



# Comparison of Immunization of Iran's Hepatitis B Vaccine, Vaccine Formulated in Montanide ISA 720 Adjuvant and Fendrix Vaccine from GSK Company on the Balb/C Mice

## ARTICLE INFO

### Article Type

Original Research

### Authors

Mirzaee M.<sup>1</sup> MSc,  
Haghighat S.<sup>1</sup> PhD,  
Mahdavi M.\* PhD

### How to cite this article

Mirzaee M, Haghighat S, Mahdavi M. Comparison of Immunization of Iran's Hepatitis B Vaccine, Vaccine Formulated in Montanide ISA 720 Adjuvant and Fendrix Vaccine from GSK Company on the Balb/C Mice. Pathobiology Research. 2018;21(1):15-21.

\*Recombinant Vaccines Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>1</sup>Microbiology Department, Science & Technology Faculty, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Correspondence

Address: Immunology Department, Pasteur Institute of Iran, 12 Farvardin Avenue, Tehran. Postal Code: 1316943551  
Phone: +98 (21) 66968857  
Fax: +98 (21) 66968857  
mahdavivac@gmail.com

### Article History

Received: November 29, 2017  
Accepted: January 14, 2018  
ePublished: April 10, 2018

## ABSTRACT

**Aims** Vaccination is the only approach to prevent hepatitis B virus infection, But some people do not get a good immune response to the commercial hepatitis B vaccine. The purpose of the present study was to compare the immunization of Iran's Hepatitis B vaccine, vaccine formulated in montanide ISA 720 adjuvant and Fendrix vaccine from GSK company on the Balb/c mice.

**Materials & Methods** In this experimental study, 54 female inbred Balb/c mice were injected in three different formulations of vaccine subcutaneously with two-week intervals. Quantitative amount of IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-2 cytokines and the IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio from spleen cell culture Supernatant and the anti-HBs Ag antibody level After each injection with Blood sampling were evaluated by ELISA method. Data were analyzed by Graphpad prism 6.1 software via one way analysis of variance.

**Findings** The vaccine recipient groups did not show significant differences in IFN- $\gamma$ , IL-2 cytokines and IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio ( $p > 0.05$ ). Iranian commercial vaccine significantly increased the cytokine IL-4 in comparison with the Fendrix and HBs-MON720 groups ( $p < 0.05$ ). Antibody responses after the first and second injection of Fendrix and HBs-MON720 showed a significant increase in comparison with the HBS-ALUM group ( $p < 0.05$ ), but no significant difference was observed after the third injection ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion** Cytokine responses in The Fendrix vaccine and HBs-MON720 vaccine are partly similar to the Iran's Hepatitis B vaccine but after two injections, Fendrix and HBs-MON720 vaccine showed a higher antibody response.

**Keywords** Alum Adjuvant; Montanide 720; Hepatitis B Vaccine; Fendrix Vaccine

## CITATION LINKS

[1] Virological response to entecavir is associated with a better clinical outcome in chronic hepatitis B ... [2] The changing epidemiology of viral hepatitis B ... [3] Current views on the persistence of immunity following hepatitis B ... [4] Enhanced specific immune responses by CpG DNA in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen ... [5] Vaccine-induced antibody responses as parameters of the influence of endogenous and ... [6] An overview of immunologic ... [7] Recent advances in vaccination of non-responders to standard dose hepatitis B ... [8] Revaccination with Fendrix® or HBVaxPro® results in better response rates than does revaccination with three doses of ... [9] New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant ... [10] Humoral and cellular responses to a single dose of fendrix in renal transplant recipients with non-response to previous hepatitis B ... [11] Evaluating novel adjuvant systems for the induction of humeral and cellular immune responses in hepatitis C virus ... [12] Montanide ISA 720 vaccines: Quality control of emulsions, stability of formulated antigens, and comparative immunogenicity of vaccine ... [13] Montanide ISA 720 and 51: A new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human ... [14] Malaria vaccine adjuvants: Latest update and challenges in preclinical and clinical ... [15] Clinical characteristics of patients infected with hepatitis B virus ... [16] Alum boosts TH2-type antibody responses to whole-inactivated virus influenza vaccine in mice but does not confer ... [17] AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive ... [18] Safety and immunogenicity of a new hepatitis B vaccine for the protection of patients with renal insufficiency including pre-haemodialysis and ... [19] Safety and enhanced immunogenicity of a hepatitis B core particle Plasmodium falciparum malaria vaccine formulated in adjuvant Montanide ISA 720 in a phase I trial ... [20] A duck enteritis virus-vectored bivalent live vaccine provides fast and complete protection against H5N1 avian influenza ... [21] Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis ... [22] Immunogenicity in rhesus of the Plasmodium vivax mosquito stage antigen Pvs25H with Alhydrogel and Montanide ISA 720

## مقایسه ایمنی‌زایی واکسن تجاری هپاتیت B ایران، واکسن فرموله‌شده در ادجوانت روغنی مونتانید ۷۲۰ و واکسن فندریکس شرکت GSK در موش‌های بالب/اسی

مینا میرزایی MSc

گروه میکروبیولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

ستاره حقیقت PhD

گروه میکروبیولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مهدی مهدوی PhD

مرکز تحقیقات واکسن‌های نوترکیب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** تنها راه پیشگیری از عفونت ویروس هپاتیت B تزریق واکسن است، اما برخی افراد نسبت به واکسن تجاری هپاتیت B، پاسخ ایمنی مناسبی نمی‌دهند. هدف پژوهش حاضر مقایسه ایمنی‌زایی واکسن تجاری هپاتیت B ایران، واکسن فرموله‌شده در ادجوانت روغنی مونتانید ۷۲۰ و واکسن فندریکس شرکت GSK در موش‌های بالب/اسی بود.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش تجربی، به ۵۴ سر موش ماده بالب/اسی ماده اینبرد، در سه دوره، فرمولاسیون‌های مختلف واکسن به‌صورت زیرپوستی و با فاصله زمانی دو هفته تزریق شد. سایتوکاین‌های IFN- $\gamma$ ، IL-4، و IL-2 و نسبت IFN- $\gamma$ /IL-4 از طریق سوپ رویی کشت سلول‌های طحال و سطح آنتی‌بادی ضد HBS Ag پس از هر تزریق با خونگیری از موش‌ها با روش الیزا بررسی شدند. داده‌ها با نرم‌افزار Graphpad prism 6.1، و توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه مورد تحلیل قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** گروه‌های دریافت‌کننده واکسن، در سایتوکاین‌های IFN- $\gamma$ ، IL-2 و نسبت IFN- $\gamma$ /IL-4 اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $p > 0.05$ ). واکسن تجاری ایران به‌طور معنی‌داری موجب افزایش سایتوکاین IL-4 نسبت به گروه‌های فندریکس و واکسن فرموله‌شده در ادجوانت روغنی مونتانید ۷۲۰ شد ( $p < 0.05$ ). پاسخ‌های آنتی‌بادی پس از تزریق اول و دوم واکسن فندریکس و واکسن فرموله‌شده در ادجوانت روغنی مونتانید ۷۲۰ نسبت به گروه واکسن تجاری هپاتیت B افزایش معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ )، اما پس از تزریق سوم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** پاسخ‌های سایتوکاینی واکسن فندریکس و واکسن فرموله‌شده در ادجوانت مونتانید ۷۲۰ در موش‌های بالب/اسی تاحدی شبیه واکسن تجاری ایرانی است، اما پس از دو تزریق، واکسن فندریکس و واکسن فرموله‌شده در ادجوانت مونتانید ۷۲۰، پاسخ آنتی‌بادی بالاتری از خود نشان می‌دهند.

**کلیدواژه‌ها:** ادجوانت آلود، مونتانید ۷۲۰، واکسن هپاتیت B، واکسن فندریکس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۴

نویسنده مسئول: mahdavic@gmail.com

بیستم به‌منظور بهبود پاسخ‌های ایمنی از ادجوانت‌ها استفاده شده است، زیرا اغلب واکسن‌ها به‌تنهایی پاسخ ایمنولوژیک ضعیفی را ایجاد می‌نموند[6].

واکسن هپاتیت B از جمله واکسن‌های موفق است که میزان شیوع عفونت را در جوامع کاهش داده است، اما استفاده از این واکسن در برخی افراد با پاسخ‌های موثر همراه نبوده است و در بیش از ۵ تا ۱۰٪ دریافت‌کنندگان واکسن، پاسخ آنتی‌بادی کافی داده نمی‌شود که دلایل متعددی برای آن ذکر شده است و از جمله آن عدم همکاری بین لئوسیت‌های B و T است[7]، لذا به نظر می‌رسد تغییر فرمولاسیون واکسن بتواند در این زمینه کمک‌کننده باشد.

یکی از واکسن‌های جدیدی که برای عفونت هپاتیت B معرفی شده است واکسن فندریکس است[8]. واکسن فندریکس‌ساز از همان آنتی‌ژن سطحی ویروس در واکسن‌های قبلی تشکیل شده است که در ادجوانت AS04 فرموله شده است[9]. در حقیقت در واکسن فندریکس از ۱-۳-۴-دزوکسیل-۴-مونوفسفوریل‌لیپید A (MPL) به‌عنوان یک جزء فعال‌کننده ایمنی ذاتی در کنار ادجوانت آلود استفاده شده است. به نظر می‌رسد که فندریکس به‌عنوان یک واکسن مناسب در بیماران مزمن کلیوی و همچنین افراد غیرپاسخگو به واکسن مفید باشد، ولی از مشکلات این واکسن قیمت بالای آن در مقایسه با واکسن تجاری است[8، 10]، از این رو ارایه فرمولاسیونی از واکسن که ارزان‌تر باشد و کارایی لازم در تحریک سیستم ایمنی داشته باشد، می‌تواند مفید باشد.

مونتانید ۷۲۰ یک ادجوانت نسبتاً جدید است که دارای روغن‌های متابولیزه‌شده طبیعی و ترکیب خالص‌شده مانیدمونولید برای استفاده در انسان است. این ادجوانت موجب کاهش سرعت رهایش و محافظت آنتی‌ژن از آنزیم‌های پروتئولیتیک و همچنین بهبود ارایه آنتی‌ژن به سلول‌های T می‌شود[11]. حالت‌های پایدار این ادجوانت قطرات آب در روغن است که به‌آرامی از آنتی‌ژن در ناحیه تزریق رها می‌شود[12، 13]. فرمولاسیون واکسن‌های مختلف در ادجوانت مونتانید ۷۲۰ منجر به شکل‌گیری پاسخ ایمنی هومورال قدرتمند، تکثیر لئوسیت‌های T و پاسخ سایتوکاینی Th1/Th2 شده است. این ادجوانت موجب فراخوانی، فعال‌سازی و القای مهاجرت سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن به گره‌های لنفاوی می‌شود. به‌علاوه، موجب برهم‌کنش با غشاهای سلولی و برداشت موثر آنتی‌ژن می‌شود[14]. بنابراین هدف پژوهش حاضر مقایسه ایمنی‌زایی واکسن تجاری هپاتیت B ایران، واکسن فرموله‌شده در ادجوانت روغنی مونتانید ۷۲۰ و واکسن فندریکس شرکت GSK در موش‌های بالب/اسی بود.

### مواد و روش‌ها

پژوهش تجربی حاضر روی ۵۴ سر موش بالب/اسی ماده اینبرد (inbred) با سن ۸-۶ هفته و وزن تقریبی ۲۰ گرم که از انستیتو پاستور کرج خریداری شده بودند، اجرا شد. موش‌ها در بخش اتاق حیوانات انستیتو پاستور کرج در دمای ۲۲-۲۰°C و دارای تهویه مناسب نگهداری شدند و تمامی آزمایشات مطابق پروتکل نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور کرج انجام گرفت. موش‌ها به ۶ گروه مجزا تقسیم شدند و هر گروه شامل ۹ سر موش بود. گروه‌های تجربی شامل واکسن روتین تجاری، واکسن فرموله‌شده در ادجوانت روغنی مونتانید ۷۲۰ و واکسن فندریکس، به‌همراه گروه‌های کنترل متناسب بودند. برای واکسیناسیون، به هر موش ۱۰۰ میکرولیتر از فرمولاسیون‌های مختلف که حاوی

### مقدمه

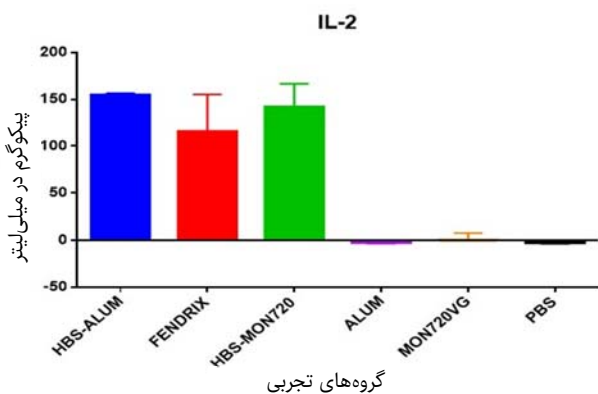
ویروس هپاتیت B متعلق به خانواده هپادناویریده و یک ویروس DNAدار است[1]. هپاتیت، یک بیماری شایع است که توسط انواع ویروس‌ها، داروها و الکل در کبد ایجاد می‌شود[1، 2]. طبق آمار سازمان بهداشت جهانی، تخمین زده شده است که سالانه ۶۰۰ هزار نفر به‌علت پیامدهای آلودگی با ویروس هپاتیت B، جان خود را از دست می‌دهند[3]. در حال حاضر واکسن مهم‌ترین راهکار پیشگیری‌کننده از بیماری‌های عفونی محسوب می‌شود. پاسخ به واکسن در افراد متفاوت است و عوامل موثر به پاسخ‌های ایمنی شامل سن، جنس، فاکتورهای ژنتیک، فرمولاسیون واکسن با ادجوانت و آنتی‌ژن مخلوط‌شده در واکسن هستند[4-6]. از اوایل قرن

**بررسی پاسخ‌های ایمنی هومورال:** برای سنجش آنتی‌بادی IgG توتال اختصاصی، در ابتدا آنتی‌ژن HBS در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات‌سالین (PBS) تهیه شد و سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌های پلیت الیزای ۹۶ خانه‌ای (گریتر؛ آلمان) اضافه و به مدت یک شب در دمای ۴°C انکوبه شد. سپس با بافر شست‌وشو (PBS حاوی ۰/۰۵% توئین ۲۰) شسته و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C با بافر بلاک‌کننده (PBS حاوی ۲% شیر خشک فاقد چربی و ۰/۰۵% توئین ۲۰) انکوبه شد. پس از شست‌وشوی مجدد، به چاهک‌های مورد نظر، ۱۰۰ میکرولیتر (بعد از تزریق اول و دوم از رقت ۱/۲۵ تا رقت ۱/۵۱۲۰۰) و بعد از تزریق سوم از رقت ۱/۱۰۰ تا رقت ۱/۸۳۸۸۶۰۸۰۰ از سرم‌های رقیق شده اضافه و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شد. چاهک‌ها ۵ بار شست‌وشو داده شدند و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی متصل به HRP، به آنها اضافه و به مدت ۹۰ دقیقه دیگر در دمای ۳۷°C انکوبه شد. چاهک‌ها ۵ بار دیگر شست‌وشو داده شدند و به آنها ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای TMB (تکسا طب پویا؛ ایران) در تاریکی اضافه و ۳۰ دقیقه انکوبه شد. واکنش با اسیدسولفوریک ۲ نرمال متوقف و شدت جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط الیزا ریدر خوانده شد.

از تمامی داده‌های دوتایی مربوط به هر آزمایش میانگین به دست آورده شد و سپس از میانگین‌های به دست آمده در آنالیز آماری استفاده شد. تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار Graphpad prism 6.1 و از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه صورت گرفت.

### یافته‌ها

در سایتوکاین IL-2، تمامی گروه‌های دریافت‌کننده واکسن نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معنی‌داری داشتند ( $p < 0/0001$ ). تزریق واکسن HBS-ALUM در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده واکسن فندریکس و HBS-MON720 و همچنین گروه دریافت‌کننده HBS-MON720 در مقایسه با فندریکس اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ( $p > 0/0978$ ; نمودار ۱).



**نمودار ۱)** نتایج واکنش‌های موش‌های بالب/اسی از طریق فرمولاسیون‌های مختلف واکسن هیپاتیت B در ۶ گروه برای بررسی سطح سایتوکاین IL-2

در سایتوکاین IL-4، گروه دریافت‌کننده واکسن HBS-ALUM در مقایسه با گروه‌های واکسن فندریکس و HBS-MON720 و همچنین گروه‌های کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0/023$ ), در حالی که گروه واکسن HBS-MON720

۵ میکروگرم واکسن بود، تزریق شد. تزریقات به صورت زیرپوستی و ۳ بار با فاصله ۲ هفته صورت گرفت (جدول ۱).

**جدول ۱)** واکنش‌های موش‌های بالب/اسی با فرمولاسیون‌های مختلف واکسن هیپاتیت B با ۹ تزریق زیرپوستی (۳ بار با فاصله ۲ هفته)

گروه	دوز واکسن	فرمولاسیون
۱	۵ میکروگرم	واکسن تجاری هیپاتیت B
۲	۵ میکروگرم	واکسن فرموله شده در ادجوانت مونتانید ۷۲۰
۳	۵ میکروگرم	واکسن فندریکس
۴	-	آلوم
۵	-	مونتانید ۷۲۰
۶	-	بافر فسفات‌سالین

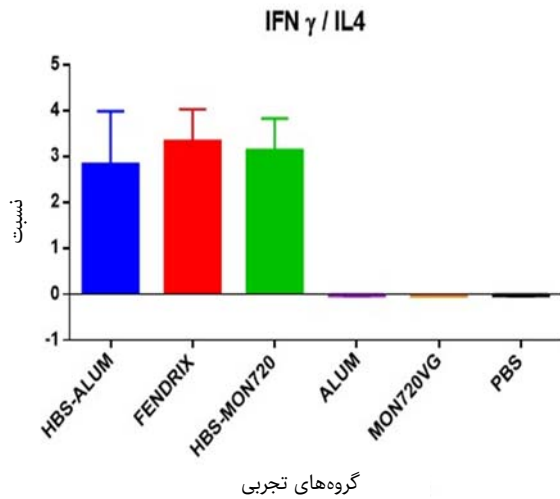
**فرمولاسیون واکسن:** مقدار ۵ میلی‌گرم از پروتئین نوترکیب HBS Ag که به طور صنعتی از کشت مخمر پیچیدار استورپس در بخش تولید آنتی‌ژن هیپاتیت B خالص‌سازی شده بود و همچنین واکسن تجاری هیپاتیت B که در ادجوانت آلوم فرموله شده بود (HBS-ALUM)، از بخش فرمولاسیون واکسن هیپاتیت B انستیتو پاستور کرج تهیه شد. به منظور فرمولاسیون در ادجوانت روغنی، پروتئین نوترکیب HBS Ag ادجوانت مونتانید ۷۲۰ (seppic؛ فرانسه) با نسبت حجمی ۷۰ به ۳۰ با پروتئین نوترکیب HBS Ag مخلوط شد (HBS-MON720). سپس به مدت ۲ دقیقه در دستگاه هموژنایزر به خوبی یکنواخت شد تا لیپوزوم‌های یک‌اندازه ایجاد شود. همچنین واکسن تجاری فندریکس‌ساز (GSK؛ ایالات متحده) خریداری شد.

**تهیه سرم:** به منظور بررسی پاسخ‌های ایمنی هومورال در گروه‌های تجربی حدود ۲ هفته پس از هر بار تزریق، خونگیری از گوشه چشم موش‌ها انجام شد. سرم با انکوباسیون در دمای ۳۷°C به مدت یک ساعت و سپس سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه تهیه و در دمای ۲۰°C تا زمان آزمایش نگهداری شد.

**کشت سلول‌های طحالی:** به منظور بررسی پاسخ‌های سایتوکاینی، در ابتدا موش‌ها نخاعی شدند و در الکل ۷۰°C غوطه‌ور شدند. در شرایط استریل و زیر هود از قسمت چپ بدن موش‌ها، طحال جداسازی و با روش مکانیکی قطعه‌قطعه شد. سپس با سوسپانسیون سلولی با استفاده از بافر لیز، گلبول‌های قرمز حذف و درصد سلول‌های زنده با استفاده از رنگ تریپان‌بلو تعیین شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (گیبکو؛ ایالات متحده) کامل با تراکم  $4 \times 10^6$  در میلی‌لیتر تنظیم و سپس در پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت و آنتی‌ژن به غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد و بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون در انکوباتور با دمای ۳۷°C و کربن‌دی‌اکسید ۵٪، مایع رویی چاهک‌ها پس از سانتریفیوژ در ۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، جمع‌آوری و برای سنجش سایتوکاین‌ها استفاده شد.

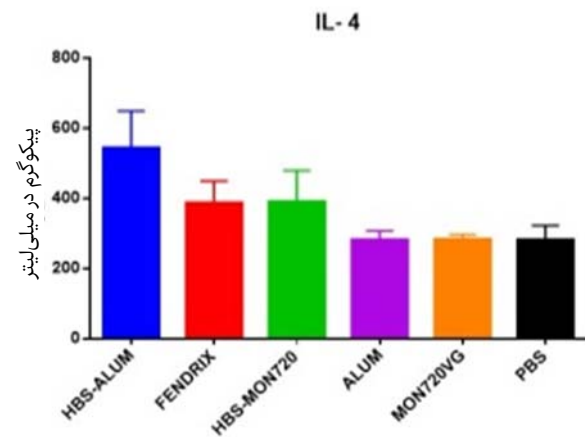
**بررسی سایتوکاین‌های اینترفرون گاما (IFN- $\gamma$ )، اینترلوکین-۴ (IL-4) و اینترلوکین-۲ (IL-2) به روش الیزا:** برای بررسی غلظت سایتوکاین‌ها از کیت الیزای کمی تجاری IFN- $\gamma$ ، IL-4 و IL-2 (شرکت Mabtech؛ سوئد) استفاده شد. به منظور انجام الیزا از پروتکل استاندارد موجود در کیت و همچنین از استانداردهای هر یک از سایتوکاین‌ها برای سنجش کمی استفاده شد. نتایج سایتوکاین‌های IFN- $\gamma$ ، IL-4 و IL-2 بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر ارائه شد و همچنین نسبت IFN- $\gamma$ /IL-4 هر موش از تقسیم‌نمودن مقادیر کمی IFN- $\gamma$  هر موش به IL-4 همان موش به دست آمد.

مقایسه با گروه واکسن فندریکس اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (p>۰/۹۹۹۹; نمودار ۲).



**نمودار ۴** نتایج واکسیناسیون موش‌های بآلب/اسی از طریق فرمولاسیون‌های مختلف واکسن هیپاتیت B در ۶ گروه برای بررسی نسبت سایتوکاین IFN- $\gamma$ /IL-4

در بررسی آنتی‌بادی توتال IgG اختصاصی بعد از تزریق اول، گروه‌های فندریکس و HBS-MON720 نسبت به گروه HBS-ALUM و گروه‌های کنترل افزایش پاسخ آنتی‌بادی را در رقت‌های ۱/۲۵ تا ۱/۲۰۰ نشان دادند، اما تنها در رقت ۱/۵۰ افزایش معنی‌داری مشاهده شد (به ترتیب  $p=۰/۰۴۸۳$  و  $p=۰/۰۰۷۲$ ; نمودار ۵).

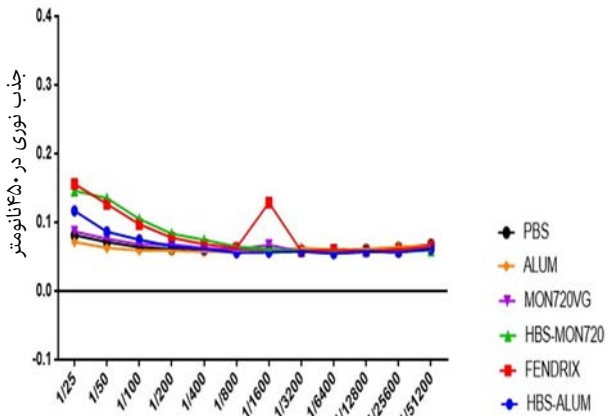


گروه‌های تجربی

**نمودار ۲** نتایج واکسیناسیون موش‌های بآلب/اسی از طریق فرمولاسیون‌های مختلف واکسن هیپاتیت B در ۶ گروه برای بررسی سطح سایتوکاین IL-4

در سایتوکاین IFN- $\gamma$ ، تمامی گروه‌های دریافت‌کننده واکسن نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معنی‌داری را نشان دادند ( $p<۰/۰۰۰۷$ ). گروه دریافت‌کننده واکسن HBS-ALUM در مقایسه با گروه‌های واکسن فندریکس و HBS-MON720 و همچنین گروه واکسن HBS-MON720 در مقایسه با فندریکس اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ( $p>۰/۱۷۴۳$ ; نمودار ۳).

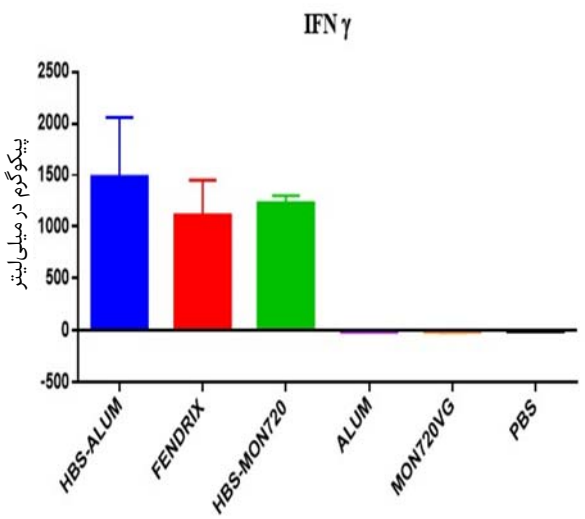
Total Ab Step 1



رقت‌های سرم

**نمودار ۵** نتایج واکسیناسیون موش‌های بآلب/اسی از طریق فرمولاسیون‌های مختلف واکسن هیپاتیت B در ۶ گروه برای بررسی سطح آنتی‌بادی توتال IgG پس از یک مرحله تزریق

در بررسی آنتی‌بادی توتال IgG اختصاصی بعد از دو مرحله تزریق، گروه‌های فندریکس و HBS-MON720 نسبت به گروه HBS-ALUM و گروه‌های کنترل، افزایش پاسخ آنتی‌بادی را در رقت‌های ۱/۲۵ تا ۱/۸۰۰ نشان دادند. تزریق واکسن فندریکس در رقت‌های ۱/۲۵ تا ۱/۸۰۰ نسبت به گروه HBS-ALUM افزایش معنی‌داری نشان داد ( $p<۰/۰۴۴۰$ ). همچنین تزریق واکسن HBS-MON720 در رقت‌های ۱/۲۵ تا ۱/۱۶۰۰ نسبت به گروه HBS-ALUM افزایش معنی‌داری نشان داد ( $p<۰/۰۱۲۳$ ; نمودار ۶).



گروه‌های تجربی

**نمودار ۳** نتایج واکسیناسیون موش‌های بآلب/اسی از طریق فرمولاسیون‌های مختلف واکسن هیپاتیت B در ۶ گروه برای بررسی سطح سایتوکاین IFN- $\gamma$

در بررسی نسبت IFN- $\gamma$ /IL-4 در گروه‌های تجربی، تمامی گروه‌های دریافت‌کننده واکسن نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معنی‌داری داشتند ( $p<۰/۰۰۰۱$ ). همچنین اختلاف معنی‌داری بین گروه دریافت‌کننده واکسن HBS-ALUM در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده واکسن فندریکس و HBS-MON720 و نیز گروه دریافت‌کننده واکسن HBS-MON720 در مقایسه با واکسن فندریکس وجود نداشت ( $p>۰/۷۸۴۸$ ; نمودار ۴).

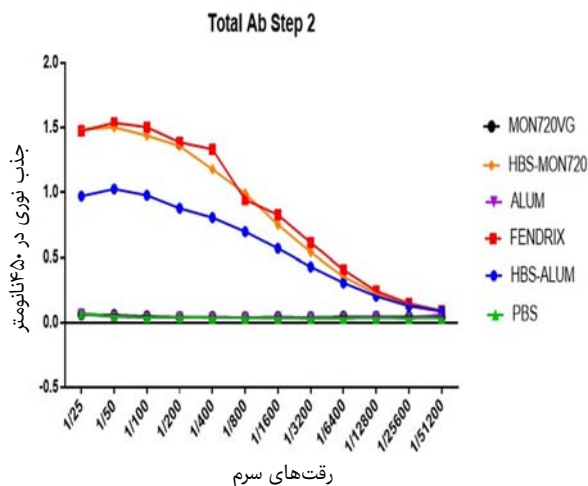


بررسی سایتوکاین‌های سیستم ایمنی نشان داد که تزریق واکسن تجاری ایران، واکسن‌های فندریکس و HBS-MON720 در القای سایتوکاین‌های IL-2 و IFN- $\gamma$  هیچ گونه اختلاف معنی‌داری نداشتند و عمدتاً پاسخ‌های مشابهی از خود نشان دادند، اما سنجش سایتوکاین IL-4 نشان داد که واکسن تجاری ایرانی فرموله‌شده با آلوم نسبت به واکسن‌های فندریکس و HBS-MON720 موجب افزایش معنی‌دار این سایتوکاین شد. افزایش معنی‌دار سایتوکاین IL-4 توسط واکسن تجاری به دور از انتظار نبود و این امر به دلیل حضور آلوم در فرمولاسیون این واکسن است و همچنین از خصوصیات واکسن تجاری، القای قدرتمند Th2 بوده است و مطالعات متعددی این یافته علمی را تایید کرده است [16].

همچنین نسبت IFN- $\gamma$ /IL-4 در گروه‌های تجربی نشان داد که واکسن فندریکس موجب افزایش حدود ۱۸ درصدی این نسبت در مقایسه با گروه واکسن تجاری ایران شد که البته این اختلاف معنی‌دار نبود. یافته‌های دی‌ایزورنت و همکاران نشان داده است که تزریق پروتئین شبه‌ویروسی L1 و ویروس پاپیلومای تیپ ۱۶ و ۱۸ انسانی فرموله‌شده در AS04 در مقایسه با پروتئین‌های شبه‌ویروسی L1 و ویروس پاپیلومای تیپ ۱۶ و ۱۸ انسانی پروتئین‌های فرموله‌شده در آلوم موجب افزایش معنی‌دار سایتوکاین‌های IL-2 و IFN- $\gamma$  و همچنین القای قدرتمند پاسخ‌های Th1 شده است [17] و با یافته‌های پژوهش حاضر که در آن پروتئین نوترکیب هیپاتیت B فرموله‌شده در AS04 با نوع فرموله‌شده در آلوم در سایتوکاین‌های IL-2 و IFN- $\gamma$  تفاوت معنی‌داری نشان نداد، در تناقض بود. دلیل این تناقض می‌تواند به نوع آنتی‌ژن، دوز واکسن و مسیر تزریق آن وابسته باشد.

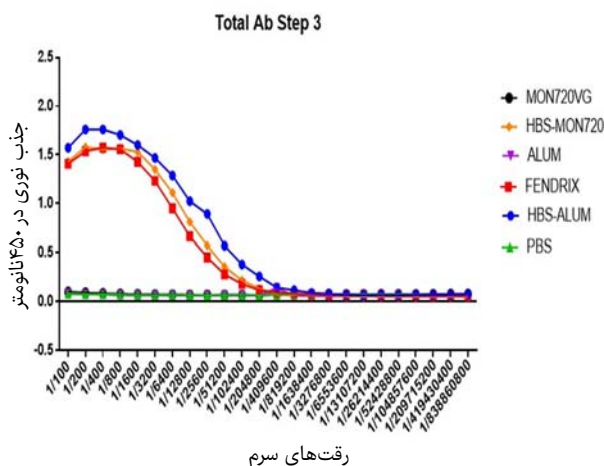
بررسی نتایج حاصل از توتال IgG اختصاصی نشان داد که بعد از دوبار تزریق واکسن فندریکس و HBS-MON720، افزایش معنی‌داری در برخی رقت‌ها نسبت به واکسن تجاری وجود داشت، اما بعد از سه تزریق بین گروه‌های دریافت‌کننده واکسن اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. این یافته حاکی از آن بود که واکسن‌های فندریکس و HBS-MON720 قادرند با دو تزریق تقریباً پاسخ ایمنی را به حد ماکزیم برسانند، زیرا نتایج بعد از تزریق دوم و تزریق سوم در این گروه‌ها اختلاف واضحی از خود نشان نداد. این ویژگی ممتاز در صنعت واکسن از نظر اقتصادی مهم است، زیرا با این ویژگی ادجوانت، به‌طور بالقوه تعداد دوز کمتری از واکسن برای ایجاد پاسخ محافظتی مصرف خواهد شد [18, 19] و از نظر مدت زمان ایجاد پاسخ محافظتی در میزبان نیز مهم است، زیرا با دوزهای کمتر در مدت‌زمان کمتری می‌توان به سطح پاسخ ایمنی محافظت‌بخش رسید که همچنین می‌تواند در اثر محافظتی برق‌آسا کارایی داشته باشد.

این ویژگی ممتاز می‌تواند برای یک واکسن موفق، مدت‌زمان پاسخ محافظتی را کاهش دهد و افراد جامعه را زودتر در مقابل اپیدمی‌های منطقه‌ای ایمن نماید [18, 20]. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که فرمولاسیون فندریکس نسبت به واکسن هیپاتیت فرموله‌شده در آلوم در القای پاسخ آنتی‌بادی برتری دارد [9, 10, 21]. از یافته‌های مهم دیگر این پژوهش این نکته بود که فرمولاسیون واکسن HBS-MON720 نیز نسبت به واکسن تجاری در القای پاسخ آنتی‌بادی پس از یک و دو تزریق برتری داشت. مطالعات متعددی با انواعی از واکسن‌های مختلف، برتری ادجوانت مونتانید ۷۲۰ را نسبت به آلوم در القای پاسخ‌های ایمنی هم‌مورال نشان داده‌اند [19, 22]. بنابراین با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر، تغییر



نمودار ۶) نتایج واکسیناسیون موش‌های ب‌اسی از طریق فرمولاسیون‌های مختلف واکسن هیپاتیت B در ۶ گروه برای بررسی سطح آنتی‌بادی IgG توتال پس از دو مرحله تزریق

در بررسی آنتی‌بادی توتال IgG اختصاصی بعد از سه مرحله تزریق، گروه‌های فندریکس، HBS-MON720 و HBS-ALUM نسبت به گروه‌های کنترل، افزایش معنی‌دار پاسخ آنتی‌بادی را در رقت‌های مختلف نشان دادند، اما بین سه گروه دریافت‌کننده واکسن اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۷).



نمودار ۷) نتایج واکسیناسیون موش‌های ب‌اسی از طریق فرمولاسیون‌های مختلف واکسن هیپاتیت B در ۶ گروه برای بررسی سطح آنتی‌بادی توتال پس از سه مرحله تزریق

## بحث

هدف پژوهش حاضر مقایسه ایمنی‌زایی واکسن تجاری هیپاتیت B ایران، واکسن فرموله‌شده در ادجوانت روغنی مونتانید ۷۲۰ و واکسن فندریکس شرکت GSK در موش‌های ب‌اسی بود. واکسیناسیون پیشگیرانه با واکسن هیپاتیت B موجب القای تیتر بالایی از آنتی‌بادی می‌شود که محافظت‌کننده است. با این حال این واکسن قادر به القای پاسخ ایمنی سلولی اختصاصی علیه HBS Ag در حیوانات آزمایشگاهی و انسان نبوده است و همچنین در درصدی از دریافت‌کنندگان واکسن، توان القای پاسخ آنتی‌بادی را ندارد [10]. به همین منظور تلاش برای یافتن ادجوانت‌های موثرتر به منظور القای موثرتر پاسخ آنتی‌بادی و تحریک پاسخ‌های Th1 ادامه دارد [15].

- 7- Walayat S, Ahmed Z, Martin D, Puli S, Cashman M, Dhillon S. Recent advances in vaccination of non-responders to standard dose hepatitis B virus vaccine. *World J Hepatol*. 2015;7(24):2503-9.
- 8- Hoebe CJ, Vermeiren AP, Dukers-Muijers NH. Revaccination with Fendrix® or HBVaxPro® results in better response rates than does revaccination with three doses of Engerix-B® in previous non-responders. *Vaccine*. 2012;30(48):6734-7.
- 9- Kundi M. New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system. *Expert Rev Vaccines*. 2007;6(2):133-40.
- 10- Lindemann M, Zaslavskaya M, Fiedler M, Wilde B, Heinemann FM, Heinold A, et al. Humoral and cellular responses to a single dose of fendrix in renal transplant recipients with non-response to previous hepatitis B vaccination. *Scand J Immunol*. 2017;85(1):51-7.
- 11- Aghasadeghi M, Sadat S, Bahramali G, Hekmat S, Motevali F, Alizadeh S, et al. Evaluating novel adjuvant systems for the induction of humeral and cellular immune responses in hepatitis C virus capsid protein immunization. *J Kashan Univ Med Sci (FEYZ)*. 2010;14(1):26-39. [Persian]
- 12- Miles AP, McClellan HA, Rausch KM, Zhu D, Whitmore MD, Singh S, et al. Montanide ISA 720 vaccines: Quality control of emulsions, stability of formulated antigens, and comparative immunogenicity of vaccine formulations. *Vaccine*. 2005;23(19):2530-9.
- 13- Aucouturier J, Dupuis L, Deville S, Ascarateil S, Ganne V. Montanide ISA 720 and 51: A new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2002;1(1):111-8.
- 14- Mata E, Salvador A, Igartua M, Hernández RM, Pedraz JL. Malaria vaccine adjuvants: Latest update and challenges in preclinical and clinical research. *BioMed Res Int*. 2013. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/282913/>.
- 15- Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki Y, Saitoh S, et al. Clinical characteristics of patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C. *J Gastroenterol*. 2002;37(1):35-9.
- 16- Bungener L, Geeraedts F, Ter Veer W, Medema J, Wilschut J, Huckriede A. Alum boosts TH2-type antibody responses to whole-inactivated virus influenza vaccine in mice but does not confer superior protection. *Vaccine*. 2008;26(19):2350-9.
- 17- Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol*. 2009;183(10):6186-97.
- 18- Beran J. Safety and immunogenicity of a new hepatitis B vaccine for the protection of patients with renal insufficiency including pre-haemodialysis and haemodialysis patients. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(2):235-47.
- 19- Oliveira GA, Wetzel K, Calvo-Calle JM, Nussenzweig R, Schmidt A, Birkett A, et al. Safety and enhanced immunogenicity of a hepatitis B core particle Plasmodium falciparum malaria vaccine formulated in adjuvant Montanide ISA 720 in a phase I trial. *Infect Immun*. 2005;73(6):3587-97.
- 20- Liu J, Chen P, Jiang Y, Wu L, Zeng X, Tian G, et al. A duck enteritis virus-vectored bivalent live vaccine provides fast and complete protection against H5N1 avian influenza virus infection in ducks. *J Virol*.

فرمولاسیون واکسن هپاتیت B می‌تواند الگوی پاسخ ایمنی را تحت تاثیر قرار دهد، اما اینکه اثربخشی را افزایش دهد نیازمند کارآزمایی بالینی در انسان است تا صرف نظر از الگوی پاسخ ایمنی خاصی که ایجاد می‌نماید، توان جلوگیری از عفونت را در میزبان ایجاد کند.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، پاسخ‌های طولانی‌مدت و لنفوسیت‌های خاطره‌ای در فرمولاسیون‌های مختلف واکسن مورد بررسی قرار گیرد.

## نتیجه‌گیری

پاسخ‌های سائیتوکاینی واکسن فندریکس و واکسن فرموله‌شده در ادجوانت مونتانید ۷۲۰ در موش‌های بآلب/اسی تا حدی شبیه واکسن تجاری هپاتیت B ایرانی است، اما پس از دو تزریق، واکسن فندریکس و واکسن فرموله‌شده در ادجوانت مونتانید ۷۲۰، پاسخ آنتی‌بادی بالاتری از خود نشان می‌دهند.

**تشکر و قدردانی:** این تحقیق حاصل پایان‌نامه به شماره ۲۰۴م برای دریافت کارشناسی ارشد میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی بود که در بخش علوم حیوانات انستیتو پاستور کرج انجام شد. بدین وسیله از تمامی همکاران بخش علوم حیوانات انستیتو پاستور کرج تشکر و قدردانی می‌شود.

**تأییدیه اخلاقی:** این پروژه براساس پروتکل کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران انجام شد.

**تعارض منافع:** هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** مینا میرزایی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ ستاره حقیقت (نویسنده دوم)، تحلیلگر آماری/پژوهشگر کمکی (۱۵٪)؛ مهدی مهدوی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۶۰٪).

**منابع مالی:** این پژوهش از حمایت مالی معاونت پژوهشی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی برخوردار بوده است.

## منابع

- Zoutendijk R, Reijnders JG, Zoulim F, Brown A, Mutimer DJ, Deterding K, et al. Virological response to entecavir is associated with a better clinical outcome in chronic hepatitis B patients with cirrhosis. *Gut*. 2013;62(5):760-5.
- Alavian SM, Fallahian F, Lankarani KB. The changing epidemiology of viral hepatitis B in Iran. *J Gastrointest Liver Dis*. 2007;16(4):403-6.
- Madaliński K, Kołakowska A, Godzik P. Current views on the persistence of immunity following hepatitis B vaccination. *Przegl Epidemiol*. 2015;69(1):47-51. [English-Polish]
- Zhang X, He P, Hu Z, Wang X, Liang Z. Enhanced specific immune responses by CpG DNA in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen and HB vaccine. *Virol J*. 2011;8:78.
- Van Loveren H, Van Amsterdam JG, Vandebriel RJ, Kimman TG, Rümke HC, Steerenberg PS, et al. Vaccine-induced antibody responses as parameters of the influence of endogenous and environmental factors. *Environ Health Perspect*. 2001;109(8):757-64.
- Aiyer-Harini P, Ashok-Kumar HG, Kumar GP, Shivakumar N. An overview of immunologic adjuvants - A review. *J Vaccines Vaccin*. 2013;4(1):1000167.

22- Saul A, Hensmann M, Sattabongkot J, Collins WE, Barnwell J, Langermans J. Immunogenicity in rhesus of the Plasmodium vivax mosquito stage antigen Pvs25H with Alhydrogel and Montanide ISA 720. Parasite Immunol. 2007;29(10):525-33.

2011;85(21):10989-98.

21- Tong NKC, Beran J, Kee SA, Miguel JL, Sanchez C, Bayas JM, et al. Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients. Kidney Int. 2005;68(5):2298-303.