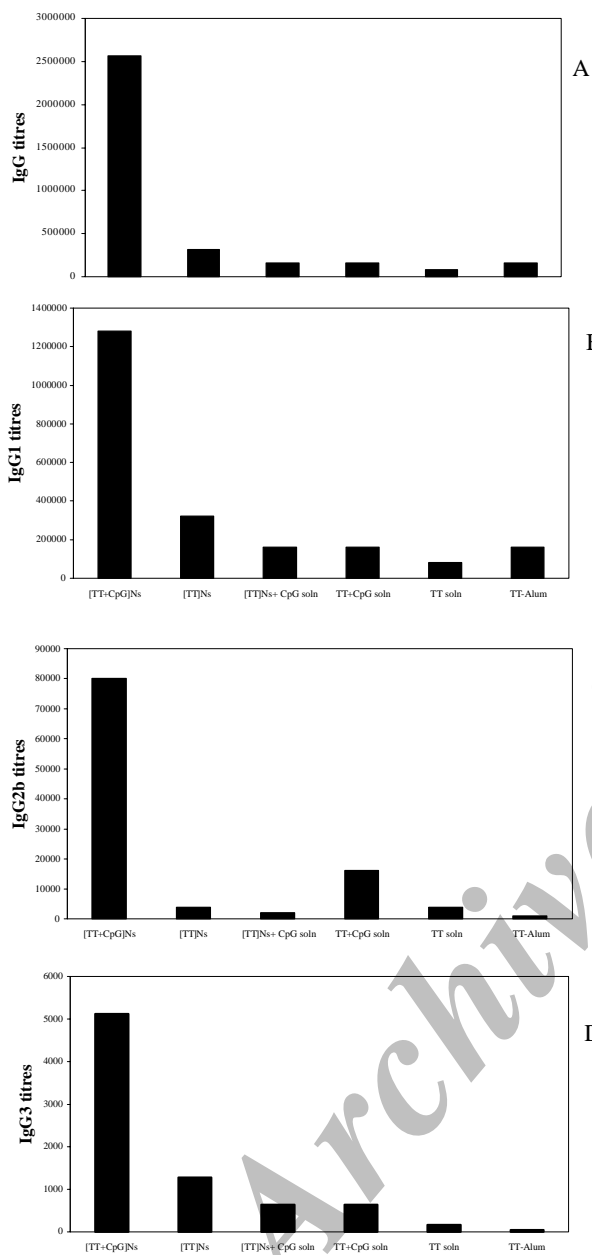
۵، $P=0/007$). همچنین این نتایج نشان دهنده این نکته است که تجویز همزمان CpG ODN و TT پاسخ ایمنی را نسبت به TT تنها، افزایش می دهد. این نتیجه هم در مورد TT انکپسوله شده (مقایسه گروه ۱ و ۲، $P=9/9 \times 10^{-5}$) و هم در مورد TT محلول (مقایسه گروه ۴ و ۵، $P=0/046$) صدق می کند. همچنین انکپسوله کردن همزمان TT و CpG ODN در میکروسفر پاسخ ایمنی بیشتری نسبت به مخلوط کردن ساده میکروسفرهای حاوی TT با محلول CpG-ODN است (گروه ۱ و ۳، $P=0/003$) ایجاد کرده است.

آلوم به عنوان ادجوانتی که بیشتر بر روی ایمنی هومورال مؤثر است، در این آزمون نتوانسته پاسخ Th1 ایجاد نماید و در تست تکثیر سلولهای T، تکثیر سلولهای T جدا شده از گروه این سازی شده با Alum-TT بسیار کم است.

تعیین نوع پاسخ T helper با استناد به نتایج تعیین مقدار سایتوکاین ها

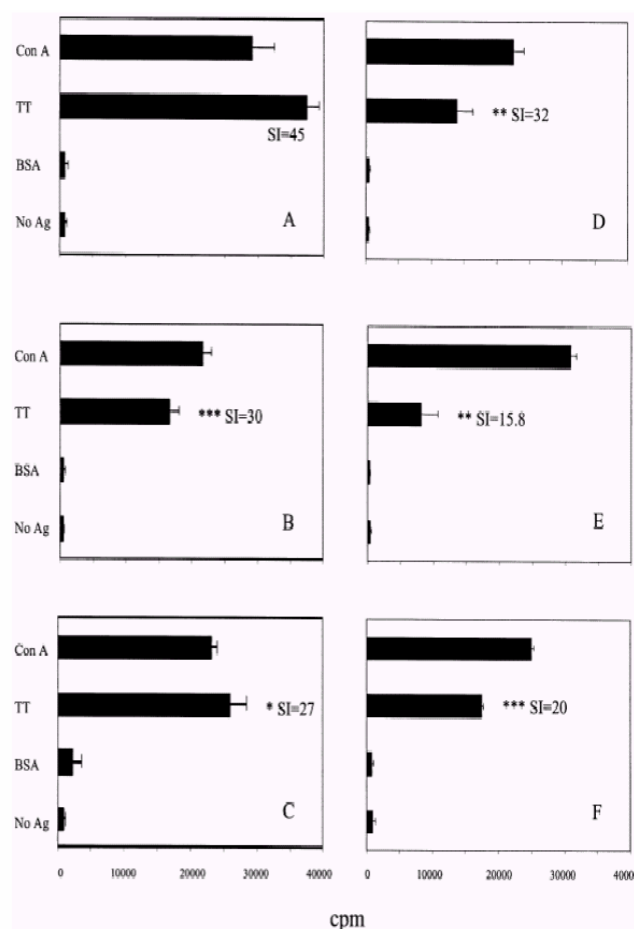
پس از تکثیر سلولهای T در حضور آنتی ژن های مختلف، محلول روی محیط کشت که حاوی سایتوکاینهای ترشح شده توسط سلولهای T است، جدا شد و مقدار اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ (IL4) در آنها تعیین شد. حضور IFN- γ نشانگری برای نوع Th1 از پاسخ ایمنی است، حال آن که IL-4 شاخصی برای نوع Th2 پاسخ ایمنی می باشد.

در میان گروههای ۶ گانه، بیشترین مقدار IFN- γ ($2694/7 \pm 41/1$ pg/ml) توسط سلولهای T جدا شده از گروه این شده با میکروسفرهای حاوی TT و CpG ODN (گروه ۱) ترشح شده بود. در جدول A-۱ تولید IFN- γ توسط گروههای مختلف با هم مقایسه شده اند. تغییرات میزان IFN- γ در گروههای مختلف روایی مشابه نتایج تکثیر سلولهای T را نشان می دهد. افزودن CpG ODN به TT خواه در حالت میکروسفری (گروه ۱ و ۲، $P=4/9 \times 10^{-7}$) و یا در حالت محلول (گروه ۴ و ۵، $P=0/0001$) باعث افزایش شدیدی در تولید IFN- γ شده است. در مورد موشهایی که



شکل ۳. اندازه گیری عیار IgG ضد TT.

سرمهای به دست آمده از هر یک از گروهها روی هم ریخته شد و سپس عیار مخلوط سنجیده شد. عیار ختم عمل بالاترین رقت سرم که جذبی معادل حداقل دو برابر سرم بدون آنتی بادی نشان دهد، بود. زیر گونه های (A) IgG، (B) IgG1، (C) IgG2b و (D) IgG3 نشان داده شده اند.



شکل ۴. تکثیر سلولهای T در اثر القاء آنتی ژن.

موشها با دو تزریق زیر جلدی با ۲ Lf توکسوئید کراز و ۴ μg CpG-ODN در دوزهای صفر و ۷ در قالب گروههای زیر ایمن شدند و سلولهای T آنها جداسازی و خالص گردید؛ (A) میکروسفرهای حاوی TT و CpG-ODN، (B) میکروسفرهای حاوی TT، (C) میکروسفرهای حاوی TT مخلوط با محلول CpG-ODN، (D) مخلوطی از محلولهای TT و CpG-ODN، (E) محلول TT جذب شده بر روی آلوم. پاسخ تکثیری با افزودن 5×10^6 سلول T به هر خانه از پلیت مخصوص کشت سلولی بررسی شد. به هر یک از خانه ها 1×10^6 APCs و آنتی ژنهای فراخوان TT یا BSA به مقدار $2/5 \mu\text{g}/\text{well}$ اضافه شد. کونکاناوالین A (Con A) به عنوان شاهد مثبت برای آنتی ژن فراخوان استفاده شد. به عنوان شاهد منفی، به برخی خانه ها هیچ آنتی ژنی اضافه نشد. این خانه ها تنها دارای APC بودند (APC). تکثیر سلولهای T با اندازه گیری تایمیدین نشاندار شده برحسب CPM اندازه گیری شد. از تست Student t برای آنالیز معنی دار بودن پاسخ های تکثیری در مقابل TT بین گروه ۱ و بقیه گروهها استفاده شد. ستاره ها نشان دهنده * $P < 0/005$ ، ** $P < 0/0005$ ، *** $P < 0/0001$ است.

تعیین مقدار آنتی بادیهای ضد TT

پاسخ های ایمنی هومورال علیه TT با استفاده از ELISA اندازه گیری شد. در این آزمایشها به عنوان شاهد مثبت برای عیار IgG، از سرم موشهای هیپرایمیون (موشهای ایمن شده با ۳ بار تزریق ۱۰ Lf Alum-TT) استفاده شد. شاهد منفی سرم موشهای ایمن نشده بود.

شکل ۴-A نشان دهنده عیار IgG کل و زیر مجموعه هایش در گروههای ۶ گانه مورد آزمایش است. همان گونه که در بخش ۱ و ۲ از شکل ۶-A مشخص شده است، در گروه ایمن شده با میکروسفرهای حاوی TT و CpG-ODN، عیار بالایی از IgG کل و IgG1 مشاهده می شود. از این نظر سایر گروهها دارای ترتیب زیر هستند:

گروه ۵ > گروه ۶ > گروه ۲ = گروه ۳

نکته قابل توجه این که تجویز میکروسفر حاوی TT و CpG-ODN باعث ایجاد تیتراژ بسیار بالاتری (۱۶ برابر) نسبت به واکسن معمولی (Alum-TT تزریقی) شده است.

در همین گروه ۱، عیار بسیار بالایی از IgG2b و IgG3 مشاهده می شود. وجود پاسخ آنتی بادی نوع Th1 با مقدار بالای IgG2b در گروه در سرم به دست آمده از گروه ۱ مشخص شود. عیار IgG2b در این گروه (۸۰۰۰۰) در مقایسه با گروههای ۲ تا ۶ (به ترتیب ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۶۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۱۰۰۰) بسیار بالاتر است.

همچنین با مقایسه گروه ۴ و ۵ مشخص می شود که حضور CpG-ODN حتی به صورت محلول به تولید مقادیر قابل توجه از IgG2b و IgG3 کمک می کند. در مورد IgG2a نیز همانند IgG2b بیشترین عیار در گروه ایمن شده با میکروسفرهای حاوی TT و CpG دیده می شود (۲۵۰ برابر بیشتر از گروه ایمن شده با محلول TT). در مرتبه بعد مجدداً حضور CpG-ODN حتی به صورت محلول نیز عیار بالایی از IgG2a ایجاد کرده است (عیار IgG2a در گروه ایمن شده با محلول TT و CpG-ODN، ۱۶ برابر بیشتر از گروه ایمن شده با محلول TT تنها است).

بحث

در این تحقیق استفاده از CpG-ODN به عنوان ادجوانت برای یک آنتی ژن مدل (توکسوئید کزاز) مورد بررسی قرار گرفت. با انکپسولاسیون همزمان TT و CpG-ODN در یک فرمولاسیون میکروسفر انتظار می رود که هر دو اینها به یک سلول یا جایگاه رسانیده شوند. در چنین حالتی سلولها می توانند توسط CpG-ODN فعالسازی شوند و در نتیجه فراوری و ارائه آنتی ژن در حد کافی انجام شود که نتیجه آن می تواند ایجاد پاسخ ایمنی قویتر باشد. همان گونه که در نتایج سنجش تکثیر سلولهای T و مقدار γ -INF و عیار آنتی بادیها مشخص می شود، تجویز همزمان ادجوانت با TT در حالت انکپسوله در میکروسفر به شدت ایمنی را زوده است. هنگامی که میکروسفرهای حاوی TT با محلول CpG-ODN مخلوط شدند، باز هم در مقایسه با محلول TT و CpG-ODN محلول پاسخ ایمنی بیشتری ایجاد کردند، اما این پاسخ از حالتی که آنتی ژن و ادجوانت درون یک فرمولاسیون میکروسفر وارد شدند، بسیار کمتر بود.

هنگامی که میکروسفرهای حاوی TT و محلول CpG-ODN با هم مخلوط شدند، مقدار کمی IgG2b ایجاد شد، اما هنگام تزریق محلول ساده محلولهای TT و CpG-ODN عیار IgG2b نسبت به حالت قبل حدوداً ۴ برابر بیشتر بود. در مورد IgG2a نیز نتایج مشابهی به دست آمد. به نظر می رسد که محلول CpG-ODN به خاطر در دسترس بودن بیشتر، راحت تر می تواند روی سلولهایی مانند سلولهای B اثر بگذارد و باعث تولید آنتی بادی شود. اما در مورد میزان اینترفرون گاما، بین این دو گروه تفاوت قابل ملاحظه ای به چشم می خورد ($P=1/4 \times 10^{-5}$). در گروه ایمن شده با محلول TT و CpG-ODN مقدار γ -INF برابر $50/2 \pm 814/7$ pg/ml بوده است حال آن که در گروهی که میکروسفرهای حاوی TT با محلول CpG-ODN مخلوط شده اند، این مقدار $57/9 \pm 1935/6$ pg/ml بوده است. قابل توجه این که در مقادیر مشابه، انکپسولاسیون همزمان TT

۳۶). تا جایی که بررسیهای ما نشان می دهد تاکنون هیچ يك از سیستمهای دارورسانی گزارش شده قادر نبوده اند در مقایسه با Alum-TT چنین پاسخ ایمنی بالایی که در این تحقیق به آن رسیده ایم، ایجاد کنند.

در این تحقیق با تجویز همزمان ادجوانت CpG-ODN و TT به صورت انکپسوله درون میکروسفر PLGA، عیار بسیار بالایی از IgG1 (نوع Th2) و IgG2b و IgG3 (نوع Th1) در موش به دست آمده است. مشخص شده است که سکانس تحریکی اصلی در DNA باکتری، CpG غیر متیله ای است که قبل از آن ۲ باز پورین و بعد از آن ۲ باز پیریمیدین باشد. این بخش ۶ بازی (CpG) و دو باز قبل و بعد از آن CpG motif = DNA باکتری ۲۰ برابر بیش از DNA مهره داران یافت می شود (اصطلاحاً گفته می شود که DNA مهره داران از نظر CpG سرکوب شده است) (۲۵). تا به حال گزارشهایی زیادی در مورد اثر ادجوانتی CpG در موش منتشر شده است ولی در مورد قابلیت تحریک ایمنی CpG روی انسان اطلاعات کمی در دست است. سکانس های DNA مورد نیاز برای انسان با آنچه در موش مورد نیاز است، متفاوت است (۳۱). در يك مطالعه که روی سلولهای انسانی انجام شده از میان ۴۷ رشته دارای CpG که ۸ تا ۳۰ باز داشتند، تنها ۱۲ رشته باعث تکثیر سلولهای B و تولید اینوگلوبولین شدند. نکته قابل توجه این که CpG شماره ۱۸۲۶ که بیش از همه مورد استفاده بوده است و روی لئوسیتهای موش اثر تحریکی بالایی دارد، روی سلولهای B انسانی و شامپانزه اثر ندارد (۲۲). CpG موتیف تحریکی برای انسان از ۶ باز GTCGTT تشکیل شده حال آن که CpG موتیف مطلوب برای اثر تحریکی در موش GACGTT است. همچنین CpG هایی که در انسان اثر تحریکی دارند، در موش نیز این اثر را نشان می دهند در حالی که عکس این موضوع صادق نیست. این نشان می دهد لئوسیتهای موش در مقایسه با انسان توان گسترده تری برای اتصال به CpG های مختلف دارند (۲۷). قابل ذکر است که غیر از CpG های تحریکی،

CpG-ODN در میکروسفر باعث افزایش قابل توجه در ایجاد IgG2b و IFN- γ شده است.

با بررسی نتایج سنجش تکثیر سلولهای T، سلولهای T جدا شده از موشهای ایمن شده با میکروسفرهای دارای TT و CpG-ODN تکثیر بسیار بالایی (ضریب تکثیر = ۴۵) نشان داده اند. تولید عیار بالایی از IgG3 و IgG2b نیز نشان دهنده نوع Th1 از پاسخ ایمنی است. در همین حال وجود عیار بالایی از IgG1 در سرم نشان دهنده پاسخ ایمنی قوی از نوع Th2 می باشد. بررسی سایتوکاینها نشان دهنده عیار بالایی از IFN- γ (تا ۲۷۴۱ pg/ml) و مقادیر کم غیر قابل ردیابی (کمتر از ۱۳ pg/ml) از IL-4 می باشد. مجموع این نتایج نشان دهنده تحریک هر دو شاخه Th1 و Th2 ایمنی با تقدم Th1 دارد. چنین نتایجی در کار برخی محققین دیگر نیز گزارش شده است (۱۵). آلوم تنها ادجوانت مجاز برای استفاده در انسان است. به این دلیل جذب آنتی ژنها بر روی آلوم به منظور تهیه واکسن چندین دهه است که روش مرسوم برای تهیه واکسن بوده است. با وجود این که این ترکیب بسیار بی خطر است و قیمت اندکی دارد، استفاده از آن محدودیتهای خاصی نیز دارد. از جمله محدودیت های آن عدم توان در تحریک پاسخ ایمنی نوع Th1، نیاز به چند بار تزریق و کمتر بودن تاریخ انقضای واکسنهای جذب شده بر روی آلوم را می توان نام برد. نیاز به یافتن يك ادجوانت جایگزین به ویژه وقتی بیشتر حس شد که در زمینه فن آوری DNA و پروتئین های نو ترکیب پیشرفت ایجاد شد (۴۷). در چند سال اخیر تلاشهای زیادی برای ساخت فرمولاسیونهای ماتریکسی کنترل رهش برای تزریق يك نوبته واکسنها یا طولانی اثر کردن آنها انجام شده است (۱۰، ۱۲). سیستم جایگزین آلوم باید بتواند در زمینه ایجاد پاسخ ایمنی مشابه یا بهتر از واکسنهای جذب شده بر آلوم عمل کند. به عنوان یکی از روشهای ممکن برای تجویز آنتی ژن، تاکنون تحقیقات زیادی بر روی انکپسولاسیون توکسوئید کزاز درون میکروسفرهای زیست تجزیه پذیر - با یا بدون ادجوانت اضافه - انجام شده است (۲، ۳، ۹، ۲۰، ۲۳،

بالاتری از CpG-ODN ($100 \mu\text{g}$ یا حتی بیشتر) مورد آزمایش قرار گرفته است (۷، ۸، ۱۳، ۳۵). در یک مطالعه دیگر (۴۶)، CpG-ODN و آنتی ژن مورد نظر (gp 120) بر روی سطح میکروسفرهای جداگانه ای جذب شدند و سپس این دو نوع میکروسفر (یکی حاوی آنتی ژن و دیگری حاوی CpG) با هم مخلوط و تزریق شدند. اثر ادجوانتی CpG-ODN ($25 \mu\text{g}$ در هر تزریق) پس از ۳-۲ تزریق قابل لمس بود. ظاهراً انکپسولاسیون آنتی ژن و CpG در یک فرمولاسیون میکروسفری، همانند کار فعلی باعث ایمنی زایی بیشتری می شود. در این حالت حتی دوز مورد نیاز برای ایجاد پاسخ ایمنی بسیار کمتر است ($4 \times 2 \mu\text{g}$). تجویز همزمان آنتی ژن و CpG، در صورت اتصال دادن CpG به آنتی ژن با پیوندهای کووالنت (covalent) نیز مؤثر بوده است (۴۵).

یکی از مشکلات سیستمهای دارورسانی، احتمال تغییر ماهیت آنتی ژن در حین فرایند انکپسولاسیون است. از جمله عوامل تخریبی مهم در فرایند تهیه میکروسفر PLGA تماس محلول آنتی ژن با میان سطحهای آبی/آلی، نیروهای برشی مورد استفاده در مرحله تهیه امولسیون (مانند سونیکاسون و...)، خشک کردنهای سریع و ... است. این عوامل ممکن است باعث از دست رفتن فعالیت پروتئین ها (۱۱، ۱۹) و از جمله توکسوئید کزاز شوند (۲، ۵، ۹، ۴۱، ۴۴، ۴۸). در تحقیق فعلی به منظور کاهش این مسئله، میکروسفرها در شرایط متعادلتی تهیه شدند، با این وجود احتمال از دست رفتن کنفورماسیون اولیه آنتی ژن یا CpG-ODN حذف نمی شود، تغییرات این چنین اگر کنفورماسیونی باشد تا حدی برگشت پذیر خواهند بود ولی از دست رفتن آنتی ژن نسبت به برگشت ناپذیر است (۱۹)، با وجود چنین احتمالاتی، پاسخ ایمنی بسیار بالا و مداوم در این تحقیق مشاهده شد. تکرار پذیری داده های گزارش شده، با تکرار دوباره آزمایش (نتایج نشان داده نشده اند) اثبات شد. نگرانی دیگر ناشناخته بودن عوارض احتمالی CpG-ODN است. محدود منابع در دسترس، احتمال ایجاد التهاب یا ترشح سایتوکاینهای پیش التهابی در حضور موتیفهای

CpG های غیرتحریکی یا خنثی کننده سیستم ایمنی نیز شناسایی شده اند. این CpG ها هنگامی حالت خنثی کننده دارند که قبل یا بعد از آنها یک C یا G قرار داشته باشد (۲۸). اثر ادجوانتی CpG-ODN برای TT محلول، در مطالعات دیگر نیز نشان داده شده است. Mc Cluskie و همکارانش پس از تجویز خوراکی CpG-ODN و TT محلول، افزایش عیار IgG ضد TT را گزارش کرده اند. در آن مطالعه، مقادیر متوسطی از IFN- γ (125 pg/ml) و تولید مقادیر بیشتری از IgG2a در مقایسه با IgG1 نیز مشاهده شده است (۳۵، ۳۶). Eastcott و همکارانش نیز از CpG-ODN با توالی بازهای GAGAACGCTCGACCTTCGAT به عنوان یک کوادجوانت (co-adjuvant) همراه با TT جذب شده بر سطح آلوم استفاده کردند. در آن تحقیق پاسخ تکثیر سلولهای T جدا شده از غده لنفاوی و طحال حیوانات مورد آزمایش در گروه دارای CpG-ODN افزایش قابل توجهی ($P=0/1$) نسبت به گروه alum-TT نشان ندادند (۱۳). در تحقیقی که توکسوئید کزاز به عنوان حامل برای واکسن گلیکوکونژوگه علیه هموفیلوس آنفلوانزای نوع b به کار رفته بود، یک CpG-ODN (TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA) برای واکسنهای کونژوگه نیز مؤثر نشان داد. جالب این که علاوه بر ایجاد عیار بالای آنتی بادی علیه پلی ساکارید مورد آزمایش، در حضور CpG-ODN عیار بالایی از آنتی بادهای ضد TT (IgG1، IgG2a، IgG2b و IgG3) نیز ایجاد شد (۷). استفاده از سیستم های دارورسانی ذره ای برای CpG-ODN نشان دهنده کارایی بالاتر در مقایسه با محلول CpG-ODN است. شاهدهی بر این کارایی بالا، اثر افزایش شدید پاسخ ایمنی در این تحقیق با مقدار ناچیز ($4 \mu\text{g}$) CpG-ODN در حالت میکروانکپسوله است. در مطالعات دیگری که از CpG-ODN جذب سطحی شده (۴۶) یا انکپسوله شده درون لیپوزوم (۱۳) استفاده کرده اند، نیز مقادیر کمی CpG-ODN استفاده شده است (به ترتیب $25 \mu\text{g}$ و $5 \mu\text{g}$). در حالی که در مطالعاتی که از CpG-ODN محلول استفاده کرده اند، دوزهای

References

1. Aggrebeck H., Wantzin J., Heron I., 1996, Booster vaccination against diphtheria and tetanus in man. Comparison of three different vaccine formulations III. *Vaccine*, 14, 1265-1272.
2. Alonso M. J., Gupta R. K., Min C., Siber G. R., Langer R., 1994, Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine*, 12, 299-306.
3. Audran R., Men Y., Johansen P., Gander B., Corradin G., 1998, Enhanced immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid with stabilizing agents. *Pharm. Res.*, 15, 1111-1116.
4. Barman S. P., Lunsford L., Chambers P., Hedley M. L., 2000, Two methods for quantifying DNA extracted from poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Con. Rel.* 69, 337-344.
5. Chang A. C., Gupta R. K., 1996, Stabilization of tetanus toxoid in poly(DL-lactico-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen, *J. Pharm. Sci.*, 85, 129-132.
6. Chu R. S., McCool T., Greenspan N. S., Schreiber J. R., Harding C. V., 2000, CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants for pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines and enhance antipolysaccharide immunoglobulin G2a(IgG2a) and IgG3 antibodies, *Infect. Immun.*, 68,1450-1456.
7. Chu R. S., McCool T., Greenspan N. S., Schreiber J. R., Harding C. V., 2000, CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants for pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines and enhance antipolysaccharide immunoglobulin G2a (IgG2a) and IgG3 antibodies, *Infection & Immunity*, 68, 1450-1456.
8. Davila E., Celis E., 2000, Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity, *J. Immunol.*, 165, 539-547.
9. Diwan M., Khar R. K., Talwar G. P., 2001, Tetanus toxoid loaded 'preformed microspheres' of cross-linked dextran, *Vaccine*, 19, 3853-3859.
10. Diwan M., Misra A., Khar R. K., Talwar G. P., 1997, Long-term high immune response to diphtheria toxoid in rodents with diphtheria toxoid conjugated to dextran as a single contact point delivery system, *Vaccine*, 15, 1867-1871.
11. Diwan M., Park T. G., 2001, Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres, *J. Con. Rel.*, 73, 233-244.
12. Diwan M., Dawar H., Talwar G. P., 1998, Induction of early and bioeffective antibody response in rodents with the luteinizing hormone-releasing hormone vaccine given as a single dose in biodegradable microspheres along with alum, *Prostate*, 35, 279-284.

CpG را نشان می دهند (۴۳، ۴۹). در این تحقیق و تحقیقات دیگری که در آنها از CpG-ODN استفاده شده (داده ها نشان داده نشده اند)، هیچ گونه عارضه ناخواسته ای در هیچ یک از موشهای این شده، مشاهده نشد و همه حیوانات در زمینه عادات غذایی، وزن بدن و میزان مرگ و میر وضعیت طبیعی داشتند. مطالعاتی که روی سمیت ODN های دارای اسکلت فسفورتیوات انجام شده نشان داده که حتی تجویز مقادیر تا $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ که چندین برابر مقدار استفاده شده در این تحقیق است، بی خطر است. در حال حاضر در آزمونهای بالینی روی انسان مصرف مداوم روزانه $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ از این ترکیبات هیچگونه سمیت دارویی ای نشان نداده است (۳۸). یکی از مزایای مسلم ODN های دارای اسکلت فسفورتیوات امکان تولید آنها در مقیاس زیاد و تحت شرایط GMP است. در تولید در مقیاس زیاد های این ODNs تقریباً ۲۰۰ دلار در هر گرم است (۳۸). با این حال هنوز نیاز به مطالعات فراگیر روی بی خطر بودن CpG-ODN وجود دارد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق حاکی از وجود اثر ادجوانتی قوی CpG-ODN برای TT هنگام تجویز زیر جلدی آنها به موش است. ایمنی زایی آنتی ژن و اثر ادجوانت با انکیسولاسیون همزمان این دو در میکروسفرهای PLGA در حد قابل توجهی افزایش یافت. با وجود این که در این تحقیق از نوع به خصوصی از CpG-ODN که برای موش مناسب است (رشته شماره ۱۸۲۶ که حاوی موتیف GACGTT می باشد) استفاده شد، انتظار می رود که در تجویز CPG-ODN های مناسب برای انسان و حیوانات دیگر نیز، اثر افزایش پاسخ ایمنی در هنگام تجویز آنتی ژن و CpG-ODN در سیستمهای میکروسفری مشاهده شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از یک پروژه تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه بوده و به این وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه به خاطر تامین بودجه این کار تشکر می شود.

24. Klinman D. M., Barnhart K. M., Conover J., 1999, CpG motifs as immune adjuvants, *Vaccine*, 17, 19-25.
25. Klinman Y. A., Beaucage D. M., Conover J., Kreig A. M., 1996, CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukine 12, and interferon gamma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2879-2883.
26. Krieg A. M., 2000, The role of CpG motifs in innate immunity, *Curr. Opin. Immun.*, 12, 35-43.
27. Krieg A. M., 1999, Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides, *Biochim. Biophys. Act.*, 1489, 107-116.
28. Krieg A. M., Wu, T., Weeratna R., Efler S. M., Love-Homan L., Yang L., Yi A. K., Short D., Davis H. L., 1998, Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12631-12636.
29. Lenert P., Stunz L., Yi A. K., Krieg A. M., Ashman R. F., 2001, CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF- kappa B activation, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 11, 247-256.
30. Lewis K. J., Irwin W. J., Akhtar S., 1998, Development of a sustained-release biodegradable polymer delivery system for site-specific delivery of oligonucleotides: Characterization of P(LA-GA) copolymer microspheres in vitro, *J. Drug Target*, 5, 291-302.
31. Liang H., Nishioka Y., Reich C. F., Pisetsky D. S., Lipsky P. E., 1996, Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides, *J. Clin. Invest.*, 98, 1119-1129.
32. Manzel L., Macfarlane D. E., 1999, Lack of immune stimulation by immobilized CpG-oligodeoxynucleotide, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 9, 459-464.
33. Manzel L., Strekowski L., Ismail F. M., Smith J. C., Macfarlane D. E., 1999, Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by 4-aminoquinolines and other weak bases: mechanistic studies, *J. Pharmacol. Exp. Thr.*, 291, 1337-1347.
34. Martin R. M., Lew A. M., 1998, Is IgG2a a good Th1 marker in mice? *Immunol. Today*, 19, 49.
35. McCluskie M. J., Weeratna R. D., Krieg A. M., Davis H. L., 2001, CpG DNA is an effective oral adjuvant to protein antigens in mice, *Vaccine*, 19, 950-957.
36. McCluskie M. J., Davis H. L., 2001, Oral intrarectal and intranasal immunizations using CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants, *Vaccine*, 19, 413-422.
37. McCluskie M. J., Davis H. L., 2000, CpG DNA as mucosal adjuvant, *Vaccine*, 18, 231-237.
13. Eastcott J. W., Holmberg C. J., Dewhirst F. E., Esch T. R., Smith D. J., Taubman M. A., 2001, Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to mucosally or systemically administered tetanus toxoid, *Vaccine*, 19, 1636-1642.
14. Guan H. H., Budzynski W., Koganty R. R., Krantz M. J., Reddish M. A., Rogers J. A., Longnecker B. M., Samuel J., 1998, Liposomal formulations of synthetic MUC1 peptides: effects of encapsulation versus surface display of peptides on immune responses, *Bioconjugate Chemistry* 9, 451-458.
15. Gursel M., Tunca S., Ozkan M., Ozcengiz G., Alaeddinoglu G., 1999, Immunoadjuvant action of plasmid DNA in liposomes, *Vaccine*, 17, 1376-1383.
16. Hacker H., Mischak H., Miethke T., Liptay S., Schmid R., Sparwasser T., Heeg K., Lipford G. B., Wagner H., 1998, CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation, *EMBO Journal*, 17, 6230-6240.
17. Hao T., McKeever U., Hedley M. L., 2000, Biological potency of microsphere encapsulated plasmid DNA, *J. Con. Rel.*, 69, 249-259.
18. Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S., 2000, A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature*, 408, 740-745.
19. Johansen P., Merkle H. P., Gander B., 1998, Physico- chemical and antigenic properties of tetanus and diphtheria toxoids and steps towards improved stability, *Biochim. Biophys. Act.*, 1425, 425-436.
20. Johansen P., Men Y., Merkle H. P., Gander B., 2000, Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 129-146.
21. Jones D. H., Corris S., McDonald S., Clegg J. C. S., Farrar G. H., 1997, Poly(DL-Lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration, *Vaccine*, 15, 814-817.
22. Jones T. R., Obaldia N., Gramzinski R. A., Charoenvit Y., Kolodny N., Kitov S., Davis H. L., Krieg A. M., Hoffman S. L., 1999, Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys, *Vaccine*, 17, 3065-3071.
23. Kersten G. F. A., Donders D., Akkermans A., Beuvery E. C., 1996, Single shot with tetanus toxoid in biodegradable microspheres protects mice despite acid-induced denaturation of the antigen, *Vaccine*, 14, 1627-1632.

- vaccine, *J. Microencap.*, 15, 299-318.
- Shirota H., Sano K., Kikuchi T., Tamura G., Shirato K., 2000, Regulation of murine airway eosinophilia and Th2 cells by antigen-conjugated CpG oligodeoxynucleotides as a novel antigen-specific immunomodulator, *J. Immunol.*, 164, 5575-5582.
45. Singh M., Ott G., Kazzaz J., Ugozzoli M., Briones M., Donnelly J., O'Hagan D. T., 2001, Cationic microparticles are an effective delivery system for immune stimulatory CpG DNA. *Pharm. Res.*, 18, 1476-1479.
46. Talwar G. P., Diwan M., Razvi F., Malhotra R., 1999, The impact of new technologies on vaccines, *Natl. Med. J. India*, 12, 274-280.
47. Xing D. K. L., McLellan K., Corbel M. J., Sesardic D., 1996, Estimation of antigenic tetanus toxoid extracted from biodegradable microsphere, *Biologicals*, 24, 57-65.
48. Yew N. S., Zhao H., Wu I. H., Song A., Tousignant J. D., Przybylska M., 2000, Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs, *Mol. Ther.*, 1, 255-262.
49. Yi A. K., Tuetken R., Redford T., Waldschmidt M., Kirsch J., Krieg A. M., 1998, CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH- dependent generation of reactive oxygen species, *J. Immunol.*, 160, 4755-4761.
38. Moldoveanu Z., Love-Homan L., Huang W. Q., Krieg A. M., 1998, CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus, *Vaccine*, 16, 1216-1224.
39. Newman K. D., Sosnowski D. L., Kwon G. S., Samuel J., 1998, Delivery of MUC1 mucin peptide by poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) microspheres induces type 1 T helper immune responses, *J. Pharm. Sci.*, 87, 1421-1427.
40. Oxenius A., Martinic M. M. A., Hengartner H., Klenerman P., 1999, CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines, *J. Virol.*, 73, 4120-4126.
41. Sanchez A., Villamayor B., Guo Y., McIver J., Alonso M. J., 1999, Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *Int. J. Pharm.*, 185, 255-266.
42. Schmeer N., Hoffmeister E., Weiss R., Hofer R., Baumgartner W., 1997, Analysis of immunoglobulin classes and subclasses in response to infection of Balb/cJ and C57BL/6J mice with *Coxiella burnetii*, *J. Vet. Med.*, 44, 49-59.
43. Schwartz D. A., Quinn T. J., Thorne P. S., Sayeed S., Yi A. K., Krieg A. M., 1997, CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract, *J. Clin. Invest.*, 100, 68-73.
44. Schwendeman S. P., Tobio M., Joworowicz M., Alonso M. J., Langer R., 1998, New strategies for the microencapsulation of tetanus