

## تکامل ادجوانت MF59 برای واکسن آنفلوانزای با استفاده از مشتقات کیتوزان

علیرضا لقمانی<sup>۱\*</sup>، نوروز دلیرزاد، آفاق معطری<sup>۲</sup>

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

۲- گروه ویروس‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۱۸

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۲/۰۶

## چکیده

**زمینه و هدف:** ویروس آنفلوانزای عامل مرگ‌ومیر صدها نفر در دنیا می‌شود. علی‌رغم در دسترس بودن واکسن مجاز برای تمام گروه‌های سنی و علی‌رغم آثار سودمند ثابت شده آن، هنوز ویروس آنفلوانزای به‌عنوان یک مشکل عمده برای سلامت عمومی باقی‌مانده است. در این تحقیق ادجوانت MF59 به‌وسیله متیل گلیکول کیتوزان ارتقا یافت.

**مواد و روش‌ها:** خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میزان تحریک پاسخ ایمنی همورال ادجوانت در ترکیب با ویروس آنفلوانزای اندازه‌گیری شد.

**نتایج:** ادجوانت جدید با قطر نانومولوسیون ۱۵۶ و پتانسیل زتای ۲۹ تولید شد. pH ادجوانت در طول دو سال تغییر محسوس نداشت. ایمونیزاسیون موش با ادجوانت و ویروس آنفلوانزا موجب شد عیار HAI بیشتری در مقایسه با ادجوانت MF59 ایجاد کند.

**نتیجه‌گیری:** ادجوانت تکامل یافته با ایجاد خواص مطلوب فیزیکوشیمیایی، همچنین القا پاسخ ایمنی همورال قوی و عدم ایجاد عوارض موضعی می‌تواند جایگزین ادجوانت MF59 شود.

**کلمات کلیدی:** واکسن، آنفلوانزای، MF59، متیل گلیکول کیتوزان، ادجوانت

## مقدمه

(۴). تعدادی واکسن آنفلوانزایی غیرفعال که برای انسان استفاده می‌شود به ثبت رسیده‌اند که طی رشد در تخم‌مرغ نطفه‌دار و خالص‌سازی به دست می‌آید. اولین نسل واکسن‌های آنفلوانزای بر مبنای کل ویروس بودند که با فرمالین یا بتاپروپیولاکتون برای استفاده واکسن غیرفعال شده بودند. هم‌اکنون تعداد خیلی کمی از واکسن‌ها بر مبنای ویروس کل و غیرفعال شده هستند (۵). واکسن‌های جدید غیرفعال با رشد دادن ویروس آنفلوانزای در سلول‌های کشت ممتد (Continuous cell lines) همانند Madin-Darby Canine Kidney Cells (MCDK) پیوسته به دست می‌آیند (۶). ادجوانت‌ها، بهترین راه شناخته‌شده برای بالا بردن واکنش ایمنی به واکسن‌ها بیان شده‌اند و اغلب واکسن‌های مجاز در سراسر جهان شامل ادجوانت‌ها هستند. ادجوانت‌ها، بهترین راه شناخته‌شده برای بالا بردن واکنش ایمنی به واکسن‌ها

ویروس آنفلوانزای یک تهدید اساسی علیه سلامتی انسان‌ها و حیوانات محسوب می‌شود (۱). به سبب تغییرات بسیار زیاد آنتی‌ژنیکی (Antigenic drift) هر ساله عامل اپیدمی‌های گسترده و عفونت میلیون‌ها انسان می‌گردد. علاوه بر این، به سبب ترکیب ژنی گونه‌های متفاوت آنفلوانزای و زیرمجموعه‌های جدید، این ویروس از پتانسیل بالایی برای ایجاد اپیدمی برخوردار است (۲)، علی‌رغم در دسترس بودن واکسن مجاز برای تمام گروه‌های سنی و علی‌رغم آثار سودمند آن، هنوز آنفلوانزای به‌عنوان یک مشکل عمده برای سلامت عمومی انسان‌ها در شیوع فصلی و مسری که می‌تواند به شکل دوره‌ای اتفاق بیافتد، باقی‌مانده است

\*نویسنده مسئول: علیرضا لقمانی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه،

Email: Alireza\_trtr@yahoo.com

ایران

https://orcid.org/0000-0001-8994-2691

فیزیکی، شیمیایی و میزان پاسخ ایمنی هرکدام در ترکیب با آنفلوآنزایی سازگار شده به موش بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

اسکوالن، Methylglycol-chitosan، Serum decay enzyme، و تریپسین-TPCK از (Sigma Aldrich- San Luis) تهیه گردید. Tween 80 و Span85 از (Merk Milipor-Deutschland)، DMEM (Dulbecco's و Fetal Bovin Serum (FBS) Modified Eagle Medium) از (Gibco-UK) تهیه گردید.

#### تهیه ویروس آنفلوآنزای و کشت سلول

ویروس آنفلوآنزایی سازگار شده به موش، تحت واحد H1N1 مشخصه A/Puerto Rico/8/34 (اختصاراً PR8 خوانده می‌شود) از مرکز تحقیقات آنفلوآنزای موسسه انستیتو پاستور ایران تهیه و در تخم مرغ جنین دار ۹ روزه فاقد آنتی‌بادی تکثیر گردید. برای این منظور ۰/۲ ml ویروس به حفره آلانتوئیک هر تخم مرغ تلقیح شد و پس از نگهداری تخم مرغ‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت، از دستگاه انکوباتور خارج کرده و مایع آلانتوئیک آن‌ها برداشته شد. محصول حاصل به‌عنوان منبع ویروس در ویال‌های کوچک تقسیم و برای کشت در سلول MDCK در دمای ۷۰°C- ذخیره گردید.

سلول‌های MDCK به همراه ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM حاوی سرم جنین گاو (FBS) به ظرف مخصوص کشت سلولی T-25 منتقل و در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار در دمای ۳۷°C قرار داده شد. سوسپانسیون سلولی حاوی ۱۳۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شد. این حجم به‌دست‌آمده با کمک محیط کشت DMEM و ۱۰٪ FBS به حجم نهایی ۲۵ میلی‌لیتر رسانیده شد. سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر از این مخلوط نهایی به هر یک از خانه‌های پلیت ۲۴ تایی اضافه شد. این پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار با دمای ۳۷°C قرار گرفت.

#### تلقیح ویروس به کشت سلول MDCK و جداسازی آن

پس از مشاهده پلیت ۲۴ تایی در زیر میکروسکوپ و اطمینان از اتصال سلول‌های MDCK به یکدیگر، محیط کشت روی سلول‌ها حذف و دومرتبه با بافر فسفات‌شسته PBS شستشو داده شدند. به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از ویروس استاندارد اضافه گردید. سپس به‌منظور جذب ویروس به سلول، پلیت به مدت یک ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار و در دمای ۳۷°C قرار داده شد پلیت از

بیان‌شده‌اند. در حال حاضر کمتر واکسن‌های فصلی آنفلوآنزای وجود دارد که از ادجوانت‌ها در ترکیب آن‌ها استفاده نشده است (۷). نمک آلومینیوم کاربردی‌ترین واکسن ادجوانت در جهان است. استفاده از این ادجوانت‌ها به همراه آنفلوآنزایی فصلی و واکسن‌های آنفلوآنزایی مرگی مسری، اغلب شکست‌خورده است (۸). بررسی‌های قبل نشان دادند جذب سطحی HA ویروس آنفلوآنزای در آلومینیوم فسفات‌دار در موش‌ها بالا رفته اما پاسخ آنتی‌بادی به واکسن در انسان افزایش پیدا نمی‌کند. مشاهدات غیرقابل‌انکاری مبنی بر این که ادجوانت‌های آلوم مصونیت واکسن آنفلوآنزای را بالا نمی‌برند در دسترس هستند (۹) از طرفی فراوانی بالای عوارض جانبی و موضعی مانع رشد ادجوانت‌های روغنی معدنی شد. پس از اینکه مطالعات گسترده در رابطه با ایمنی‌زایی افزایشی و بی‌خطر بودن MF59 به اثبات رسید اولین مجوز را در سال ۱۹۹۷ برای واکسن ویروس آنفلوآنزایی غیرفعال فصلی در اشخاص سنین ۶۵ و بالاتر را دریافت کرد. MF59 یک ادجوانت روغنی روغن در آب (Oil in Water) است که قسمت روغنی آن اسکوالن (Squalene) است منبع این ماده در طبیعت به‌طور عمده روغن کبد کوسه است که به کمک دو سورفکتانت Tweens و Spans پایدار می‌شود. میزان کارایی MF59 توسط اندازه ذرات امولوسیون (کمتر از ۱۶۰ nm) تعیین می‌شود (۱۰، ۱۱).

واکسن Fluad متشکل از یک بخش ادجوانت MF59 و سه سویه ویروس کشته‌شده در تاریخ ۲۸ نوامبر ۲۰۱۵ مورد تأیید FDA قرار گرفته است (۱۱). ثابت‌شده که کیتوزان با تأثیر برافزایش CD69 روی B Cells و سلول‌های CD4+ T و CD8+ موجب ترشح سایتوکاین‌های پیش التهابی و کاهش تنظیمی CD44 (مارکر مهاری) و TLR4 می‌شود. نقطه قابل‌توجه کیتوزان این است که با فراهم کردن داربست کیتینی موجب رهاسازی آهسته آنتی‌ژن از محل تزریق می‌شود (۱۲، ۱۳). اگرچه تاکنون ادجوانت کیتوزان برای واکسن آنفلوآنزای تأییدیه نگرفته است اما ایمن، بی‌ضرر و پاسخ مطلوب ادجوانت کیتوزان و همچنین فاز-های کلینیکال انجام‌شده آن را به‌عنوان یک کاندید ادجوانت برای واکسن آنفلوآنزا معرفی می‌کند (۷، ۱۴).

در این مطالعه ادجوانت MF59 و MF59 حاوی مشتقات کیتوزان، مرکب از اسکوالن، متیل گلیکول کیتوزان، Tween 80 و Span85 در سیترات بافر pH 6 تولید شد. در انتها خواص

این ادجوانت ساخته شد. به این ترتیب که ترکیب آب مقطر و پلی سوربات ۸۰ (Tween 80) به ۱۰ میلی مول بافر سیترات (pH ۶/۵) اضافه شد میزان غلظت Tween 80 در ترکیب (W/V) ۰/۵٪ بود سپس اسکوالن (W/V) ۵٪ به سوربیتان تری اولفات ۸۵ (Span 85)(W/V) ۰/۵٪ اضافه شد. سپس ترکیب به دست آمده توسط دستگاه ورتکس و هموژنایز به مدت ۱۵ دقیقه همگن شدند. ترکیب همگن شده به وسیله دستگاه میکروفلوئیدر (IKA T18 basic, UK) در پنج سیکل چرخش تحت فشار ۱۲۰۰۰۰ Psi قرار گرفت و سپس از نازل خروج جمع آوری و از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد تا نانو قطرات بزرگ و جرم‌های آن حذف شوند. ادجوانت حاصل تا زمان استفاده در دمای ۴°C - نگهداری شد (۱۷، ۱۸).

#### تولید ادجوانت MF59 مرکب از Methylglycol-chitosan (MF59+)

ترکیب آب مقطر و پلی سوربات ۸۰ (Tween 80) به ۱۰ میلی مول بافر استیک اسید (pH ۵) حاوی ۰/۵ mg/ml Methylglycol-chitosan اضافه شد میزان غلظت Tween 80 در ترکیب (W/V) ۰/۵٪ بود سپس اسکوالن (W/V) ۵٪ به محلول ۰/۵٪ (Span 85 (W/V) اضافه شد. ترکیب به دست آمد توسط دستگاه ورتکس و هموژنایز به مدت ۱۵ دقیقه همگن شدند. ترکیب همگن شده مشابه ادجوانت MF59 میکروفلوئیدر و فیلتر شدند. ادجوانت حاصل تا زمان استفاده در دمای ۴°C - نگهداری شد.

#### اندازه‌گیری میزان پراکندگی، قطر، ویسکوزیته و مورفولوژی نانوقطرات ادجوانت

میانگین قطر، پراکندگی و ویسکوزیته نانوقطرات به روش DLS (Dynamic Light Scattering) توسط دستگاه Zetasizer Nano-ZS90 انجام گرفت به این صورت که نمونه‌ها با آب دیونیزه ۱/۵۰۰۰ رقیق و در دمای ۲۵°C انجام گرفت تمام اندازه‌گیری‌ها به این صورت در ۳ تکرار انجام شد (۱۹، ۲۰).

#### اندازه‌گیری پتانسیل زتا ادجوانت

نمونه‌ها به میزان ۱/۲۰ رقیق گردید و در دمای ۲۵°C و در طول زمان ۳۰ دقیقه و ۱۰۰ به کارگیری (RUN) توسط دستگاه Zetasizer Nano-ZS90 قرائت شد. تمام اندازه‌گیری‌ها در ۳ تکرار انجام شد (۱۹، ۲۰).

#### اندازه‌گیری pH ادجوانت

در مدت زمان نگهداری ادجوانت به صورت دوره‌ای و در مدت

انکوباتور خارج و به هر چاهک پلیت یک میلی‌لیتر از محیط رشد DMEM بدون FBS و حاوی تریپسین-TPCK با غلظت نهایی ۲ μg/ml اضافه گردید.

پس از اضافه نمودن محیط رشد ویروس، پلیت در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار با دمای ۳۷°C به مدت یک هفته نگهداری شدند و هر روز جهت مشاهده اثر آسیب (CPE) در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. جداسازی ویروس مشابه گزارش قبلی انجام گرفت (۱۵). به طور خلاصه گردیان غلظتی ۶۰-۱۵ درصد از ساکاروز تهیه و همراه با مایع رویی کشت سلول در سرعت ۱۰۰۰۰۰ g و به مدت یک ساعت در دما ۴°C سانتریفیوژ گردید. پس از برداشت لایه ویروسی و شستشو با PBS در سرعت ۱۰۰۰۰۰ g و به مدت یک ساعت در دمای ۴°C، پلیت ویروسی در پنج میلی‌لیتر PBS سوسپانسیون مجدد گردید. تیترو ویروس با استفاده از کمیت سنجی (Tissue Culture Infectious Dose 50) روش رید-موش (Reed and Muench) و آزمایش سنجش هم‌آگلوتیناسیون (HA) مشابه گزارش‌های پیشین محاسبه شد (۱۶). پس از جمع‌آوری سوسپانسیون ویروسی به دست آمده از کشت سلولی و انجام تست HA و TCID<sub>50</sub> نمونه‌های با تیترو مناسب جهت تهیه آنتی‌ژن ویروسی و ایمونیزاسیون انتخاب و در دما ۷۰°C - تا زمان استفاده نگهداری شدند.

تولید آنتی‌ژن ویروسی: تولید آنتی‌ژن ویروسی به منظور ترکیب با ادجوانت تهیه شده و تهیه واکسن آنفلوانزای انجام گرفت ویروس A/PR/8/34 سازگار شده با موش در کشت سلول MCDK تکثیر شد قبل از غیرفعال سازی ویروس، میزان دوز ویروس به روش TCID<sub>50</sub> محاسبه شد. پس از برداشت ویروس با فرمالیایمونیزاسیون ۰/۲٪ به مدت نیم ساعت در دمای اتاق غیرفعال شد. غیرفعال بودن ویروس در کشت سلولی MCDK و عدم ایجاد CPE تأیید شد. آنتی‌ژن‌ها به مدت سه روز توسط کسبه دیالیز (۱۰۰۰۰ kD cut off) و بافر PBS در دمای ۴°C دیالیز شدند (۱۵).

#### تولید ادجوانت‌ها

مراحل تولید و اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکوشیمیایی ادجوانت در مرکز رشد و آزمایشگاه فارماسیوتیکس دانشکده داروسازی شیراز انجام گرفت.

#### تولید ادجوانت MF59

ادجوانت MF59 بر طبق فرمول استاندارد تعریف شده برای

Hemagglutination inhibition (HAI) آزمایش ممانعت از هموگلویتیناسیون

به منظور ارزیابی ایمنی همورال ناشی از ادجوانت و ویروس آنفلوانزای، از آزمون HAI استفاده شد. در این آزمون از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای V شکل استفاده گردید. ابتدا ۵۰ میکرولیتر نرمال سالین در هر ۱۲ حفره ریخته شد؛ و پس از تیمار کردن سرم با آنزیم تخریب‌کننده سرم (Serum decay enzyme) به اولین حفره ۵۰ میکرولیتر سرم موشی اضافه گردید و پس از پیتاژ کردن، رقیق‌سازی سریالی دو برابر انجام شد و نهایتاً از حفره آخر ۵۰ میکرولیتر دور ریخته شد. سپس به هر یک از حفره‌ها ۵۰ میکرولیتر آنتی‌ژن HA (۴ واحد) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد.

پس از گذشت این مدت ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز مرغ ۰/۵٪ به همه حفره‌ها اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. آخرین حفره‌ای که در آن ۱۰۰٪ ممانعت از هموگلویتیناسیون وجود داشت به عنوان عیار آنتی آنفلوانزایی واکسن قرائت گردید.

### نتایج

نتایج این تحقیق با برنامه Graph Pad Prism Software (version 5.03. Graph Pad software Inc. San Diego, California) و روش آماری One-Way ANOVA تفسیر و مقایسه بین گروه‌ها توسط آزمون Tukey Test انجام شد. مقدار  $P < 0.05$  معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج آزمون HA از مایع رویی سلول‌های تلقیح شده با ویروس میزان عددی (عیار) هموگلویتیناسیون (HA) عکس رقت ویروس در آخرین چاهک با هموگلویتیناسیون کامل بود. نتایج

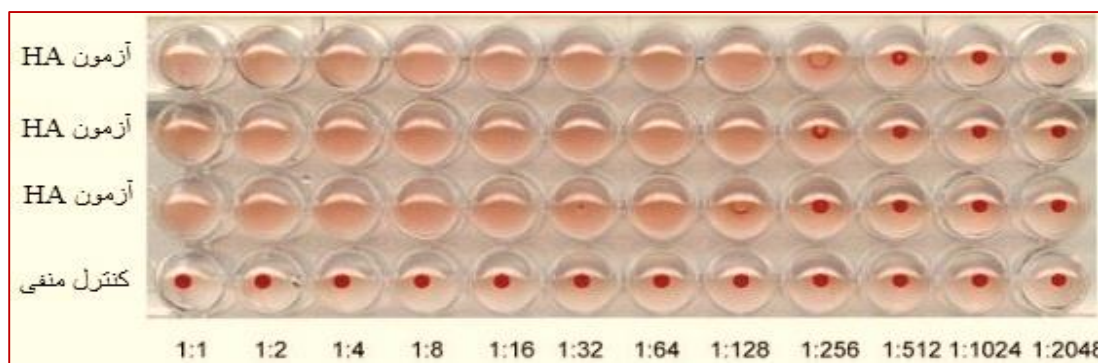
زمان یک سال همراه pH ادجوانت توسط دستگاه pH متر بررسی می‌گردید و میزان نوسانات pH ضبط شد.

### جامعه مورد مطالعه

برای هر گروه آزمایش تعداد ۵ موش ۶ هفته‌ای ماده نژاد Balb/c از مرکز پزشکی مقایسه‌ای دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه گردید. در هر گروه پنج موش برای بررسی میزان پاسخ ایمنی همورال انتخاب گردید. تمامی مراحل آزمایش تحت راهبرد و ملاحظه حیوانات آزمایشگاهی مرکز پزشکی مقایسه‌ای دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام گرفت. گروه‌های مورد آزمایش به صورت زیر تقسیم‌بندی شدند و به صورت غیر وابسته مورد مطالعه قرار گرفتند.

۱) کنترل پلاسبو (PBS) ۲) ادجوانت MF59 (۳) ادجوانت MF59+ (۴) آنتی‌ژن بدون ادجوانت ایمونیزاسیون و جمع‌آوری سرم:

موش‌های ماده شش‌هفته‌ای Balb/c با آنتی‌ژن بدون ادجوانت یا آنتی‌ژن در ترکیب با هر یک از ادجوانت‌های MF59+ و MF59 صورت صفاقی ایمن شدند. برای تهیه فرمولاسیون واکسن، ادجوانت و آنتی‌ژن جمع‌آوری شده از کشت ویروس به نسبت مساوی ترکیب شدند. در مجموع هر موش میزان  $10^4$  TCID<sub>50</sub> از ویروس غیرفعال شده در ۱۰۰ میکرولیتر واکسن دریافت کردند. در گروه کنترل منفی، موش‌ها PBS تنها دریافت کردند. دوز یادآور واکسن در هفته دوم مشابه قبل به موش‌ها تزریق شد پس از گذشت چهار هفته از ایمونیزاسیون موش‌ها با تزریق ۲۰ میکرولیتر کتامین (۵۰ mg/ml) نیمه هوشیار شدند و پس جمع‌آوری خون بطنی و سرم جداسازی شده در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  برای بررسی‌های بعدی نگهداری شد (۲۱).



شکل ۱- نتایج آزمون HA برای سنجش عیار ویروسی. خانه‌هایی که گلبول قرمز ته‌نشین شده به عنوان عدم هموگلویتیناسیون و خانه‌هایی که عدم ایجاد تکه و ته‌نشینی گلبول نشان می‌دهد دلیل بر آگلویتیناسیون گلبول‌های قرمز است. آزمون HA به صورت سه‌گانه انجام گرفت.

## خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ادجوانت‌ها اندازه‌گیری میزان پراکندگی، قطر، ویسکوزیته و مورفولوژی نانوقطرات ادجوانت

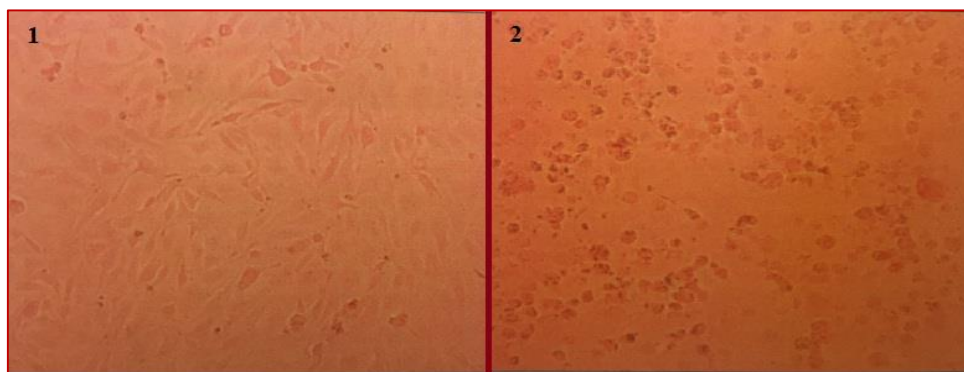
میانگین قطر، پراکندگی و ویسکوزیته نانوقطرات به روش DLS توسط دستگاه Zetasizer Nano-ZS90 انجام گرفت. نتایج حاصل آن در شکل ۳ و جدول ۱ آمده است. همچنین آنالیزی-های فوق ساختاری و مورفولوژی نانوقطرات ادجوانت توسط میکروسکوپ الکترونی و به روش SEM مورد مطالعه قرار گرفت.

**نتایج (HAI) آزمایش ممانعت از هموگلوآگوتیناسیون**  
به‌منظور ارزیابی پاسخ ایمنی همورال ایجادشده توسط واکسن آنفلوانزای، از آزمون HAI استفاده شد. آزمایش ممانعت از

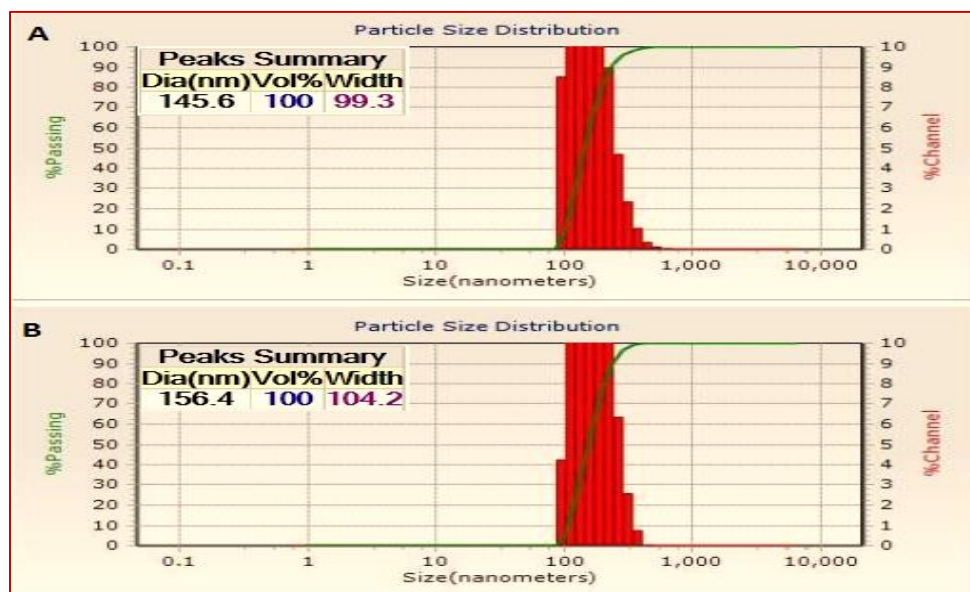
آزمون HA عیار ۱۲۸ برای ویروس تکثیر یافته نشان داد (شکل ۱).

### نتایج آزمون TCID<sub>50</sub>

گرچه آزمون HA عیار ویروس را بیان می‌کند ولی قادر به سنجش ذرات عفونی ویروس (ویروس فعال) نیست. از آنجاکه تعیین عیار ویروس برای تهیه فرمولاسیون واکسن امری ضروری بود. آزمون TCID<sub>50</sub> به‌منظور درک بهتر عیار ویروس و سنجش ذرات عفونی ویروس در نظر گرفته شد. از هر غلظت ویروس (۱ تا ۱۰<sup>۱۰</sup>) به‌صورت چهارگانه به پلیت ۲۴ خانه منتقل گردید و پس از مشاهده CPE ویروس (شکل ۲) در غلظت‌های متفاوت، میزان TCID<sub>50</sub> ۱۰<sup>۸</sup> برآورد شد.



شکل ۲- میزان جرم ویروسی به روش TCID<sub>50</sub> که نشان‌دهنده میزان رقت از ویروس که قادر به عفونی کردن ۵۰٪ از سلول‌های سالم است محاسبه گردید. در تصویر شماره ۱ عدم ایجاد CPE توسط ویروس آنفلوانزای در سلول‌های MDCK و در تصویر ۲ ایجاد CPE در سلول‌های MDCK به‌وسیله ویروس قابل مشاهده است.



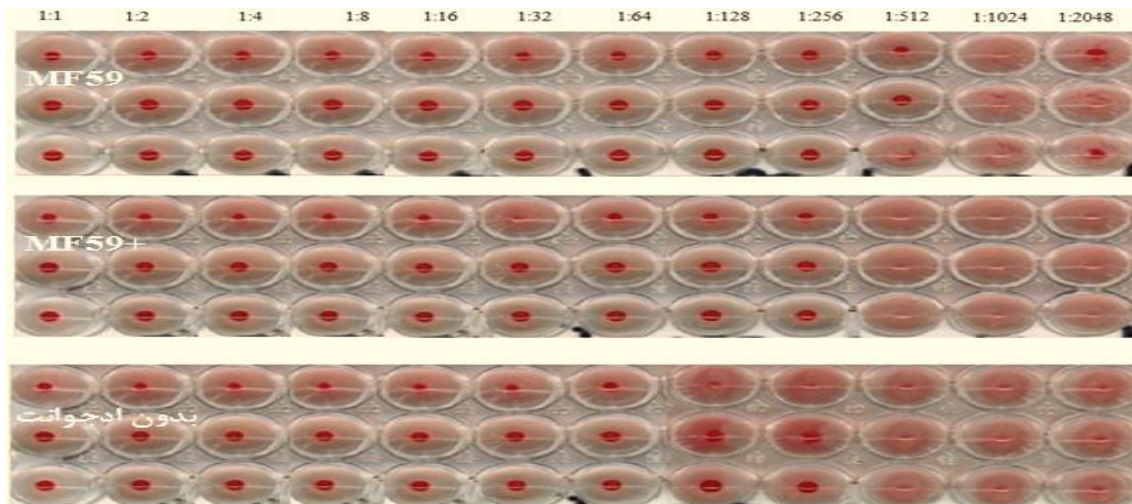
شکل ۳- نمونه گرفت دستگاه DLS که میانگین قطر و پراکندگی نانوقطرات امولوسیون تولیدشده MF59 (تصویر A) و MF59+ را نشان می‌دهد (تصویر B).

معنی‌دار بود. این افزایش عیار در مقایسه گروه واکسن بدون ادجوانت با در نظر گرفتن  $P < 0/001$  معنی‌دار بود. در گروه کنترل PBS عیار HAI پایین‌تر از حد قابل‌شناسایی بود.

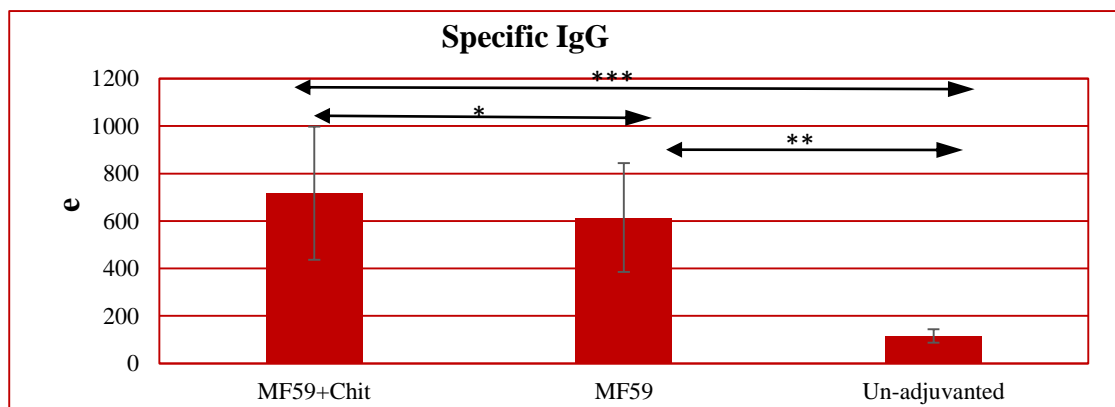
هموگلوآگوتیناسیون (شکل ۴ و نمودار ۱) نشان داد گروه واکسن MF59+ بیشترین عیار HAI را ایجاد می‌کند که در مقایسه با گروه واکسن MF59 با در نظر گرفتن  $P < 0/05$

جدول ۱- خصوصیات فیزیکو-شیمیایی ادجوانت‌های تهیه‌شده اندازه‌گیری شد و به‌صورت میانگین در جدول پایین آورده شده است.

ادجوانت	میانگین قطر نانو قطرات امولوسیون	پتانسیل زتا	ویسکوزیته	pH	pH طی یک سال	توزیع پراکندگی نانو ذرات امولوسیون
MF59	~۱۵۰	۲۹	۰/۷۲	۶/۸	۷/۱ ± ۰/۰۷	۰/۷ ± ۰/۰۲
MF59+	~۱۵۶	۲۵/۵	۰/۷۴	۶/۴	۶/۷ ± ۰/۰۵	۱/۱ ± ۰/۰۳



شکل ۴- تصاویر مربوط به آزمون HAI برای گروه MF59، MF59+ و ویروس بدون ادجوانت. ایجاد تکمه دلیل بر ممانعت از هم‌آگوتیناسیون گلبول‌های قرمز که در نتیجه آن گلبول‌های قرمز ته‌نشین می‌شدند. این حفره‌ها از نظر وجود آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن ویروسی + بودند. عدم وجود آنتی‌بادی‌های ممانعت از هم‌آگوتیناسیون موجب آگوتینه شدن گلبول قرمز شد. عکس رقت آخرین حفره که در آن گلبول‌های قرمز رسوب داشتند به‌عنوان عیار HAI در نظر گرفته شد. گروه‌های مورد آزمایش با سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند.



نمودار ۱- عیار HAI ویروس آنفلوانزای در سرم موش پس از گذشت چهار هفته از ایمونواسیون برای گروه‌های MF59، MF59+ و واکسن بدون ادجوانت بررسی گردید. \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار  $P < 0/05$ ، \*\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار  $P < 0/01$ ، \*\*\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار  $P < 0/001$ . داده‌ها به‌صورت میانگین عیار ± انحراف معیار نشان داده شد.

## بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه تکامل و توسعه ادجوانت MF59 و تولید یک نانو-امولسیون نوآورانه بود. از این رو از مشتقات کیتوزان به عنوان یک هم انتقال (Co-Deliver) و داربست نگهدارنده آنتی ژن در نانو-امولسیون روغن در آب ادجوانت MF59 استفاده شد و ایمنی‌زایی آن نسبت به ادجوانت MF59 و ویروس بدون ادجوانت بررسی شد.

ادجوانت جدید تهیه شده با میانگین سایز نانو ذرات ۱۶۵ و پراکندگی (Polydispersity) ناچیز، رنج نرمال برای ادجوانت MF59 را دربر می‌گرفت. قطر نانو قطرات نقش اساسی در زهکشی لنفوئیدی دارند. همچنین این خصوصیت برای انتقال، برداشت، فراوری و عرضه آنتی ژن که موجب القا پاسخ مناسب و مؤثر سلولی و همورال می‌شود ضروری است (۲۶). Mottram و همکاران در سال ۲۰۰۷ ثابت کردند که قطر نانوذرات کمتر از ۲۰۰ نانومتر مستقیماً از طریق زهکشی لنف در کمتر از چند ساعت به دنبال تزریق در محل به ارگان لنفوئیدی نزدیک می‌رسند. از طرفی این نکته را باید در نظر گرفت که همه ترکیبات ادجوانت به صورت زیستی، سازگار و به عنوان اصول ساخت خوب (GMP) در دسترس باشند (۲۷). نانو امولسیون تهیه شده سایز قطر کمتر از ۲۰۰ نانومتر داشت در نتیجه علاوه بر این که می‌تواند به صورت فیلتر شدن استریل شود این توانایی را دارد که مستقیماً به ارگان‌های لنفاوی برسد. پتانسیل زتا یکی از عوامل کلیدی برای ادجوانت نانو امولسیونی محسوب می‌شود چراکه میزان بار نانوقطرات می‌بایست با گلبول‌های قرمز و همچنین سلول‌های برداشت کننده آنتی ژن سازگاری داشته باشند. افزایش پتانسیل زتا به دلیل ایجاد نیروی دافعه موجب افزایش پراکندگی و ناهمگونی قطر نانو ذرات می‌شود از طرف دیگر کاهش پتانسیل زتا نتایج مخرب‌تر به دنبال دارد چراکه به دلیل کاهش نیروی دافعه نانوذرات جذب یکدیگر شده و موجب به هم آمیختگی (Coalescence) نانو قطرات و در نتیجه ناپایداری نانو امولسیون در مدت زمان کوتاه می‌شود. پتانسیل زتای قابل قبول که بتواند پایداری بلندمدت نانوامولسیون را تضمین کند رنج بین ۳۰-۲۰ قرار می‌گیرد (۲۸، ۲۹). ادجوانت MF59+ به ترتیب با پتانسیل زتای ۲۹ و ۲۵ نشان از پایداری بلندمدت ادجوانت دارند. این نکته مستدل می‌شود که کیتوزان به عنوان یک عنصر بی‌روح (Inert) تأثیر چندانی بر تغییر پتانسیل زتا نانو امولسیون ندارد (۳۰). بررسی تغییرات pH، ویسکوزیته و

یکی از اهداف مهم شرکت‌های تجاری و محققان تکامل و توسعه واکسن آنفلوآنزای به وسیله یک ادجوانت بالقوه که بتواند مصونیت متقاطع علیه آنتی‌ژن‌های متفاوت سویه‌های ویروسی آنفلوآنزای ایجاد کند است. برای افزایش پاسخ ایمنی و مصونیت علیه ویروس آنفلوآنزای، تأثیر سیستم‌های مختلف ادجوانت از جمله گیاهان، حشرات، باکتری‌ها و ترکیبات دارویی-شیمیایی شامل نانو امولسیون‌ها، کمپلکس‌های تحریک‌کننده سیستم ایمنی (ISCOMs)، کیتوزان و لیپوزوم‌ها در مدل موشی بررسی شده‌اند (۲۲). MF59 یک ادجوانت امولسیونی روغن در آب است که برای واکسن‌های آنفلوآنزایی فصلی و پاندمیک در ترکیب با سه سویه ویروسی شامل دوسویه A (H3N2 و H1N1) و یک سویه B تحت عنوان Fluvad توسط شرکت Novartis تولید شد و در نوامبر ۲۰۱۵ مجوز FDA دریافت کرد (۲۳) این ادجوانت به خوبی نشان داده که قادر به ایجاد ایمنی متقاطع (Cross-reactive immunity) علیه دیگر سویه‌های ویروسی در مدل موش و انسان است. تجربه‌های پیش در مانگامی نشان دادند که MF59 در ترکیب با یک تقویت‌کننده سیستم ایمنی (Immunopotentiators) می‌تواند پاسخ ایمنی بهتری نسبت به تنها MF59 داشته باشد؛ اما متأسفانه در بیشتر مواقع همراه با تأثیرات مخرب جانبی همراه بوده است. به‌هر حال تاکنون این چنین تقویت‌کننده ایمنی مناسب و سازگار شناسایی نشده است (۲۴، ۲۵). ترکیب دودسته اجودانت با لحاظ داشتن خصوصیات، ویژگی‌ها و سازگاری‌هایشان با یکدیگر می‌تواند پاسخ ایمنی بسیار قوی‌تری به پاتوژن‌های سرسخت ایجاد کند. از آنجایی که MF59 یک سیستم انتقالی (Delivery system) است با در نظر داشتن عوارض جانبی احتمالی، یک محرک سیستم ایمنی که قبلاً به عنوان یک عنصر بدون عوارض و سالم برای تولید دارویی به تائید FDA رسیده است ([www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm)) به MF59 تلفیق شد. در این مطالعه، عدم وجود معرف استاندارد برای ویروس آنفلوآنزایی A/PR/8/34 به ما اجازه تعیین آنتی ژن HA به عنوان جز اصلی واکسن را نمی‌داد. از این رو آنتی ژن واکسن در الگوی TCID<sub>50</sub> سنجش و تعریف شد. علیرغم این محدودیت، نتایج جالب توجه ما نشان می‌دهد که روش تعیین آنتی ژن تعریف شده در مطالعات آینده واکسن آنفلوآنزای در ترکیب با ادجوانت MF59+ قابل اعتماد هستند. هدف از این

بودن ادجوانت MF59 یا کیتوزان و مشتقات آن نشان داده بودند (۳۱، ۳۹-۳۵).

برای فهم بهتر خاصیت ادجوانتی MF59+ سه پیشنهاد ارائه می‌شود. (۱) ایمنی طولانی مدت ادجوانت MF59+ بررسی شود (۲) گرچه تزریق داخل صفاقی واکسن موجب افزایش تیتراژ آنتی-بادی خنثی‌کننده در برابر ویروس آنفلوآنزایی شده، با این حال خاصیت ایمنی‌زایی آن در تزریق داخل بینی مشخص نیست. (۳) انجام آزمون‌های تکمیلی نظیر بررسی پاسخ سلولی و ایجاد پروفایل سایتوکاینی توسط واکسن درک بهتری از میزان ایمنی‌زایی MF59+ نشان خواهد داد.

این مطالعه اولین بررسی پاسخ ایمنی مشتقات کیتوزان در ترکیب با ادجوانت MF59 (MF59+) برای واکسیناسیون ویروس آنفلوآنزایی بود. ادجوانت MF59+ به‌طور موفق توانست خواص فیزیکی-شیمیایی و پایداری نشان دهد. نتایج نشان داد که MF59+ با افزایش تنظیمی پاسخ همورال می‌تواند به‌عنوان یک ادجوانت بی‌خطر و ایمن برای واکسیناسیون ویروس آنفلوآنزا و دیگر پاتوژن‌های ضعیف در تحریک سیستم ایمنی در نظر گرفته شود.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از رساله دکترای ایمنی‌شناسی است که توسط دانشگاه ارومیه و به شماره ۱۹۳-۹۸-د ثبت شده است. نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر را از خانم دکتر فتوحی برای اهدای سویه ویروس PR8 را دارند.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

مشاهدات ماکروسکوپی ناشی از جداسازی فازی هر دو ادجوانت تهیه‌شده، در قبل و بعد از ترکیب با آنتی‌ژن تأیید‌کننده پایداری ادجوانت‌ها است.

واکسیناسیون موش‌ها با ادجوانت MF59+ به‌صورت معنی‌داری موجب افزایش تیتراژ HAI و ویروس نسبت به واکسیناسیون با ادجوانت MF59 یا واکسن بدون ادجوانت شد. Heip و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که میزان 1mg/ml از کیتوزان (DAD 85 and 3kDa Mw) به همراه ویروس غیرفعال شده آنفلوآنزایی H5N1 کاملاً برای موش بی‌ضرر بوده و میزان آنتی-بادی اختصاصی بیشتر از ادجوانت‌های معمول آلوم و ادجوانت فروند است (۳۱). Dzung و همکاران در سال ۲۰۱۱ خاصیت ادجوانتی کیتوزان در Mwهای ۲۰، ۳۰ و ۳۰۰ و درجه DAD متفاوت کیتوزان را برای آنفلوآنزایی H1N1 امتحان کردند و نشان داده شد که وزن مولکولی ۳۰۰ و DAD ۸۵٪ بیشترین پاسخ همورال را به همراه دارد و در همه گروه‌ها به‌استثنای گروه آنتی‌ژن پس از گذشت ۲۰ روز پاسخ ایمنی ۱۰۰٪ بود (۳۲). Wu و همکاران در سال ۲۰۱۲ برای واکسیناسیون آنفلوآنزای از کیتوزان اصلاح‌شده استفاده کرده و مشاهده کردند که میزان آنتی‌بادی ترشحی در گروه هیدروزول کیتوزان و آنتی‌ژن H5N1 به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه آنتی‌ژن به همراه ادجوانت MF59 بود (۳۳). Malik و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند دیگر شکل اصلاح‌شده کیتوزان Trimethyl-chitosan (TMC) در ترکیب با آنفلوآنزایی PR8 و تجویز از طریق بینی می‌تواند تیتراژ آنتی‌بادی را افزایش دهد (۳۴).

در این تحقیق پس از ایمنوزاسیون موش با ادجوانت MF59 و MF59+ هیچ‌گونه نشانه‌ای مبنی بر واکنش موضعی یا آزردهگی محل مشاهده نشد. همچنان که مطالعات قبل بی‌خطر و ایمن

### References

- Shaw M, Palese P, Knipe DM, Howley PM. Orthomyxoviruses. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. P 65-56
- Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. Nature Reviews Microbiology. 2011;9(8):590-603
- García-Sastre A. Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses. Virus research. 2011;162(1):12-8.
- Mertz D, Kim TH, Johnstone J, Lam P-P, Kuster SP, Fadel SA, et al. Populations at risk for severe or complicated influenza illness: systematic review and meta-analysis. Bmj. 2013;347:f5061.
- van der Velden MV, Geisberger A, Dvorak T, Portsmouth D, Fritz R, Crowe BA, et al. Safety and immunogenicity of a Vero cell culture-derived whole-virus H5N1 influenza vaccine in chronically ill and immunocompromised patients. Clinical and Vaccine Immunology. 2014;CVI. 00065-14.





6. Hannoun C. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines. *Expert review of vaccines*. 2013;12(9):1085-94.
7. Barclay T, Petrovsky N. Vaccine adjuvant nanotechnologies. *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development*: Elsevier; 2017. p. 127-47.
8. Jafari M, Moghaddam Pour M, Taghizadeh M, Masoudi S, Bayat Z. Comparative assessment of humoral immune responses of aluminum hydroxide and oil-emulsion adjuvants in Influenza (H9N2) and Newcastle inactive vaccines to chickens. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2017;45(1):84-9.
9. Davenport FM, Hennessy AV, Bell JA. Immunologic advantages of emulsified influenza virus vaccines. *Military medicine*. 1962;127(2):95-100.
10. Heegaard PM, Dedieu L, Johnson N, Le Potier M-F, Mockey M, Mutinelli F, et al. Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. *Archives of virology*. 2011;156(2):183-202.
11. Singh M. Vaccine adjuvants and delivery systems: 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: John Wiley & Sons; 2007. P 569-31.
12. Borges O, Borchard G, de Sousa A, Junginger HE, Cordeiro-da-Silva A. Induction of lymphocytes activated marker CD69 following exposure to chitosan and alginate biopolymers. *International journal of pharmaceuticals*. 2007;337(1):254-64.
13. Chen C-L, Wang Y-M, Liu C-F, Wang J-Y. The effect of water-soluble chitosan on macrophage activation and the attenuation of mite allergen-induced airway inflammation. *Biomaterials*. 2008; 29(14):82-2173
14. Vasiliev YM. Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation. *Expert review of vaccines*. 2015;14(1):37-53.
15. Merten O-W, Hannoun C, Manuguerra J-C, Ventre F, Petres S. Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation. *Novel Strategies in the Design and Production of Vaccines*: Springer; 1996. p. 141-51.
16. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology*. 1938;27(3):493-7.
17. O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, Rappuoli R, Giudice GD. The history of MF59® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert review of vaccines*. 2013;12(1):13-30.
18. O'Hagan DT. Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols: 3<sup>rd</sup> ed. New York; Humana Press; 2017. P 486-295
19. Deng J, Cai W, Jin F. A novel oil-in-water emulsion as a potential adjuvant for influenza vaccine: Development, characterization, stability and in vivo evaluation. *International journal of pharmaceuticals*. 2014;468(1):187-95.
20. Yu S, Tang C, Shi X, Yang P, Xing L, Wang X. Novel Th1-biased adjuvant, SPO1, enhances mucosal and systemic immunogenicity of vaccines administered intranasally in mice. *Vaccine*. 2012;30(36):5425-36.
21. Harris K, Ream R, Gao J, Eichelberger MC. Intramuscular immunization of mice with live influenza virus is more immunogenic and offers greater protection than immunization with inactivated virus. *Virology journal*. 2011;8(1):251.
22. Vemula SV, Sayedahmed EE, Sambhara S, Mittal SK. Vaccine approaches conferring cross-protection against influenza viruses. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16(11):1141-54.
23. Patel S, Faraj Y, Duso DK, Reiley WW, Karlsson EA, Schultz-Cherry S, et al. Comparative Safety and Efficacy Profile of a Novel Oil in Water Vaccine Adjuvant Comprising Vitamins A and E and a Catechin in Protective Anti-Influenza Immunity. *Nutrients*. 2017;9(5): 2875-258
24. Baudner BC, Ronconi V, Casini D, Tortoli M, Kazzaz J, Singh M, et al. MF59 emulsion is an effective delivery system for a synthetic TLR4 agonist (E6020). *Pharmaceutical research*. 2009;26(6):1477-85.
25. O'Hagan DT, Ott GS, Nest GV, Rappuoli R, Giudice GD. The history of MF59((R)) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev Vaccines*. 2013;12(1):1-30
26. Hubbell JA, Thomas SN, Swartz MA. Materials engineering for immunomodulation. *Nature*. 2009;462(7272):449.
27. Mottram PL, Leong D, Crimeen-Irwin B, Gloster S, Xiang SD, Meanger J, et al. Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. *Molecular pharmaceuticals*. 2007;4(1):73-84.
28. Herman C, Groves M. Hydrolysis kinetics of phospholipids in thermally stressed intravenous lipid emulsion formulations. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 1992;44(7):539-42.

29. Deng J, Cai W, Jin F. A novel oil-in-water emulsion as a potential adjuvant for influenza vaccine: development, characterization, stability and in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2014;468(1-2):187-95.
30. Meraz KAS, Vargas SMP, Maldonado JTL, Bravo JMC, Guzman MTO, Maldonado EAL. Eco-friendly innovation for nejayote coagulation-flocculation process using chitosan: Evaluation through zeta potential measurements. *Chemical Engineering Journal.* 2016;284:42-536
31. Hiep L, Thanh M, Van D, Khanh V, Dzung N. Chitosan as a hopeful adjuvant for H5N1 influenza vaccine. *Journal Chitin and Chitosan.* 2008;13(10):6-8.
32. Dzung NA, Hà NTN, Van DTH, Phuong NTL, Quynh NTN, Hiep DM, et al. Chitosan nanoparticle as a novel delivery system for A/H1n1 influenza vaccine: safe property and immunogenicity in mice. *World Academy of Science, Engineering and Technology.* 2011;60:1839-46.
33. Wu Y, Wei W, Zhou M, Wang Y, Wu J, Ma G, et al. Thermal-sensitive hydrogel as adjuvant-free vaccine delivery system for H5N1 intranasal immunization. *Biomaterials.* 2012;33(7):2351-60.
34. Malik A, Gupta M, Gupta V, Gogoi H, Bhatnagar R. Novel application of trimethyl chitosan as an adjuvant in vaccine delivery. *International journal of nanomedicine.* 2018;13:7959.
35. Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J, Ebihara H, et al. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature.* 2007;445(7125):319-23.
36. Sawaengsak C, Mori Y, Yamanishi K, Mitrevej A, Sinchaipanid N. Chitosan nanoparticle encapsulated hemagglutinin-split influenza virus mucosal vaccine. *AAPS PharmSciTech.* 2014;15(2):317-25.
37. Vesikari T, Groth N, Karvonen A, Borkowski A, Pellegrini M. MF59®-adjuvanted influenza vaccine (FLUAD®) in children: Safety and immunogenicity following a second year seasonal vaccination. *Vaccine.* 2009;27(45):6291-5.
38. Pellegrini M, Nicolay U, Lindert K, Groth N, Della Cioppa G. MF59-adjuvanted versus non-adjuvanted influenza vaccines: integrated analysis from a large safety database. *Vaccine.* 2009;27(49):6959-65.
39. Dzung NA. Chitosan and chitosan derivatives as potential adjuvants for influenza vaccine. *Chitin and Chitosan Derivatives: Advances in Drug and Discovery and Developments*, Publisher: CRC Taylors & Francis, Editors: Se Kwon Kim. 2014.

## Original Article

## Development of MF-59 Adjuvant Using Chitosan Derivatives to Influenza Vaccine

Loghmani A<sup>1\*</sup>, Daldrezh N<sup>1</sup>, Moattari A<sup>2</sup>

1. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran

2. Department of Virology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 25 Feb 2020

Accepted: 07 May 2020

### Abstract

**Background & Objective:** The influenza virus causes hundreds of deaths in the world. Despite the availability of some authorized vaccines for all age groups and its approved beneficial effects, the influenza is still a major problem for public health.

**Materials & Methods:** In this study, the adjuvant of MF59 was developed by methylglycol-chitosan. The physico-chemical characteristics and immune response stimulation of novel adjuvant were measured in combination with the influenza virus.

**Results:** The new adjuvant was produced with a nano-droplet diameter of 156 and Zeta potential of 29. The pH of adjuvant was not significantly changed for two years. Immunization of mice with developed adjuvant makes more HAI titer than MF59 adjuvant.

**Conclusion:** The favorable characteristics of physico-chemical properties and lack of local side effects of developed adjuvant as well as its strong humoral immunity can introduce it as a novel MF59 adjuvants.

**Keywords:** Vaccine, Influenza, MF59, Methylglycol-chitosan, Adjuvant

\*Corresponding Author: Loghmani Alireza, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran

Email: Alireza\_trtr@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0001-8994-2691>