ارزیابی ایمنی‌زایی نوکلئوپروتیین نوترکیب آنفلوانزا (NP) جهت دستیابی به واکسن یونیورسال

علی ترابی[۱و۲]، بهرخ فرهمند[۲]، محمدرضا ذوالفقاری[۱*]، فاطمه فتوحی[۲]، محسن زرگر[۱]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران.
۲- بخش آنفلوانزا و ویروس‌های تنفسی شایع، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: قم، دانشگاه آزاد اسلامی قم، دانشکده علوم پایه، واحد قم، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۰۲۵-۳۷۷۸۰۰۰۱
E-mail: mreza.zolfaghary@gmail.com

چکیده

دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۷ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۴ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۴ آنلاین: ۱۴۰۰/۱۱/۰۱

زمینه و هدف: نوکلئوپروتیین (NP) پروتیین بسیار محافظت شده ویروس آنفلوانزا، می‌تواند به‌عنوان یک گزینه برای تولید واکسن یونیورسال استفاده گردد. ادجوانت آلومینیوم هیدروکساید با تغییر در تاخوردگی اپی‌توپ‌ها، ایمنی‌زایی را بهبود می‌بخشد، اما به‌دلیل عوارض سمیت برای سیستم عصبی، بهتر است از گزینه‌های مطلوب‌تر نظیر ادجوانت‌های با پایه کربوهیدرات استفاده گردد. سوکروزاستر نوعی ماده فعال سطحی غیر یونی است، که قابلیت‌های سازگاری با بدن انسان و تجزیه‌پذیری در طبیعت و وجود هشت جایگاه استری شدن و خواص فیزیکوشیمیایی و زیستی را دارد. در این پژوهش ایمنی‌زایی مولکول نوکلئوپروتئین نوترکیب با ادجوانت سوکروزاستر و حفاظت‌بخشی آن مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی: وکتور نوترکیب (PET-28a-NP) بیانی در سیستم پروکاریوتی جهت تهیه نوکلئوپروتیین در پژوهشی تجربی در بخش آنفلونزا انستیتو پاستور ایران در نیمه دوم سال ۱۳۹۶ بیان و تخلیص شد و در ادامه ایمنی‌زایی آن، با و بدون ادجوانت‌های سوکروزاسترو آلومینیوم هیدروکساید در مدل موش بالبسی (BALB/c) و پاسخ ایمنی هومورال و سلولی و میزان حفاظت بخشی در مدل حیوانی در پاییزسال ۱۳۹۸ بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که مولکول نوترکیب NP می‌تواند در حضور ادجوانت سوکروزاستر مشابه آلوم در مدل موش BALB/c پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی مناسب القا کند و قابلیت حفاظت‌بخشی در برابر ویروس با دوز کشنده را دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد موش‌های واکسینه شده با نوکلئوپروتیین، با ادجوانت سوکروزاستر، می‌توانند پاسخ‌های ایمنی مناسب را ایجاد کنند. قدرت ایمونوژنیک این ترکیب پروتیینی با فعال‌سازی ایمنی هومورال از طریق اندازه‌گیری IgGs (کل و زیر تیپ‌ها) و ایمنی سلولی با اندازه‌گیری سایتوکاین‌های اینترفرون گاما (IFN-γ) و اینترلوکین ٤ (IL-4) تایید شد. نتایج نشان داد که ادجوانت کربوهیدراتی واجد سوکروزاستر در ترکیب با پروتیین NP در مقایسه با ادجوانت آلوم می‌تواند محافظت و ایمنی قابل قبولی در برابر سویه همولوگ (H1N1) ویروس آنفلوانزای A ایجاد کند.

کلمات کلیدی: ادجونت، ویروس آنفلوانزای A، نوکلئوپروتیین، نوترکیب، سوکروز استر، واکسن یونیورسال.

مقدمه

از زمان اولین همه‌گیری آنفلوانزادر سال ۱۹۱۸ و سپس همه‌گیری H1N1 در سال ۲۰۰۹ تا به امروز، جهان هنوز با تهدید بهداشت عمومی ناشی از این ویروس دست و پنجه نرم می‌کند. ویروس آنفلوانزای A و زیرگروه‌های (Sub type) آن بیشتر مسئول انتشار آنفلوانزا در بین انسان‌ها هستند.[۱] این عوامل بیماری‌زای سیستم تنفسی باعث مرگ‌ومیر و عوارض قابل توجهی می‌شوند.[۲] تقریبا ۵-۳ میلیون نفر سالانه به‌علت ابتلا به ویروس آنفلوانزا دچار بیماری شدید می‌شوند که منجر به ۲۹۰۰۰۰ تا ۶۵۰۰۰۰ مرگ می‌گردد.[۳]

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

واکسیناسیون یک راه حل موثر برای توقف انتشار بیماری آنفلوانزا است و واکسن‌های فعلی آنفلوانزا باید هر سال براساس سویه‌های جدید ویروس در حال گردش بهینه شوند و اثربخشی آن‌ها بسته به پیش‌بینی‌های دقیق سویه‌های در گردش هر سال بسیار متغیر است.[۴و۵]

علاوه بر این، ایمنی‌زایی و حفاظت توسط واکسن‌های فصلی آنفلوانزا، همه ویروس‌های آنفلوانزای نوظهور و همه‌گیر را پوشش نمی‌دهد. محدودیت‌های موجود در واکسن‌های فعلی تاکید نیاز به توسعه واکسن‌های یونیورسال (UIV) با قابلیت حافظت‌بخشی گسترده را نشان می‌دهد.

واکسن آنفلوانزای ایده‌آل، واکسنی است که بتواند همه ویروس‌های آنفلوانزای A و B با تغییرات آنتی‌ژنیک شیفت یا دریفت (Antigenic shift or drift)، با زیرگروه (Sub type) هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) را پوشش دهد. یک واکسن با اثر محافظتی گسترده، می‌تواند یک پوشش ایمنی کامل را به‌وجود بیاورد.[۶]

گلیکوپروتیین‌های سطحی هماگلوتینین (HA) و نورامینیداز (NA)، بیشترین تغییرات ژنتیکی را به‌دلیل تغییر آنتی‌ژنی و یا رانش ژنتیکی متحمل می‌شوند.[۷] این تغییرات نه‌تنها اثر واکسیناسیون را کاهش می‌دهند بلکه هزینه تولید واکسن‌های جدید را نیز افزایش می‌دهد. برای غلبه بر این موانع، استفاده از پروتیین‌های با تغییرات کمتر و یا بیشتر حفاظت شده در فرمول واکسن در نظر گرفته می‌شود. یکی از این کاندیدها، نوکلئوپروتیین (NP) با ۹۰٪ شباهت توالی در انواع سویه‌های ویروس آنفلوانزای نوع A حفاظت شده است.[۸]

نقش اصلی پروتیین NP در طی عفونت ویروسی، تحریک سیستم ایمنی و القای ایمنی متقاطع در بین همه سویه‌های ویروس آنفلوانزا می‌باشد و محرک قوی برای سلول T جهت القای ایمنی سلولی شناخته می‌شود.[۹] به همین دلیل، به‌صورت کامل یا قطعاتی از مولکول NP در سیستم‌های بیانی مختلف برای طراحی واکسن‌های مختلف تولید شده است.

به‌عنوان مثال در این مطالعه Huang وهمکاران نشان دادند که ویروس NP آنفلوانزای A که از دو میزبان بیان (E.coli و ویروس نوترکیب واکسینیا) با ادجوانت آلوم (Alum adjuvant) به‌دست می‌آید می‌تواند حفاظت متقابل را در موش‌ها تقویت کند.

آن‌ها نشان دادند که پروتیین نوترکیب NP همراه با ادجوانت آلوم می‌تواند سلول‌های T helper نوع یک (Th1) را القا کند و موش‌های C57BL6 را در برابر چالش ویروس آنفلوانزا محافظت نماید.[۱۰]

در پژوهشی Campo و همکاران با استفاده از آنتی‌ژن محافظت شده نوکلئوپروتیین (NP) ویروس آنفلوانزا، واکسن OVX836 را ساختند که یک واکسن پروتیینی نوترکیب براساس نوکلئوپروتیین الیگومریزه (Oligomerized nucleoprotein) می‌باشد، که افزایش جذب سلول‌های دندریتیک وتحریک بیشتر سیستم ایمنی در مقایسه با NP غیر الیگومریزه را نشان می‌دهد.

به روش عضلانی در موش‌های C57BL/6 آزمایش نمودند که واکسن OVX836 باعث واکنش‌های سیستمیک سلول‌های T CD4+and CD8 و ایجاد سلول‌های خاطره در پارانشیم ریه شد و به طرز شگفت‌انگیزی OVX836 موش‌ها را در برابر چالش‌های ویروسی با سه زیرگروه (Sub type) مختلف آنفلوانزای A محافظت کرد.[۱۱]

در مطالعه‌ای Saleh وهمکاران از یک بخش نوترکیب NP در پروتیین کایمریک 3M2e-HA2-NP به‌عنوان نامزد واکسن با و بدون ادجوانت آلوم استفاده شد.[۱۲] استفاده از ادجوانت‌ها می‌تواند پاسخ‌های ایمنی را با القای ایمنی هومورال و سلولی تقویت کند.[۱۳]

اهمیت ادجوانت در طول شیوع بیماری مشخص می‌شود که واکنش سریع به‌ویژه در جمعیت‌های پر خطر مورد نیاز است. نمک آلومینیوم، معروف به آلوم، اصلی‌ترین و رایج‌ترین ماده کمکی در واکسن‌ها است و برای اولین بار در دهه ۱۹۲۰ در واکسن دیفتری استفاده شد.[۱۴]

Glenny و همکاران در تحقیقات خود افزایش قابل توجهی در اثر واکسیناسیون با افزودن سولفات آلومینیوم پتاسیم گزارش کردند.[۱۵]

امروزه بسیاری از واکسن‌های تایید شده توسط FDA برای واکسیناسیون انسانی، به‌همراه با آلوم وجود دارد.[۱۶]

اگرچه تولید ادجوانت حاوی آلومینیوم ارزان است، اما برای همه افراد بی‌خطر نیست.[۱۷] شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد نمک آلومینیوم به‌عنوان ادجوانت می‌تواند باعث ایجاد سندرم‌هایی مانند اختلالات طیف اوتیسم (ASD) شود و ممکن است بیماری‌های خودایمنی (Autoimmune disease) مانند لوپوس اریتماتوز سیستمی (SLE)، سندرم شوگرن و روماتیسم مفصلی را در افراد مستعد ژنتیکی تحریک کند.[۱۷]

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

بنابراین، محققان در تلاش هستند تا جایگزین‌هایی برای جایگزینی یا حذف آن از ترکیب واکسن‌ها بیابند. تا به امروز، ادجوانت‌های مبتنی بر آلوم دارای انحصار واکسن‌های انسانی در ایالات متحده هستند، اگرچه ادجوانت‌های امولسیون روغن، مانند MF59، در اروپا و سایر حوزه‌ها کاربرد محدودی داشته‌اند.

دلیل تسلط آلوم در بازار این است قدرت ایمنی‌زایی آن از بسیاری ادجوانت‌های دیگر بهتر است، اما قوانین نظارتی برای هرگونه ادجوانت جدید الزامی است تا ثابت کند که مزایای آن بدون هرگونه عارضه و اثربخشی، بیشتر است و این امر باعث می‌شود چالش برتری آلوم برای ادجوانت‌های جدید دشوار باشد. ایمنی طولانی مدت آلوم بدیهی تلقی می‌شود به این معنا که هر واکسن جدیدی که حاوی ادجوانت جدید باشد رقابت با آلوم دشوار است.[۱۸]

کربوهیدرات‌ها نقش مهمی در سیستم ایمنی بدن ایفا می‌کنند و از مزیت‌های سازگاری زیستی، سمیت کم، زیست تخریب‌پذیری متابولیزه شدن و دفع آسان برخوردار هستند و احتمال کمتری برای ایجاد متابولیت‌های سمی یا رسوبات طولانی مدت بافتی نسبت به نمک‌های آلومینیوم را دارند. این بدان معنا است که تجمع ادجوانت و فعال شدن بیش از حد یا مزمن در سیستم ایمنی هنگام استفاده از ترکیبات کربوهیدرات کمتر احتمال دارد.[۱۹]

در این مطالعه، کارآیی نوکلئوپروتیین نوترکیب تهیه شده در سیستم پروکاریوتی در ترکیب با ادجوانت با پایه کربوهیدراتی سوکروز استر (Sucrose ester) ارزیابی گردید و ایمنی محافظتی آن با ادجوانت‌های آلوم و در مقایسه با نمونه‌های کنترل در موش BALB/c در برابر چالش ویروس آنفلوانزای A بررسی شد.

روش بررسی

تولید و تخلیص پروتیین نوترکیب NP: ناقل پپتیدی نوترکیب pET-28a/NP حاوی ژن‌های مقاوم به کانامایسین و تتراسایکلین، در تحقیقات پیشین در بخش آنفلوانزا و ویروس‌های تنفسی شایع انستیتو پاستور ایران ساخته شده است.[۲۰]

ساختار شامل یک ناحیه حفاظت شده از پروتیین کاندید واکسن است. ژنوم توالی مکمل نوکلوپروتیین NP (1700-1) جفت باز با شماره پیوست: LC120392 می‌باشد.

وکتور نوترکیب مجددا توسط هضم آنزیمی مورد ارزیابی قرار گرفت و پس از تایید در میزبان E.coli BL21(DE3) بیان گردید. پروتیین نوترکیب با استفاده از SDS-PAGE و وسترن بلات (Western blot) تایید شد.[۲۰]

به‌طور خلاصه، وکتور نوترکیب به باکتری‌های دارای صلاحیت منتقل و در پلیت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۵۰ µg/ml) و تتراسایکلین (۱۰ µg/ml) کشت داده شد. افزایش تولید پروتیین نوترکیب در محیط مایع LB Broth تلقیح شده با یک کلنی تک حاوی یک وکتور نوترکیب انجام شد. سوسپانسیون‌های باکتریایی سپس در دمای ٤°C و در ۱۰۰۰۰ rpm، ۱۰ دقیقه، سانتریفیوژ شدند و رسوب باکتریایی در دمای ۲۰°C- ذخیره شدند.

استخراج پروتیین با استفاده از بافر لیزکننده واجد اوره ۸ molar (اوره و بافر حاوی ۵۰ mili molar از NaH2PO4 و ۳۰۰ mili molar از NaCl به نسبت ۱:۵ (W/W) به رسوب باکتریایی اضافه شد و سوسپانسیون هموژنیزه گردید. در دمای ٤°C به‌مدت ۳۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی داخل یخچال قرار داده شد.

برای تخریب دیواره سلول‌ها ۲۰ مرتبه از دستگاه اولتراسوند هر بار ۳۰–۲۵ پالس با قدرت ۸۵٪ (ولتاژ ۲۵۰ v) هر نوبت ۳۰ ثانیه استفاده شد. سپس در ۱۰۰۰۰ rpm و ٤°C ، پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری مجددا در بافر لیزکننده حاوی اوره تعلیق شد. مراحل بالا تکرار گردید تا رسوبی باقی نماند و میزان پروتیین استخراج شده با استفاده از SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت.

تخلیص پروتیین نوترکیب با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی-protino® Ni-TED 1000 packed(MN, MACHEREY NAGEL (ساخت کشور آلمان) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد.

به‌طور خلاصه، لیزات باکتریایی روی ستون بارگذاری شده و با محلول ایمیدازول ۵ mili molar در pH=۸ شست‌وشو داده شد. سپس، برای حذف اوره و نمک از کیسه دیالیز با Cut off 10000 (MW CO) استفاده شد. دیالیز در بافر فسفات نمکی (PBS) با pH=۷/۲ در دمای ٤°C و در طول شب، انجام شد و پروتیین با ایمیدازول (۳۰۰ mili molar) حاوی اوره (۸ mili molar) شسته شد. پس از حذف اوره، غلظت پروتیین با روش بردفورد (Bradford protein assay) تخمین زده شد.[۲۱]

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

میزان لیپوپلی ساکارید (LPS) پروتیین نوترکیب با روش LAL (Gel Clot) (LONZA N289-06) اندازه‌گیری شد، نتیجه اینکه میزان اندوتوکسین در حد قابل قبول LAL<1EU/ml بود.

واکسیناسیون حیوانات: چالش حیوانی براساس دستورالعمل کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران (IR.PII.REC.1395.82) تایید و انجام شد.

۱۱۹ سر موش که از انستیتو پاستور کرج خریداری شده بودند پس از یک هفته نگهداری به‌طور تصادفی به شش گروه ۱۷ تایی تقسیم شدند. حیوان‌ها در اتاق تهویه مطبوع با دمای ۲۵±۲°C و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، با رطوبت ۵۰±۵٪ ارزیابی شدند. این موش‌ها دسترسی راحت به رژیم غذایی استاندارد و آب داشتند.

گروه یک فقط NP، گروه دوم NP با ادجوانت آلوم (NP+Alum) و گروه سوم NP با ادجوانت سوکروز استر (NP+SE) و گروه چهارم ویروس غیر فعال PR8 به‌عنوان کنترل مثبت و گروه‌های ۵ و۶ و ۷ به‌ترتیب Alum، SE و PBS دریافت کردند.

موش‌هایی که PBS و آلوم و سوکروز استر دریافت کردند به‌عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شدند. ترکیبات به‌صورت تحت جلدی در حجم کل ۱۰۰ µl حاوی ۱۵ µg پروتیین NP تجویز شد. مراحل تزریق سه بار تزریق با فاصله ۱۵ روز انجام شد.

اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد NP: دو هفته پس از هر ایمن‌سازی، نمونه‌های خون از پنج سر موش از هر گروه و پیش از تزریق دوز پس از آن از طریق سینوس اوربیتال چشمی توسط لوله مویین گرفته شد و از سرم خون برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های IgG Total، IgG1، IgG2a و IGg2b با روش ELISA استفاده شد.

۱۰۰ µl پپتید، NP (Biomatik Corporation Canada: RPC20340) با غلظت ۱۰–۲ mg/ml در هر چاهک پلیت ELISA ۹۶ خانه ریخته و یک شب در دمای ٤°C نگهداری گردید.

غلظت آنتی‌ژن پوشش داده شده و رقت سرم با استفاده از روش میکروتیتر (Cheeker Bord) به‌دست آمد. سپس PBS ۱۰ mili molar در pH=۷/٤ حاوی (۰/۰۵٪ Tween 20) PBS-T برای مراحل شست‌وشو استفاده شد. به‌منظور پوشاندن فضای خالی چاهک‌ها، PBS-T حاوی ۵٪ آلبومین سرم گاوی (به‌عنوان بافر مسدودکننده) برای جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها استفاده شد.[۲۲]

سرم موش‌ها با استفاده از بافر PBS تا سطح رقت (۱:۱۰۰۰) رقیق شدند وآنتی‌بادی موشی نشاندار با آنزیم پراکسیداز، سیگما (A8924) ساخت کشور آمریکا، با رقت (۱:۵۰۰۰) به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه مورد استفاده قرار گرفت و نتایج الایزا در طول موج ٤۵۰ nm اندازه‌گیری شد.

زیرگروه‌های (Sub type)، IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b) طبق مراحل بالا و با استفاده از آنتی‌بادی زیر نوع IgG (A5532, M5657) سیگما ساخت کشور آمریکا، تهیه شده در خرگوش و آنتی‌بادی IgG خرگوشی نشان‌دار با آنزیم پراکسیداز (Horse radish peroxidase)، سیگما (A5420) ساخت کشور آمریکا اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری سایتوکین‌های اختصاصی ضد NP: ده روز پس از آخرین ایمن‌سازی، طحال سه موش از هر گروه پس از بیهوشی خارج و سلول‌های طحال در پلیت ۹٦ چاهکی کشت داده شدند. (دو پلیت به‌عنوان تست و یک پلیت با µg/ml ۱ پروتیین NP (RPC20340) و بدون تحریک به‌عنوان گروه کنترل منفی انتخاب شدند و به‌مدت ۷۲ ساعت و در دمای ۳۷°C در انکوباتور ۵٪ CO_2 قرار داده شدند، فرآیند تحریک انجام و مایع رویی کشت جمع‌آوری شد.

IFN-γو IL-4 ترشح شده با استفاده از کیتELISA براساس روش ساندویچ (DuoSet ELISA, USA, R&D) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده در دانسیته نوری (ODs) در ٤۵۰ nm اندازه‌گیری شد. سطح سایتوکاین برای هر نمونه براساس منحنی‌های استاندارد محاسبه گردید. آزمایش‌ها برای هر موش سه بار تکرار شد.

چالش موش‌های واکسینه شده با ویروس آنفلوانزا: دو هفته پس از آخرین تزریق، ١٤ موش از هر گروه به‌صورت داخل بینی (intaranasal) با یک دوز کشنده (40LD50) ویروس A/H1N1/PR8 مورد چالش قرار گرفتند. موش‌ها زیر هود لامینار کلاس دو ایمنی نگهداری می‌شدند.

میزان مرگ‌ومیر و کاهش وزن بدن روزانه به‌مدت ١٤ روز کنترل شد. نتایج به‌دست آمده به‌عنوان میزان زنده ماندن گزارش شد. با توجه به مجوزهای اخلاقی ارایه شده توسط کمیته نهاد مراقبت و استفاده از حیوانات (IACUC)، موش‌هایی که وزن بدنشان بیش از ۲۵٪ کاهش یافته بود، حذف شدند.

یافته‌ها

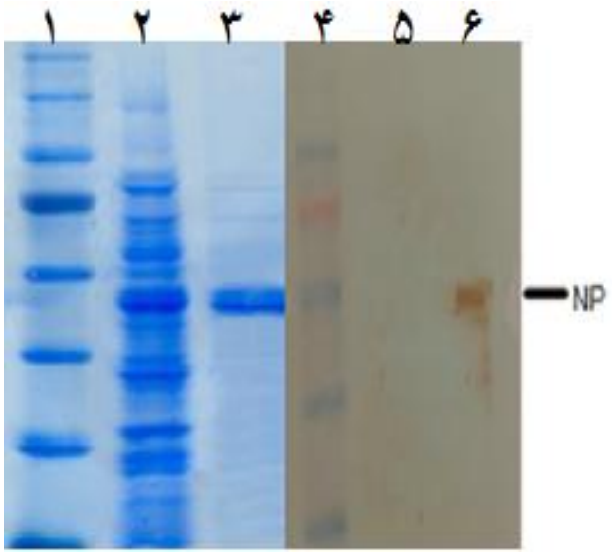
همه مقادیر به‌طور میانگین±SD بیان شدند. نتایج به‌دست آمده با استفاده از Microsoft Excel, version 2010, Microsoft, USA و

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

GraphPad Prism, version 8.0.2, USA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل میزان بقا از منحنی کاپلان–مایر (Kaplan-Meier survival curve) استفاده شد. اهمیت آماری با آزمون One Way Anova تعیین شد. مقادیر P≤۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج تولید و تخلیص پروتیین نوترکیب: کلونینگ و ساب‌کلونینگ وکتور نوترکیب بیان‌کننده مناطق حفاظت شده پروتیین NP ویروس آنفلوانزا با هضم و تعیین توالی آنزیمی تایید شد (داده‌ها نشان داده نشده است). بیان پروتیین در مقیاس بزرگ در سلول‌های BL21 انجام شد و استخراج پروتیین با ستون‌های Ni-NTA انجام شد و برای حذف اوره و ایمیدازول در مقابل PBS دیـالیز شد. نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات (Western blot) بیان پروتیین NP با وزن مولکولی ۵۷ kilodalton را تایید کرد (شکل ۱).

اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های خاص: اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های خاص در برابر پروتیین نوترکیب در مدل موش مورد بررسی قرار گرفت. حیوانات براساس طرح آزمایش تزریق شدند. دو هفته پس از هر ایمن‌سازی، نمونه‌های خون گرفته شد و پاسخ‌های آنتی‌بادی اختصاصی در برابر پروتیین نوترکیب NP با استفاده از ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۱: نتیجه SDS-PAGE تخلیص پروتیین NP با ستون کروماتوگرافی نیکل و وسترن بلاتینگ ۱و ٤ مارکر پروتیینی، ردیف ۲ لیزات رد شده از ستون، ردیف ۳ نمونه حاصل ازدیالیز پروتیین NP، ردیف ۵ کنترل منفی، ردیف ٦ پروتیین NP

پاسخ آنتی‌بادی با گروه‌های کنترل مقایسه شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت، گروهی که NP+SE دریافت کردند، تیتر IgG مناسبی را در مقایسه با گروه‌هایی که NP به‌تنهایی و NP+Alum دریافت کرده بودند، نشان دادند (P<۰۰۰۱).

ترکیب پروتیین NP با ادجوانت (NP+SE) در مقایسه با پروتیین NP به‌تنهایی افزایش پاسخ‌های ایمنی هومورال را دارد. در بررسی زیرگروه‌های IgG (IgG1، IgG2a و IgG2b) نتایج نشان می‌دهد که پروتیین NP با ادجوانت سوکروز استر می‌تواند ایجاد واکنش‌های ایمنی Th1 و Th2 را القا نماید. در حالی‌که در ترکیب با ادجوانت آلوم فقط پاسخ‌های ایمنی Th2 را ایجاد کرده است. (نمودارهای ۱ و ۲).

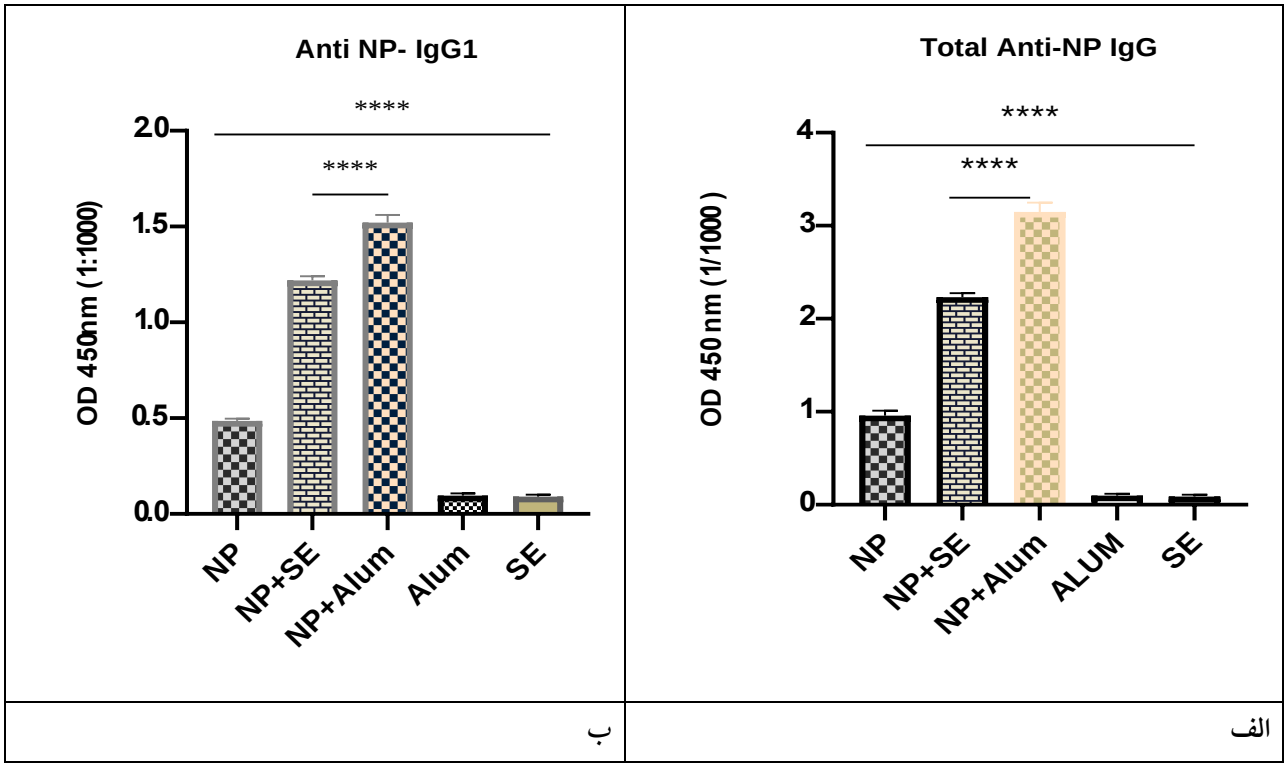
نتایج آزمایش سایتوکین‌ها: برای ارزیابی میزان القای IFN-γ و IL-4، طحال سلول‌های واکسینه شده کشت داده شد و به‌طور خاص با پروتیین NP تحریک شد. در ۷۲ ساعت پس از تحریک، مایع رویی تحت آزمایش ELISA قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر سه گروه واکسینه شده می‌توانند تولید سایتوکین‌ها را در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی تحریک کنند.

گروهی که NP+SE دریافت کردند نسبت به گروه دریافت‌کننده NP+Alum، افزایش قابل‌توجهی در القای تولید IFN-γ داشته‌اند نتایج معناداری را نشان دادند (P<۰۰۰۱)، و در سایتوکاین IL-4 در مقایسه با گروه NP+SE و NP بدون دریافت ادجوانت اختلاف نتایج معناداری نشان ندادند (P<ns). یعنی NP+SE در تحریک تولید IL4 با NP+Alum برابری دارد. نتایج در نمودار ۳ نشان داده شده است.

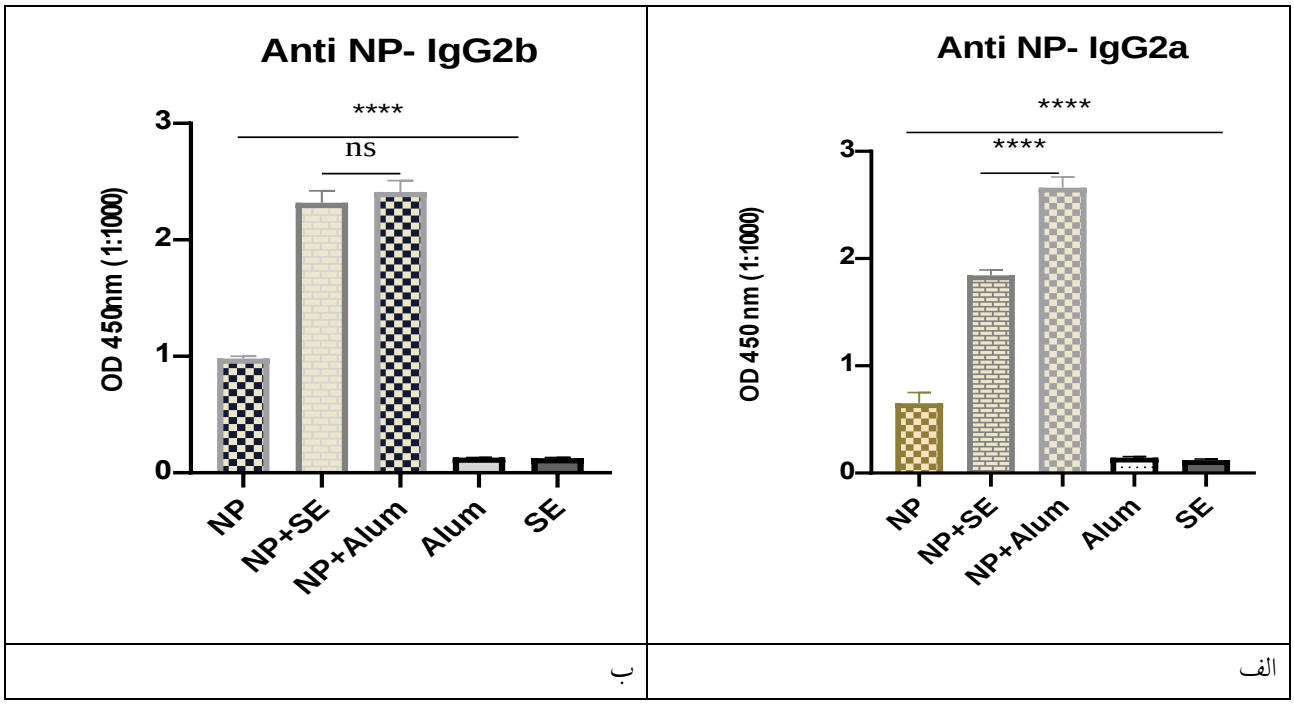
نتایج چالش ویروسی: از هر گروه آزمایشی، ١٤ موش دو هفته پس از آخرین ایمن‌سازی، با یک دوز کشنده (40LD50) ویروس آنفلوانزای A (PR8 H1N1) مورد چالش قرار گرفتند. در همین حال، موش‌های هر گروه در قفس‌های جداگانه زیر لامینار ایمنی کلاس دو در حیوان خانه قرار داده شدند. موش‌ها هر روز وزن می‌شدند و میزان مرگ‌ومیر تا ١٤ روز ثبت شد.

نتایج نشان داد که وزن بدن در همه گروه‌ها دو روز پس از چالش PR8 کاهش یافت و موش‌های دریافت‌کننده NP با ادجوانت و بدون ادجوانت تغییرات وزنی کمی را در مقایسه با PBS یا Alum دریافت شده (گروه کنترل منفی) متحمل شدند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]



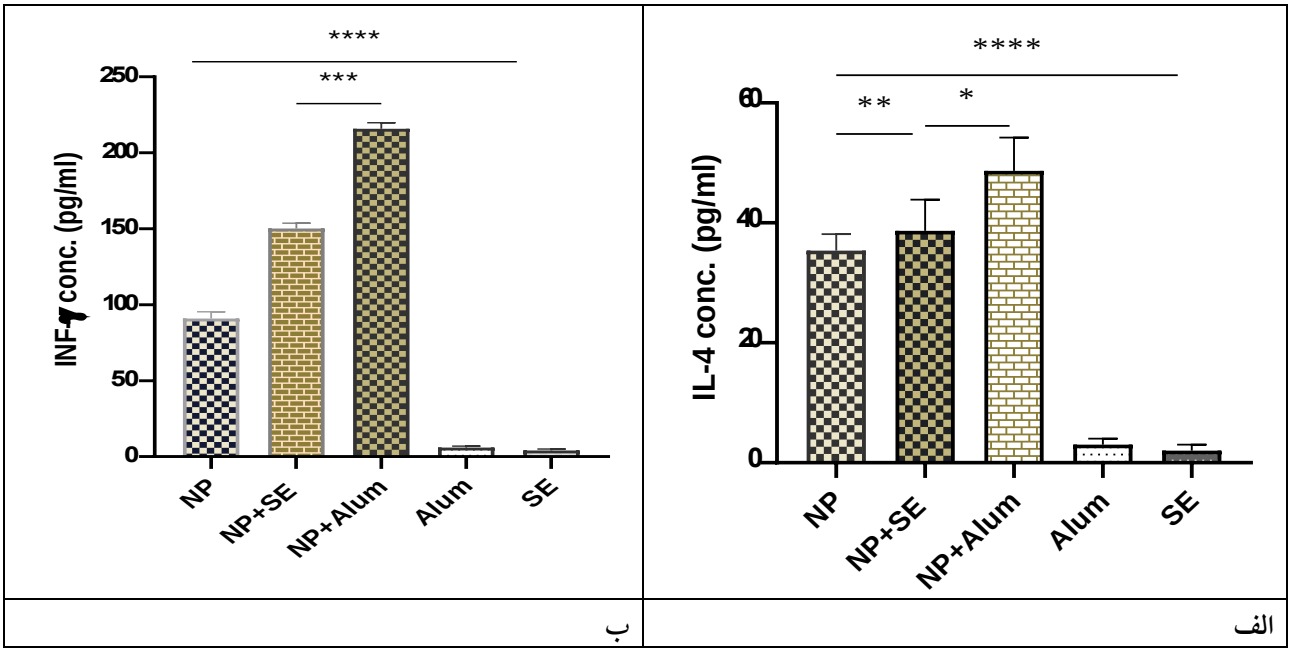
نمودار ۱: الف: میزان آنتی‌بادی IgG توتال، ب: میزان آنتی‌بادی زیرگروه (IgG1 (Sub type



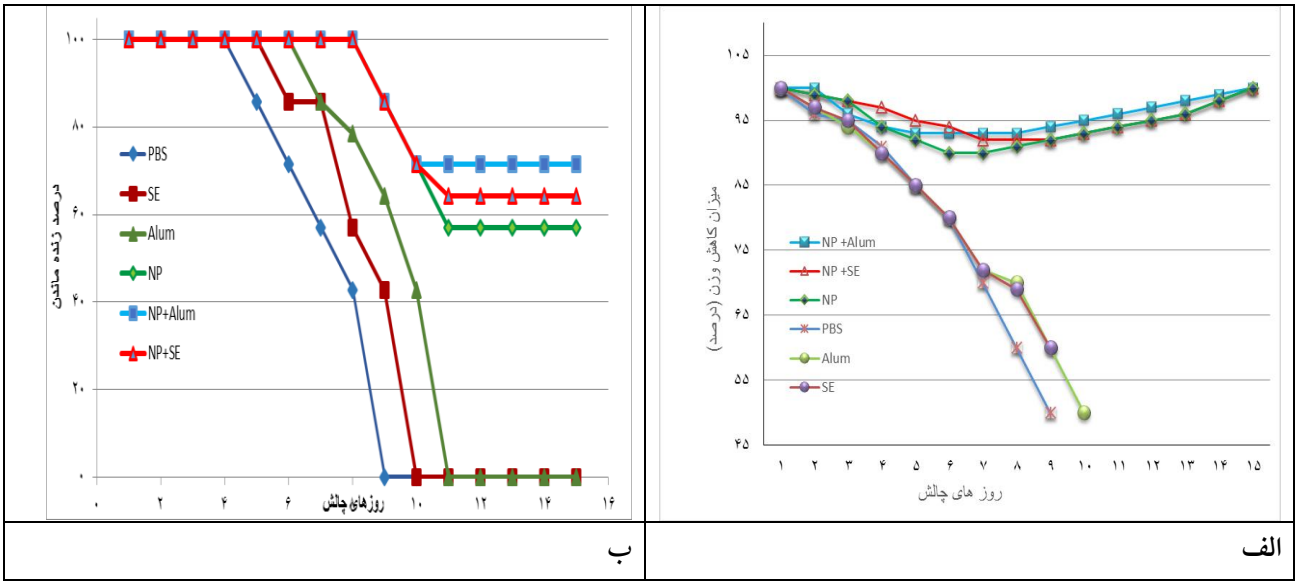
نمودار ۲: زیرگروه‌های (Sub type) ایمنوگلبولین G (IgG)، الف: Anti NP-IgG2b، ب: Anti NP-IgG2a

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

براساس نتایج، میزان بقا در هر سه گروه ایمن‌سازی شده (با و بدون ادجوانت) به‌طور معناداری در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی (P>۰/۰۰۰۱) افزایش یافت که در آن‌ها همه موش‌ها در ۱۱-٤ روز پس از چالش جان خود را از دست دادند. در گروه‌های واکسینه شده، میزان بقای گروه‌های NP+Alum (۷۱/٤٪) و NP بدون ادجوانت (۵۷/۱٪) و NP+SE (٦٤/۲۸٪) بدون اختلاف معنادار قابل مقایسه بود (P>ns). (نمودار ٤ الف وب)



نمودار ۳: اندازه‌گیری میزان سایتوکاین‌ها، الف: سایتوکاین اینترلوکین ٤ (IL-4) ب: سایتوکاین اینترفرون گاما (IFN-γ)



نمودار٤: چالش با ویروس وحشی (40LD50) الف: میزان کاهش و افزایش وزن موش‌های واکسینه شده، ب: میزان حفاظت‌بخشی پروتیین نوترکیب در برابر ویروس

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

بحث

بیماری‌های تنفسی آنفلوانزا مسئول بیش از نیمی از بیماری‌ها و مرگ‌ومیرهای حاد هستند که سالانه در سراسر جهان رخ می‌دهد. این بیماری به‌ویژه برای افراد مسن، کودکان خردسال و افرادی که دارای بیماری‌های زمینه‌ای مانند اختلالات ریه، کلیه و قلب هستند جدی است.[۲۳]

ویروس‌های آنفلوانزا به‌دلیل قابلیت جهش و فراوانی تغییرات ژنتیکی در برابر اقدامات پیشگیرانه فعلی مقاوم هستند. بنابراین، همیشه نیاز به بهبود و به‌روزرسانی فرمولاسیون واکسن‌ها با بازآرایی سویه‌های واکسن برای ایجاد ایمنی وسیع‌تر با ثبات طولانی مدت وجود دارد.[۲۴]

تولید واکسن آنفلوانزا براساس تخم‌مرغ بسیار وقت‌گیر و پر هزینه است و همچنین برای برخی افراد حساسیت ایجاد می‌کند.[۱۰] همچنین واکسن‌های حاوی ویروس‌های تضعیف شده باعث واکنش موضعی قوی می‌شوند و همچنین ممکن است در افرادی که سیستم ایمنی ضعیف دارند باعث بیماری شوند. بنابراین، تولید واکسن‌های پروتیینی نوترکیب براساس تکنیک‌های جدید بیوتکنولوژی مورد نیاز است.[۲۵]

تحقیقات زیادی روی واکسن‌های نوترکیب پروتیین آنفلوانزا انجام شده است. گلیکوپروتیین‌های سطحی HA و NA از جمله پروتیین‌های اصلی برای ایمنی‌زایی، تولید آنتی‌بادی و توسعه واکسن هستند. با این‌حال، آن‌ها دچار جهش‌های مداوم می‌شوند بنابراین، تمرکز بر پروتیین‌های ویروسی محافظت شده برای تولید واکسن‌های مناسب ضروری است.[۱۰]

پروتیین NP، که در بین ویروس‌های آنفلوانزای A، B و C و زیرگونه‌های آن‌ها حفظ می‌شود، کاندید مناسبی برای واکسن‌های یونیورسال Universal influenza vaccine (UIV) است. دلیل حفاظت از این پروتیین، نقش آن در تکثیر RNA ویروس است که با جهش در چندین توالی اسید آمینه NP مشخص شده است.[۲۶]

آنتی‌ژن NP یک هدف ایده‌آل برای ایمنی سلول T است و باعث واکنش متقابل سلول T می‌شود. سلول‌های T اختصاصی NP همچنین می‌توانند از تکثیر ویروس جلوگیری کرده و در برابر عفونت‌های ویروسی کشنده محافظت کنند.[۲۷]

یکی از نگرانی‌های مربوط به کاربرد پروتیین‌های ویروسی داخلی مانند NP، انتقال محدود آن‌ها است. همچنین، آنتی‌ژن‌ها ممکن است بسیار کوچک بوده و ایمنی‌زایی پایینی را ایجاد کنند. پیشنهاد شده است که از این آنتی‌ژن‌ها با ادجوانت استفاده شود. نشان داده شد که وقتی پروتیین NP با یک ادجوانت ترکیب شد، پاسخ ایمنی بیشتر می‌شود.[۲۲]

در مطالعات Wraith و همکاران ۷۵٪ اثربخشی در برابر ویروس PR8 با دوزهای دو برابر (فاصله دو هفته‌ای) پروتیین نوترکیب (NP ویروس H3N2 بیان شده در E.coli) بیان شد.[۲۸]

درپژوهشی Tamura و همکاران تاثیر تجویز داخل بینی مولکول NP ویروس PR8 را که توسط سلول‌های حشرات بیان می‌شود بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که این پروتیین به‌همراه سموم وبا به‌عنوان ادجوانت می‌تواند ایمنی کافی (۸۰٪–۷۰) در برابر ویروس همولوگ و (۷۰٪–۴۰) در برابر ویروس هترولوگ را در مدل حیوانی ایجاد کند.[۲۹]

Macleod و همکاران دریافتند که موش‌های واکسینه شده حفاظت کامل را در برابر ویروس همولوگ با استفاده از ادجوانت آلوم و مونوفسفوریل لیپید A (MPL) را نشان دادند.[۲۵]

همچنین در پژوهشی دیگر Wang و همکاران نشان دادند که NP که توسط E.coli بیان شده است در دوز ۹۰ µg می‌تواند به‌طور مستقل پاسخ ایمنی برابر با ۱۰ µg NP را در ترکیب با ادجوانت‌های آلوم و CPG ایجاد کند. استفاده از ادجوانت‌های مختلف برای بهینه‌سازی غلظت NP به‌منظور ایجاد سطح ایمنی بالا با کمترین میزان دوز ایمونوژن مورد آزمایش قرار گرفته‌اند.[۳۰]

استفاده از ادجوانت آلوم برای انسان دارای محدودیت‌های متعددی است. علی‌رغم مسمومیت آن برای سیستم عصبی انسان، از آن به‌طور گسترده در داروها (مانند ضد اسیدها) و واکسن‌ها (به‌عنوان ادجوانت) استفاده می‌شود.

شواهدی در ایالات متحده از ۲۰ سال گذشته وجود دارد که نشان می‌دهد واکسیناسیون مکرر از جمله آلوم در سال اول زندگی منجر به عوارض جانبی جبران‌ناپذیری بر عملکرد مغز مانند اوتیسم در نوزادان با حساسیت ژنتیکی شده است.[۳۱]

همچنین، بیماری‌های خودایمنی در افراد زیر ۵۰ سال با گرایش ژنتیکی، گزارش شده است.[۳۲] اثرات سمی آلومینیوم در کودکان

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

می‌تواند به‌صورت اختلال در کنترل حرکتی، رفتارهای تکراری، اختلالات گفتاری، اختلالات خواب، تشنج، گیجی و اضطراب و اختلال در تمرکز، یادگیری و حافظه ظاهر شود.[۳۱و۳۲]

یک مطالعه نشان داده است که واکسیناسیون با ادجوانت آلوم در مدل گوسفند می‌تواند باعث آتروفی عضلانی و انحطاط در ماده خاکستری نخاع در مرحله حاد شود. مطالعه دیگری نشان داد که ادجوانت آلوم تزریقی می‌توانند از محل تزریق به طحال و مغز موش‌ها مهاجرت کرده و تا یک سال پس از تزریق قابل تشخیص باشند.

نقص‌های مهمی در عملکرد حافظه، حرکت و ناهنجاری‌های پاتولوژیکی موش‌ها مشاهده شد که مشخصه بیماری‌های عصبی مانند آلزایمر و زوال عقل است.[۳۳]

بین میزان دریافت آلومینیوم از طریق واکسن در کودکان و میزان اوتیسم رابطه خطی و مثبتی وجود دارد. یک مطالعه نشان داده است که حساسیت ژنتیکی به‌دنبال استفاده از واکسن‌های با ادجوانت آلوم باعث آسیب سیستم عصبی مرکزی می‌شود.[۳۰و۳۲و۳۴]

بیشتر این عوارض جانبی ممکن است مربوط به تغییر چین‌خوردگی پروتیین در تماس با آلومینیوم باشد.[۳۵] علاوه بر اثرات سمی آلوم بر روی سیستم عصبی، می‌تواند سطح IgE را با افزایش پاسخ ایمنی سلولی (Th2) ،افزایش دهد و منجر به آلرژی در افراد، به‌ویژه کودکان حساس شود.[۳۶] با توجه به این عوارض جانبی، حذف نمک‌های آلومینیوم از فرمول‌های واکسن و تولید واکسن‌هایی با جایگزینی آلوم به‌ویژه برای سلامت کودکان ضروری است.

سوکروز استر اسید چرب نوعی ماده فعال سطحی غیر یونی است که با داشتن سازگاری مناسب با بدن انسان و تجزیه‌پذیری در طبیعت می‌باشد، این ماده از مواد ارزان قیمت، در دسترس و تجدیدپذیری مانند شکر و اسیدهای چرب تولید می‌شود و به‌دلیل وجود هشت جایگاه استری شدن سوکروز می‌توان دامنه وسیعی از خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی را ایجاد نماید که این تفاوت‌ها به‌طور عمده با تغییر درجه جانشینی و طول زنجیره اسیدهای چرب آن‌ها ایجاد می‌گردد.

موش‌ها، مشابه انسان، چهار کلاس مختلف IgG را با نام IgG1، IgG2a، IgG2b و IgG3 نشان می‌دهند که به‌ترتیب از نظر عملکردی با IgG1، IgG2، IgG4 و IgG3 انسان مطابقت دارند.

با این وجود، تفاوت‌هایی بین دو گونه جانوری در زیرگروه‌های IgG (Sub type) برای اتصال FcR، تثبیت کمپلمان یا تغییر در زیرکلاس‌های ناشی از سایتوکاین مشاهده می‌شود.[۳۷]

با وجود این تفاوت‌ها، ساختار کلی الگوی IgG در موش و انسان را می‌توان کاملا مشابه در نظر گرفت. به‌طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که در موش‌ها و انسان‌ها IgG1 و همچنین IgG4 در انسان با مشخصات Th2 و سایر زیرکلاس‌ها عمدتا با مشخصات Th1 مرتبط هستند.[۳۸]

در مطالعه‌ای Fornefett و همکاران تفاوت‌های احتمالی را در پاسخ ایمنی دو سویه موش BALB/c در مقایسه با موش‌های C57BL/6 بررسی و از سطوح زیرگروه‌های IgG (Sub type)، به‌عنوان شاخص‌هایی برای نوع پاسخ ایمنی استفاده کردند آن‌ها مشخص نمودند که IgG2a و IgG2b با پاسخ Th1 همراه هستند در حالی‌که IgG1 با پاسخ Th2 مرتبط است.

در این پژوهشی تمایز زیرکلاس‌های IgG در هفت موش BALB/c و هشت موش C57BL/6 انجام شد که پاسخ آنتی‌بادی متمایزی به آنتی‌ژن R.pneumotropicus نشان می‌دادند. در موش‌های BALB/c، نسبت IgG2a به IgG1 و IgG2b به IgG1 اندازه‌گیری شد. به‌دلیل عدم وجود IgG2a در موش‌های C57BL/6 تنها نسبت IgG1 به IgG2 در این سویه تعیین شد.[۳۹]

در این پژوهش، نوکلئوپروتیین نوترکیب (NP) ویروس آنفلوانزا (A/H1N1/PR8)، که قبلا توسط گروه آنفلوانزا و ویروس‌های تنفسی شایع انسیتو پاستور ایران طراحی و تایید شده بود، تهیه و در مقیاس وسیع در سیستم پروکاریوت تولید و خالص‌سازی شد. سپس ایمنی‌زایی محصول فوق در مدل موش بدون ادجوانت (به‌تنهایی) و با ادجوانت‌های سوکروز استر و آلوم بررسی شد. آنتی‌بادی‌های اختصاصی و سیتوکین‌های IFN-γ و IL-4 با روش ELISA اندازه‌گیری شدند.

موش‌ها با یک دوز کشنده ویروس (40 LD50) به چالش کشیده شدند و مشخص شد که پروتیین NP نوترکیب به‌تنهایی و با ادجوانت سوکروز استر می‌تواند ایمنی هومورال و سلولی را القا و سطح قابل قبولی از آنتی‌بادی‌های خاص را ایجاد نماید.

میزان تحریک ایمنی سلولی با اندازه‌گیری کل زیرگروه‌های (Sub type) اختصاصی IgG، و IgG1 و IgG2b و IgG2a مورد بررسی قرار گرفت و در سه گروه واکسینه شده با یکدیگر مقایسه شد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

آنتی‌بادی‌های ضد NP در موش‌هایی که NP را با ادجوانت سوکروز استر دریافت کردند بیشتر شامل زیرگروه (Sub type) IgG2a و IgG2b بود که به‌عنوان شاخص فعالیت سلول Th1 در نظر گرفته می‌شود. علاوه بر این، این گروه در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی که تا ۱۱ روز پس از چالش جان خود را از دست دادند، حفاظت بیشتری در برابر ویروس نوع وحشی (۶۰٪ میزان بقا) نشان داد. تولید این آنتی‌بادی‌ها معمولا با تولید IFN-γ همراه است.

در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که تحریک هومورال پاسخ ایمنی برای محافظت کامل کافی نیست بلکه یک حفاظت نسبی در برابر عفونت آنفلوانزای A است. برای دستیابی به واکسن یونیورسال (UIV)، تحریک پاسخ‌های هومورال و سلولی ضروری است.

در این مطالعه مقادیر پروتیین NP نوترکیب پروکاریوتی ۱۵ µg مورد بررسی قرار گرفت و القای ایمنی هومورال و سلولی با اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های زیرگروه (Sub type) IgG1 و IgG2a و IgG2bاندازه‌گیری شد. به‌طور کلی، تولیدات IgG2a و IgG1 به‌ترتیب به‌عنوان شاخص‌های فعالیت سلول‌های ایمنی Th1 و Th2 در نظر گرفته می‌شوند.[۴۰]

بنابراین، همان‌طور که انتظار می‌رفت، نسبت IgG2a به IgG1 در گروهی که پروتیین NP با سوکروز استر دریافت کرده بودند، در مقایسه با واکسن با ادجوانت آلوم بیش از یک بود (۱/۵۶). این نشان می‌دهد که در واکسن پروتیینی با ادجوانت سوکروز استر و آلوم، پاسخ ایمنی به‌سمت Th1 متمایل است و تقریبا هر دو بازوی ایمنی هومورال و سلولی را القا می‌کنند. نسبت IgG1 به IgG2a برای واکسن NP با ادجوانت بالاتر از یک بود. این نسبت بالا برای چنین واکسنی تمایل به Th2 را نشان می‌دهد.

نسبت IgG2a به IgG1 نشان می‌دهد که تولید این آنتی‌بادی‌ها معمولا با تولید INF-γ و IL-4 همراه است، علاوه بر این‌که پاسخ‌ها را نسبت به Th1 انجام می‌دهد. نتایج آزمایش ELISA برای INF-γ و IL-4 این نتیجه را تایید کرد.

Huang و همکاران در پژوهشی با ۹۰ µg NP نوترکیب بدون آلوم به ایمنی مشابهی دست یافتند. ممکن است استراتژی‌های متفاوتی برای بهبود پاسخ‌های ایمنی با استفاده از واکسن‌های کاندید پروتیین نوترکیب NP در نظر گرفته شود.

یکی از این راهکارها افزودن قطعات محافظت شده پروتیین‌های ویروس آنفلوانزا مانند HA2 و بررسی ایمنی و حافظت‌بخشی آن‌هاست. گروه تحقیقاتی Huang توضیح داد که توانایی تحریک پاسخ ایمنی توسط پروتیین نوترکیب NP بدون ادجوانت ممکن است برای توانایی تشکیل پلیمر توسط پروتیین‌های NP باشد.[۱۰]

پیشنهاد شده است که وجود اسیدهای آمینه آروماتیک به‌ویژه تیروزین در مولکول پروتیین ممکن است ایمنی‌زایی مولکول را افزایش دهد. ۱۵ آمینواسید تیروزین در توالی اسید آمینه‌های مولکول NP وجود دارد که باعث تحریک ایمنی و محافظت مولکول در سطح قابل قبولی می‌شود تا در مقایسه با ترکیب آن با ادجوانت آلوم، به‌عنوان واکسن مورد استفاده قرار گیرد.[۴۱] بنابراین، استراتژی دیگر تغییر تعداد اسیدهای آمینه تیروزین (افزایش یا کاهش) در مولکول نوترکیب NP با تحقیقات بیوانفورماتیک و با استفاده از مهندسی پروتیین، به‌منظور ارزیابی تاثیر تعداد اسیدهای آمینه تیروزین بر روی سطح ایمنی‌زایی و در نهایت حفاظت‌بخشی ایجاد شده توسط پروتیین NP بدون ادجوانت می‌باشد.

نتیجه‌گیری: تولید فرمول جدید واکسن برای گونه‌های نوظهور عفونت آنفلوانزا ۶-۳ ماه به طول می‌انجامد و در طی این مدت ویروس می‌تواند گسترش یابد و مشکلات سلامتی غیر قابل برگشت متعددی ایجاد کند. بنابراین، تحقیقات زیادی بر روی واکسن یونیورسال مبتنی بر پروتیین‌های محافظت شده متمرکز شده است. آزمایشات موفقی روی موش‌ها و دیگر حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پروتیین نوترکیب NP تولید شده در سیستم پروکاریوتی در ترکیب با ادجوانت سوکروز استر پتانسیل ایجاد ایمنی‌زایی و محافظت در موش BALB/c را دارد و می‌توان با بهینه‌سازی غلظت پروتیین و میزان ادجوانت میزان ایمنی‌زایی آن‌را ارتقا بخشید.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دوره دکتری تخصصی تحت عنوان "ساخت کوکتل واکسن واجد پروتیین‌های حفاظت شده ویروس آنفلوانزا و ارزیابی ایمنی‌زایی آن در ترکیب با همیار سوکروز استر در مدل حیوانی" دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم می‌باشد که از آذر ماه ۱۳۹۶ تا آبان ۱۳۹۸ در بخش آنفلوانزا و ویروس‌های تنفسی شایع انستیتو پاستور ایران با استفاده از امکانات مالی طرح پژوهشی مصوب این مرکز به شماره ۷۵۹ انجام گرفت.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

References

1. Cotter CR, Jin H, Chen Z. A single amino acid in the stalk region of the H1N1pdm influenza virus HA protein affects viral fusion, stability and infectivity. *PLoS Pathog* 2014;10(1):e1003831.
2. Deng L, Cho KJ, Fiers W, Saelens X. M2e-based universal influenza A vaccines. *Vaccines (Basel)* 2015;3(1):105-36.
3. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty P, et al. Influenza . *Nat Rev Dis Primers* 2018;4(1):3.
4. De Jong JC, Beyer WE, Palache AM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD. Mismatch between the 1997/1998 influenza vaccine and the major epidemic A (H3N2) virus strain as the cause of an inadequate vaccine-induced antibody response to this strain in the elderly. *J Med Virol* 2000;61(1):94-9.
5. Gerdil C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* 2003;21(16):1776-9.
6. Memoli MJ, Han A, Walters KA, Czajkowski L, Reed S, Athota R, et al. Influenza A reinfection in sequential human challenge: implications for protective immunity and“ universal” vaccine development. *Clin Infect Dis* 2020;70(5):748-53.
7. Wang TT, Palese P. Biochemistry. Catching a moving target. *Science* 2011;333(6044):834-5.
8. Portela A, Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* 2002;83(4):723-34.
9. Nachbagauer R, Krammer F. Universal influenza virus vaccines and therapeutic antibodies. *Clin Microbiol Infect* 2017;23(4):222-8.
10. Huang B, Wang W, Li R, Wang X, Jiang T, Qi X, et al. Influenza A virus nucleoprotein derived from Escherichia coli or recombinant vaccinia (Tiantan) virus elicits robust cross-protection in mice. *Virol J* 2012;9(1):1-13.
11. Del Campo J, Pizzorno A, Djebali S, Bouley J ,Haller M, Pérez-Vargas J, et al. OVX836 a recombinant nucleoprotein vaccine inducing cellular responses and protective efficacy against multiple influenza A subtypes. *NPJ Vaccines* 2019;4:4.
12. Saleh M, Nowroozi J, Farahmand B, Fotouhi F. An approach to the influenza chimeric subunit vaccine (3M2e-HA2-NP) provides efficient protection against lethal virus challenge. *Biotechnol lett* 2020;42(7):1147-59.
13. Gavillet BM, Eberhardt CS, Auderset F, Castellino F, Seubert A, Tregoning JS, et al. MF59 mediates its B cell adjuvanticity by promoting T follicular helper cells and thus germinal center responses in adult and early life. *J Immunol* 2015;194(10):4836-45.
14. Pasquale AD, Preiss S, Silva FTD, Garçon N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines* 2015;3(2):320-43.
15. Glenny AT. Insoluble precipitates in diphtheria and tetanus immunization. *Br Med J* 1930;2(3632):244-5.
16. Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine* 2019;37(24):3167-78.
17. Morris G, Puri BK, Frye RE. The putative role of environmental aluminium in the development of chronic neuropathology in adults and children. How strong is the evidence and what could be the mechanisms involved? *Metab Brain Dis* 2017;32(5):1335-55.
18. Petrovsky N, Cooper PD. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2011;10(4):523-37.
19. Rivas E, Gómez-Arnáiz M, Ricoy JR, Mateos F, Simón R, García-Peñas JJ, et al. Macrophagic myofasciitis in childhood: a controversial entity. *Pediatr Neurol* 2005;33(5):350-6.
20. Alikhani M, Behzadian F, Mehrbod P, Khosravi Node F, Shokouhi Targhi H, Farahmand B. Polyclonal Antibody against Recombinant Nucleoprotein of the Influenza A Virus (H1N1); Production and Purification. *Iran J Virol* 2017;11(2):36-42.
21. He F. Bradford protein assay. *Bio Protoc* 2011:e45-e.
22. Shokouhi H, Farahmand B, Ghaemi A, Mazaheri V, Fotouhi F. Vaccination with three tandem repeats of M2 extracellular domain fused to Leismania major HSP70 protects mice against influenza A virus challenge. *Virus Res* 2018;251:40-6.
23. Mohebbi A, Fotouhi F, Jamali A, Yaghobi R, Farahmand B, Mohebbi R. Molecular epidemiology of the hemagglutinin gene of prevalent influenza virus A/H1N1/pdm09 among patient in Iran. *Virus Res* 2019;259:38-45.
24. Lee VJ, Ho ZJM, Goh EH, Campbell H, Cohen C, Cozza V, et al. Advances in measuring influenza burden of disease. *Influenza Other Respir Viruses* 2018;12(1):3-9.
25. MacLeod MK, David A, Jin N, Noges L, Wang J, Kappler JW, et al. Influenza nucleoprotein delivered with aluminium salts protects mice from an influenza A virus that expresses an altered nucleoprotein sequence. *Plos One* 2013;8(4):e61775.
26. Li Z, Watanabe T, Hatta M, Watanabe S, Nanbo A, Ozawa M, et al. Mutational analysis of conserved amino acids in the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* 2009;83(9):4153-62.
27. Gschoesser C, Almanzar G, Hainz U, Ortin J, Schonitzer D, Schild H, et al. CD4+ and CD8+ mediated cellular immune response to recombinant influenza nucleoprotein. *Vaccine* 2002;20(31-32):3731-8.
28. Wraith DC, Vessey AE, Askonas BA. Purified influenza virus nucleoprotein protects mice from lethal infection. *J Gen Virol* 1987;68(2):433-40.
29. Tamura S, Miyata K, Matsuo K, Asanuma H, Takahashi H, Nakajima K, et al. Acceleration of influenza virus clearance by Th1 cells in the nasal site of mice immunized intranasally with adjuvant-combined recombinant nucleoprotein. *J Immunol* 1996;156(10):3892-900.
30. Wang W, Huang B, Jiang T, Wang X, Qi X, Tan W, et al. Maximal immune response and cross protection by influenza virus nucleoprotein derived from E. coli using an optimized formulation. *Virology* 2014;468:265-73.
31. Miller NZ. Aluminum in childhood vaccines is unsafe. *J Am Phys Surg* 2016;21(4):109-16.
32. Shaw CA, Li D, Tomljenovic L. Are there negative CNS impacts of aluminum adjuvants used in vaccines and immunotherapy? *Immunotherapy* 2014;6(10):1055-71.
33. Willhite CC, Karyakina NA, Yokel RA, Yenugadhati N, Wisniewski TM, Arnold IM, et al. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. *Crit Rev Toxicol* 2014;44(sup4):1-80.
34. Mold M, Umar D, King A, Exley C. Aluminium in brain tissue in autism. *J Trace Elem Med Biol* 2018;46:76-82.
35. Saleh M, Nowroozi J, Fotouhi F, Farahmand B. Physicochemical study of the influenza A virus M2 protein and aluminum salt adjuvant interaction as a vaccine candidate model. *Future Virol* 2019;14(8):523-36.
36. Terhune TD, Deth RC. How aluminum adjuvants could promote and enhance non-target IgE synthesis in a genetically-vulnerable sub-population. *J Immunotoxicol* 2013;10(2):210-22.
37. Snapper C. Immunoglobulin class switching. *Fundamental Immunol* 1999;831.
38. Banerjee K, Klasse P, Sanders RW, Pereyra F, Michael E, Lu M, et al. IgG subclass profiles in infected HIV type 1 controllers and chronic progressors and in uninfected recipients of Env vaccines. *AIDS Res Human Retroviruses* 2010;26(4):445-58.
39. Fornefett J, Krause J, Klose K, Fingas F, Hassert R, Benga L, et al. Comparative analysis of humoral immune responses and pathologies of BALB/c and C57BL/6 wildtype mice experimentally infected with a highly virulent Rodentibacter pneumotropicus (Pasteurella pneumotropica) strain. *BMC Microbiol* 2018;18(1):1-11.
40. Hauge S, Madhun A, Cox R, Brokstad K, Haaheim L. A comparison of the humoral and cellular immune responses at different immunological sites after split influenza virus vaccination of mice. *Scand J Immunol* 2007;65(1):14-21.
41. Pinilla C, Appel JR, Houghten RA. Functional importance of amino acid residues making up peptide antigenic determinants. *Mol Immunol* 1993;30(6):577-85.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]

TUMJ Tehran University Medical Journal, February 2022; Vol. 79, No. 11: 880-891 Original Article

Evaluation of immunogenicity of recombinant influenza nucleoprotein (NP) for universal vaccine

Ali Torabi M.Sc.[1,2]
Behrokh Farahmand Ph.D.[2]
Mohammadreza Zolfaghari Ph.D.[1*]
Fatemeh Fotouhi Ph.D.[2]
Mohsen Zargar Ph.D.[1]

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
2- Influenza and Respiratory Viruses Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

[*]Corresponding author: Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
Tel: +98-25-37780001
E-mail: mreza.zolfaghary@gmail.com

Abstract

Received: 08 Nov. 2021 Revised: 15 Nov. 2021 Accepted: 14 Jan. 2022 Available online: 21 Jan. 2022

Background: Influenza vaccines based on conserved proteins are being developed persistently. The conserved protein vaccines based on Nucleoprotein (NP) are highly protected vaccines against influenza viruses that can be used as a Universal vaccine. Aluminum hydroxide (Alum) is the most common adjuvant used in vaccine formulation to improve immunization by altering the epitopes' folds. However, due to its toxic effects on the nervous system, especially in infants and young children exposed to multiple vaccine injections during brain development, it is better to use more desirable options such as carbohydrate-based adjuvants. Sucrose ester (SE) is a carbohydrate and non-ionic surfactant that is compatible with the human body and environmentally friendly. This study evaluated the immunogenicity of recombinant NP molecule prepared in a prokaryotic with the accompaniment of sucrose ester adjuvant against lethal influenza virus challenge in a Balb/c mice model.

Methods: The recombinant vector of PET-28a-NP was used to produce NP molecule. The vaccines containing an NP with or without Alum or sucrose ester adjuvants were injected into the mice. The Effectiveness and immunogenicity were examined by evaluating the humeral immunity induction by Immunoglobulin G (IgG), and its subunits production, and cellular immunity induction by Interferon-Gamma (IFN-γ) and Interleukin-4 (IL-4) production by ELISA Method and also animal's surveillance was documented. The study took part at the Influenza and other respiratory viruses department of Pasteur institute of Iran in November 2018.

Results: The animals' surveillance in the Np group was 57.1%, NP+SE was (71.4%), and NP+SE was 64.28%. Also, IgG and its subunits, IL4, and IFN-γ production in both Alum and SE combined vaccines compared to NP alone were significant.

Conclusion: In combination with the carbohydrate adjuvant containing sucrose ester compared to the formulation with alum adjuvant, the NP could provide proper and considerable protection and immunity against the homologous strain (H1N1) of the Influenza A virus. It is recommended that SE usage as an adjuvant results in an adequate immune response and less toxic effect.

Keywords: adjuvant, influenza a virus, nucleoprotein (np), recombinant, sucrose ester (se), universal vaccine.

Copyright © 2022 Torabi et al.Tehran University of Medical Sciences. Published by Tehran University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2026-06-23]