



Immunogenicity of a combination of polylactic nanoparticles of co-glycolic acid and chitosan with PRP of *Haemophilus influenzae* as a nanovaccine in an animal model

Zahra Alikhani¹, Nadia KazemiPour¹, Mehdi Shafieeardestani² and Mojtaba Noofeli³

¹Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran. ²Radio Pharmacy Department, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ³Department of Human Bacterial Vaccines Production & Research, Razi Vaccine & Serum Research Institute Karaj, Agricultural Research, Education & Extension Organization, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: The use of nanoparticles is one of the newest methods of making vaccines. Nano-vaccines based on biodegradable polymers produce stronger immune system responses. The aim of this study was to design a *Haemophilus influenzae* type b nanovaccine in an animal model.

Materials & Methods: In this study, PRP of *Haemophilus influenzae* was loaded in the structure of PLGA-Chitosan nanoparticles. Confirmation of AFM, FT-IR size and charge, percentage of release and loading of antigens from the structure of nanoparticles were calculated and the toxicity and antigenicity of nanovaccines were tested by ELISA method. Four groups of female mice were selected and grouped for vaccination. Vaccination and blood sampling were performed from mice's heart and serum samples were collected and antibody responses against PRP were measured for total IgG and IgM. Pathological examination was performed to evaluate the extent of tissue damage.

Results: Increasing the particle size from 167 ± 47.3 to 209 ± 4.2 and AFM electron microscope images before and after antigen loading showed the success of antigen encapsulation in the nanoparticle structure with 78% efficiency. The results of ELISA and vital organ pathology showed an increase in the titer of total IgG and IgM antibodies in the HIB nanovaccine compared to PRP and the lack of toxicity of the nanovaccine in the vital organs of mice.

Conclusion: The results indicate that resulting nanovaccine has far more absorption and immunogenicity and can act as an effective vaccine against *Haemophilus influenzae* type b diseases.

Keywords: Chitosan, Polylactide Co-glycolide, HIB vaccine.

Received: 2 October 2020

Revised: 8 January 2021

Accepted: 17 April 2021

Correspondence to: Nadia KazemiPour

Tel: +98 34-31321332

E-mail: nadia_kazemi@yahoo.com

Journal of Microbial World 2021, 14(1): 35-46

DOI: 10.30495/jmw.2021.690438



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



ایمنی‌زایی ترکیب نانو ذرات پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید و کیتوزان با پلی ریوز ریبتول فسفات هموفیلوس آنفولانزا به عنوان نانو واکسن در مدل حیوانی

زهرا علیخانی^۱، نادیا کاظمی پور^{۱*}، مهدی شفیعی اردستانی^۲، مجتبی نوفلی^۳

^۱ گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران. ^۲ گروه داروسازی هسته‌ای، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ^۳ گروه تولید و تحقیقات واکسن‌های باکتریایی انسانی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از نانوپارتیکل‌ها یکی از جدیدترین روش‌های ساخت واکسن‌های نوین است. نانو واکسن‌ها بر پایه پلیمرهای زیست تخریب پذیر، پاسخ‌های ایمنی قوی‌تری تولید می‌کند. این پژوهش با هدف طراحی نانو واکسن هموفیلوس آنفولانزا تیپ b در مدل حیوانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پلی ریوز ریبتول فسفات (PRP) هموفیلوس آنفولانزا در ساختار نانوپارتیکل‌های پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید (PLGA) - کیتوزان بارگذاری شد. آزمون‌های تأییدی اندازه و شارژ، AFM، FT-IR، درصد رهاسازی و بارگذاری آنتی‌ژن‌ها از ساختار نانو پارتیکل‌ها محاسبه و میزان سمیت و قدرت آنتی‌ژنیسیته نانو واکسن با روش الیزا بررسی شد. چهار گروه از موش‌های ماده نژاد سوری به منظور انجام واکسیناسیون انتخاب و گروه‌بندی شدند. واکسیناسیون و خون‌گیری از قلب موش‌ها انجام و نمونه‌های سرمی گردآوری گردید و پاسخ‌های آنتی‌بادی علیه PRP برای مجموع IgG و IgM اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی میزان آسیب بافتی، آزمون پاتولوژی انجام شد.

یافته‌ها: افزایش سایز نانوپارتیکل‌ها از $167 \pm 3/47$ به $209 \pm 2/4$ و تصاویر میکروسکوپ الکترونی AFM قبل و بعد از لودینگ آنتی‌ژن‌ها موفقیت آمیز بودن کپسولاسیون آنتی‌ژن در ساختار نانو پارتیکل‌ها را با راندمان ۷۸٪ نشان داد نتایج حاصل از الیزا و پاتولوژی اندام‌های حیاتی حاکی از افزایش عیار آنتی‌بادی‌های IgG مجموع و IgM در نانو واکسن HIB در مقایسه با PRP و عدم سمیت نانو واکسن در اندام‌های حیاتی موش بود.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر این است که نانو واکسن حاصل به مراتب قدرت جذب و ایمنی‌زایی بیشتری داشته و می‌تواند به عنوان واکسنی موثر علیه بیماری‌های ایجاد شده از طریق هموفیلوس آنفولانزا تیپ b عمل نماید.

واژگان کلیدی: کیتوزان، پلی لاکتید کوگلیکولاید، واکسن HIB.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱/۲۸

ویرایش مقاله: ۱۳۹۹/۱۰/۱۹

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۷/۱۱

مقدمه

نانوذرات، علوم بیولوژی و پزشکی می‌باشد که در این حوزه بحث رهایش دارو (Drug Delivery) و واکسن به کمک فناوری نانو ذرات بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. نانو ذرات قابلیت خارق العاده‌ای در کپسوله کردن دارو، آزادسازی کنترل شده دارو، هدفمند سازی رهایش دارو به محل هدف و

امروزه با پیشرفت علوم نانو در حوزه‌های مختلف، یکی از حوزه‌های کاربردی و مورد علاقه محققین در استفاده از

* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.

پست الکترونیک: nadia_kazemi@yahoo.com

تلفن: ۰۳۴-۳۱۳۲۱۳۳۴



آزاد کننده دارو در کلون در حال تحقیق و پژوهش می‌باشد (۷و۴).

پلیمر پلی لاکتید کوگلیکولاید که به اختصار PLGA نامیده می‌شود نیز از ترکیب لاکتیک اسید و گلیکولیک اسید ساخته شده است که برای استفاده در سیستم‌های مختلف دارو رسانی در انسان، دارای تاییدیه از FDA و EMA می‌باشد. این پلیمرها به صورت تجاری با جرم مولکولی مختلف موجود هستند و زمان تخریب آن‌ها برحسب جرم مولکولی و کوپلیمریزاسیون، می‌تواند تا چندین سال به طول بیانجامد. از دیگر خواص منحصر به فرد PLGA این است که معمولاً اختلالی در چرخه‌های سلولی ایجاد نمی‌کند و زمان قرار گیری دارو بر روی سلول و مسیر اندوسیتوزی را نیز کاهش می‌دهد که همین مسئله در بررسی‌های درمانی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. دارو در مرکز PLGA قرار می‌گیرد و توسط لیگاندهای اتصال‌ی PLGA می‌تواند در مولکول‌های هدف، به نوعی اتصال و انتشار تسهیل یافته ایجاد کند این موضوع در ردیابی‌های خاص ضد توموری و در مبحث ایمونولوژی به عنوان پیشنهادی در جهت افزایش ورود آنتی ژن‌های میکروبی و در راستای اندوسیتوز آن توسط سلول‌های بیگانه خوار و افزایش تولید آنتی‌بادی‌های ضد آن و تولید واکنشی موثرتر مطرح می‌شود. این نانو ذرات علاوه بر کپسوله نمودن دارو می‌توانند به طور موفقیت آمیزی آنتی‌ژن‌ها یا مواد کمکی را در سطح خود جذب نمایند و به صورت پیوسته سیستم ایمنی را در بدن تحریک نمایند (۹و۸). تخریب این پلیمرها عمدتاً توسط هیدرولیز صورت گرفته و پس از شکستن به مونومرهای اسیدی توسط چرخه کربس به صورت دی اکسید کربن از بدن خارج می‌گردند (۱۰).

طبق مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۶ علیخانی و همکاران در تهیه نانو واکسن بر علیه عفونت‌های ناشی از سودوموناس *آئروژینوزا* انجام دادند نشان داد که کوئزوگاسیون آلژینات با PLGA در تحریک سیستم ایمنی و تحریک تولید آنتی‌بادی‌ها با موفقیت عمل می‌نماید همچنین در سال ۲۰۲۰ نیز نتایج تحقیقات آن‌ها در استفاده از PLGA و کیتوزان به عنوان حامل در تهیه نانوواکسن پنتاوالان نتایج قابل توجهی در تحریک

افزایش ماندگاری دارو در برابر تجزیه توسط آنزیم‌ها و تحریک سیستم ایمنی هومورال و ایمنی سلولی از خود نشان می‌دهند. نانوذرات در هردو رویکردهای درمانی و پیشگیری به عنوان حمل کننده جهت افزایش پردازش آنتی‌ژن و هم به عنوان اجوانت یا کمک تحریکی برای فعال نمودن یا افزایش ایمنی استفاده شده‌اند. اگرچه از طیف وسیعی از نانو ذرات به عنوان حامل واکسن استفاده می‌شود، ولی نانوذرات پلیمری زیست تخریب پذیر به دلیل امید بخشی‌هایی که در زمینه دارورسانی دارند، به شدت بر انواع دیگر حامل‌ها ترجیح داده می‌شوند. پلیمرهای زیست تخریب پذیر، پلیمرهایی هستند که می‌توانند توسط واکنش‌های هیدرولیتیک و بدون کمک آنزیم‌ها در بدن شکسته شوند. این نانوذرات ویژگی رهاسازی کنترل شده و ممتد دارند، اندازه‌ای در ابعاد سلولی داشته و با بافت و سلول زیست سازگاری دارند. علاوه بر این نانو حامل‌ها در خون پایدار و غیر سمی هستند و مضراتی مانند لخته کردن خون، تحریک سیستم ایمنی، التهاب‌زایی را ندارند. این نانو ذرات از سیستم رتیکولواندوتلیال دوری می‌کنند و برای حمل انواع مولکول‌های دارویی، پروتئینی، پپتیدی یا نوکلئیک اسیدی، مناسب هستند. از آنجایی که این نانوذرات پلیمری در بدن قابلیت جذب دارند مشکلاتی از قبیل لزوم خروج بعد از آزادسازی دارو و احتمال بروز سمیت را نداشته و به همین دلایل اخیراً کاربرد آن‌ها در صنعت پزشکی و داروسازی افزایش یافته است. از جمله این پلیمرها می‌توان به پلی‌لاکتایدها و پلی‌گلیکولیک‌ها (Polylactaide glycolide)، کیتوزان (Chitosan) و آلژینات (alginate) اشاره نمود (۱).

کیتوزان، کوپلیمر آمینه پلی ساکارییدی از او ۴ دی گلوکوزامین و N استیل گلوکوزامین می‌باشد که توسط داستیلاسیون آلکالین یا آنزیم از کیتین مشتق شده است (۲). کیتوزان از نظر سم شناسی کاملاً ایمن و زیست سازگار می‌باشد و تجویز خوراکی آن به انسان هیچگونه خطری در بر نخواهد داشت. قابلیت کیتوزان در استفاده در فرمولاسیون‌های جدید رهایش تدریجی دارو، فرمول‌های مخاط چسب، فرمولاسیون‌های آزاد کننده سریع دارو، فرآورده‌های رهایش پروتئین و پپتید، سیستم‌های

ب) آماده سازی نانوذرات: در مرحله اول، محلول ۱۰٪ (w/v) PLGA و محلول ۱٪ (w/v) کیتوزان در حلال تری فلورواستیک اسید تهیه شد و برای ۲۴ ساعت در ظرف واکنش استریل بر روی استرایر در دمای اتاق سنتز شد. سپس برای خالص سازی ترکیب نانوذرات محلول حاصل را در ۳۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل نانو ترکیب PLGA-Chitosan است.

ج) بارگذاری آنتی ژن (PRP) PLGA-Chitosan: برای تهیه واکسن ۱۰ میلی گرم / میلی لیتر از نانو ترکیب تهیه شده PLGA-Chitosan و ۱۲۵ میلی گرم کپسول پلی ساکارییدی Hib در ۱ میلی لیتر کلروفورم حل شده و با ۴ میلی لیتر محلول ۲٪ پلی وینیل الکل (PVA) مخلوط شده و روی دستگاه اولتراسونیکیشن به مدت ۱ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس برای تبخیر کلروفورم ظرف واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. در این مرحله نانوواکسن حاصل با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه خالص سازی شد (۱۲).

د) اندازه‌گیری اندازه و بار PLGA-Chitosan و Nanovaccine HIB: برای اطمینان بیشتر از صحت تشکیل نانو واکسن و حفظ اندازه نانو، نمونه‌ها به منظور اندازه‌گیری سایز و شارژ طبق پروتکل دستگاه Zetasizer دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

ه) تایید تشکیل سامانه PLGA-Chitosan با طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR): به منظور شناسایی ترکیبات آلی و گروه‌های عاملی و پیوندهای کووالانسی موجود در نانوذرات PLGA و کیتوزان و سامانه PLGA-Chitosan مقدار ۱ الی ۲ میلی گرم از نمونه با پودر KBr ساییده و به شکل قرص شفاف آماده و در محفظه مخصوص دستگاه FT-IR قرار داده شد و سپس توسط دستگاه جذب در ناحیه IR اندازه‌گیری و گراف حاصل بر روی صفحه مانیتور رایانه نمایان گردید.

و) تصاویر AFM: میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) یکی از قدرتمندترین ابزارهای تهیه تصویر توپوگرافی سطح

سیستم ایمنی نشان داد و در هر دو پژوهش یادشده عدم سمیت استفاده از نانو ذرات زیست تخریب پذیر در تهیه واکسن‌ها نیز تایید شد (۱۱ و ۱۲).

این پژوهش تلاشی به منظور تهیه و طراحی نانو واکسن، با استفاده از پلیمر زیست تخریب پذیر PLGA-Chitosan، به عنوان کاندیدای تهیه نانو واکسن، برای تحریک بهتر و بیشتر سیستم ایمنی هومورال و سلولی و افزایش اثر بخشی در پیشگیری از بیماری هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b می‌باشد.

هموفیلوس آنفلوانزا یا باسیل فیفر، از خانواده پاستورلاسه و باکتری هوازی و بی هوازی اختیاری است که می‌تواند بیماری‌های گوناگونی را در انسان ایجاد کند. این باکتری به دو شکل کپسول دار و بی کپسول می‌باشد که سویه‌های دارای کپسول یا به اصطلاح Hib، از مهم‌ترین سویه‌های ایجادکننده بیماری در این باکتری هستند که موجب مقاومت نسبت به فاگوسیتوز و سیستم کمپلمان می‌شود. واکسن هموفیلوس آنفلوانزا می‌تواند از بیماری‌های خطرناک و کشنده‌ای که به وسیله هموفیلوس آنفلوانزا تیپ b حاصل می‌شود مانند ذات الریه، مننژیت، باکتری، آرتریت سپتیک پیشگیری نماید (۱۳ و ۲۰).

هدف از این پژوهش، بررسی اثر ترکیب نانوذرات PLGA و کیتوزان بر ایمنی زایی نانوواکسن Hib در مدل حیوانی می‌باشد. هدف کاربردی این تحقیق بررسی کاهش دفعات تزریق می‌باشد که در صورت موفقیت آمیز بودن نتایج این تحقیق می‌توان از نانوذرات زیست تخریب پذیر به عنوان حامل‌های آنتی‌ژنی در تولید واکسن‌های چندگانه و یا حتی در کنار آنتی‌ژن‌های پلی ساکارییدی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

الف) تهیه واکسن، آنتی‌ژن‌ها و نانوذرات: پلی لاکتیدکو گلیکولیک اسید (PLGA)(75:25) و کیتوزان با وزن مولکولی بالا (۳۰۰۰۰۰-۱۰۰۰۰۰۰) از شرکت سیگما آلدریج، PRP خالص از انستیتو پاستور تهران تهیه شد.

Chitosan-PLGA خالص و گروه چهارم هم به عنوان گروه شاهد با نرمال سالین واکسینه شدند. واکسیناسیون سه دوره به صورت داخل صفاقی هر کدام با دوزی معادل ۱۰ میکروگرم در سه دوز (هر دوز ۰/۳ میلی‌لیتر) با فواصل دو هفته‌ای انجام گرفت. خون‌گیری دو هفته بعد از هر تزریق از ۵ عدد از موش‌های هر گروه صورت می‌گرفت و هر بار سرم خون‌ها به وسیله سانتریفوژ (با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه) جدا شده و در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس تا هنگام انجام آزمون الایزا نگهداری شد (۱۱ و ۱۲).

ی) آزمون الایزا: برای به دست آوردن رقت‌های مناسب سرمی و برای تعیین عیار آنتی‌بادی‌ها آزمون الایزای غیر مستقیم با سه بارتکرار، برای آنتی‌بادی‌های IgA, IgM, IgG3, IgG2b, IgG2a و مجموع IgG انجام شد.

ک) روش الایزای غیرمستقیم (Indirect ELISA): برای این منظور در ابتدا آنتی ژن PRP خالص را در بافر کربنات ۰/۰۵ مولار با pH ۹/۶ با غلظت نهایی ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک افزوده و پلیت به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد و پلیت‌ها سه بار (هر بار ۵۰ میکرولیتر) شستشو داده شد. سپس محلول بلوکه کننده به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها افزوده و برای ۶۰ دقیقه پلیت در دمای اتاق گرماگذاری و پلیت‌ها سه بار (هر بار ۱۰۰ میکرولیتر) شستشو شد. در ادامه به چاهک‌های ردیف اول، ۲۰۰ میکرولیتر سرم رقیق شده در بافر PBS با رقت ۱:۱۰ اضافه گردید و به سایر چاهک‌ها ۱۶۰ میکرولیتر بافر PBS افزوده شد. سپس از چاهک‌های ردیف اول ۴۰ میکرولیتر به چاهک‌های ردیف دوم افزوده و به همین ترتیب تا آخر ادامه داده شد و در نهایت ۴۰ میکرولیتر دور ریخته شد. به این صورت رقت سازی به نسبت ۱:۵ انجام گردید. پس از انجام رقت‌سازی از همه چاهک‌ها ۶۰ میکرولیتر برداشته شد تا حجم سرم رقیق شده در هر چاهک به ۱۰۰ میکرولیتر برسد سپس پلیت برای ۲ ساعت در دمای اتاق گرماگذاری و پلیت‌ها سه بار (هر بار ۱۰۰ میکرولیتر) شستشو داده شد. سپس آنتی

بیومولکول‌ها در مقیاس کمتر از میکرومتر است که به منظور بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک نانو ذرات و اندازه آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

ز) سنجش میزان بارگذاری (لودینگ): مقدار آنتی‌ژن محبوس شده در نانو پارسیکل‌ها از روی مقدار کل آنتی‌ژن اضافه شده به محیط و مقدار نهایی باقی‌مانده در فاز آبی (کپسوله نشده) محاسبه گردید. بدین منظور تمام محلول توسط سانتریفوژ ۱۴۰۰۰ g دور به مدت ۲۰ تا ۴۰ دقیقه جداسازی شد و نانوذرات در کف جمع شده و محلول روماندا جدا شده و تعیین درصد کپسولاسیون با فرمول زیر محاسبه شد.

$$EE\% = \times 100 \frac{\text{total antigen} - \text{free antigen}}{\text{total antigen}}$$

ح) رهاسازی نانو واکسن: به منظور بررسی رهاسازی آنتی‌ژن‌ها از ساختار نانو پارسیکل‌های PLGA، مقدار ۶۰ میلی‌گرم از نمونه نانو واکسن لیوفیلیزه شده، به دقت توزین و به میکروتیوب منتقل شد سپس به هر کدام از لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات (pH 7.4) PBS اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دور ۱۰۰ سیکل در دقیقه به مدت پنجاه روز گرماگذاری شدند. سپس در فواصل مشخص شده (روی نمودار) نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول روماندا جمع‌آوری شده و با محلول بافری تازه جایگزین گردید و مقدار آنتی‌ژن آزاد شده با روش سنجش بیال محاسبه گردید (۱۲).

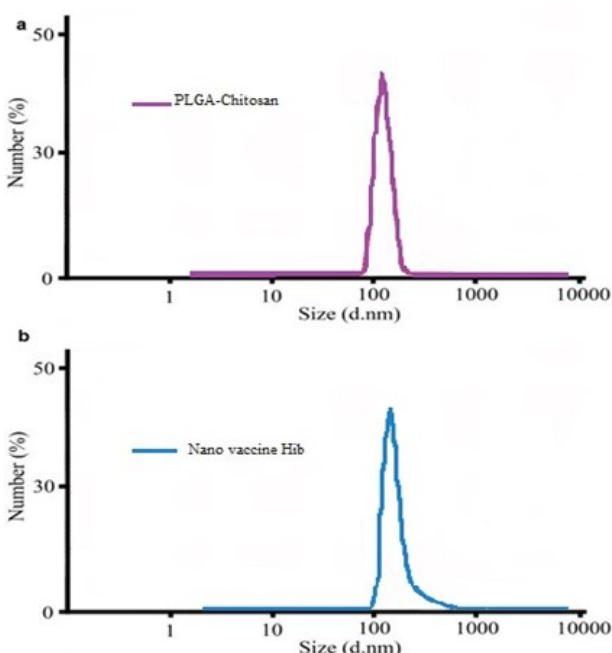
ط) واکسیناسیون: به منظور بررسی پاسخ‌های ایمنی نمونه‌های نانو پارسیکلی تهیه شده از ۶۰ سر موش نژاد سوری ماده با وزن 25 ± 5 و سن ۶-۸ هفته به عنوان مدل حیوانی مناسب استفاده شد. موش‌ها از موسسه تحقیقاتی رازی کرج خریداری گردید. موش‌ها در تمام مدت آزمون از شرایط ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب برخوردار بودند و در دمای ثابت ۲۱-۲۳ درجه سلسیوس نگهداری شدند. این موش‌ها به چهار گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند که به ترتیب گروه اول تا سوم به ترتیب با واکسن تهیه شده از آنتی‌ژن PRP، نانو واکسن HIB، سامانه

گروه کنترل از نرم افزار SPSS.16 و آزمون آماری tukey با $p < 0/01$ استفاده شد.

یافته‌ها

اندازه‌گیری سایز و شارژ مولکول‌ها: به منظور اطمینان از صحت تشکیل مولکول‌ها در سایز نانو از دستگاه Zetasizer برای اندازه‌گیری سایز و شارژ مولکول‌ها استفاده شد. نمودارهای ۱ و ۲ نتایج مربوط به این اندازه‌گیری‌ها را نشان می‌دهند. طبق نمودار ۱ سایز سامانه Chitosan-PLGA برابر با 167.03 ± 3.47 نانومتر (شکل a) و سایز نانو واکسن برابر با 209 ± 2.4 نانومتر (شکل b) به دست آمد.

نتایج نمودار ۱ حاکی از آن است که نانو واکسن حاصل با وجود افزایش سایز نسبت به سامانه نانویی Chitosan-PLGA باز هم در حد نانومتر است که موفقیت آمیز بودن بارگذاری آنتی‌ژن و حفظ اندازه نانو را نشان می‌دهد.



نمودار ۱: اندازه سامانه Chitosan-PLGA و نانو واکسن پتائوالان. شکل‌های a و b به ترتیب مربوط به سایز سامانه Chitosan-PLGA و نانو واکسن پتائوالان می‌باشد که به ترتیب 167.03 ± 3.47 و 209 ± 2.4 نانومتر می‌باشد.

آنتی‌بادی‌های نشان دار کونژوگه با آنزیم هورس ردیش پراکسیداز با رقت ۱:۱۰۰۰ در بافر PBS به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شده و پلیت برای ۱ ساعت در دمای اتاق گرماگذاری و و پلیت‌ها سه بار (هر بار ۱۰۰ میکرولیتر) شستشو داده شد.

در ادامه محلول سوپسترا به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر به هر چاهک اضافه و پلیت برای ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. سپس به هر چاهک ۵۰ میکرو لیتر محلول متوقف کننده اضافه گردید. در نهایت، میزان جذب نوری پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه خوانش الیزا قرائت شد.

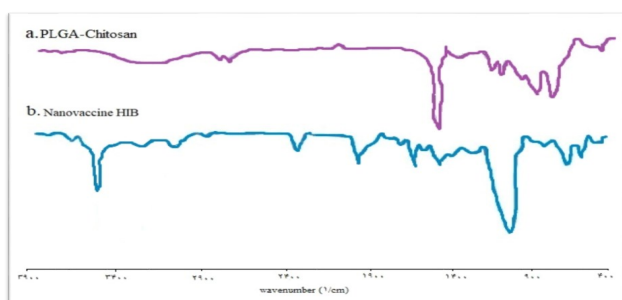
مطالعه تغییرات ساختاری بافت‌های اندام‌های حیاتی (ریه، کبد و کلیه) موش با روش هماتوکسیلین-ائوزین به منظور شناسایی اختلالات عملی و تغییرات ساختاری احتمالی بافت‌ها در اثر تزریق نانو واکسن و سامانه PLGA-Chitosan در اندام‌های حیاتی بدن موش، یک گروه ۲۴ تایی در ۸ گروه ۳ تایی از موش‌ها تقسیم بندی شدند.

یک گروه به عنوان شاهد واکسنی دریافت نکرد و دو گروه دیگر با دوزی معادل ۱۰ میکروگرم در یک دوز (۰/۳ میلی‌لیتر) از واکسن‌های سنتز شده را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. پس از گذشت ۷ روز از انجام تزریق‌ها همه موش‌ها با تزریق ۲ میلی‌لیتر کلرام هیدرات بیهوش و بلافاصله تشریح گردیدند و اندام‌های حیاتی آن‌ها درون ماده تثبیت کننده فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و پس از طی مراحل آماده‌سازی نمونه و رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین به وسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

ل) آزمون‌های آماری: با انجام آزمون الیزا به صورت سه بار تکرار، تیتراژ سرمی مربوط به هر کدام از آنتی‌بادی‌ها با استفاده از نرم افزار اکسل به صورت میانگین \pm انحراف از معیار ارائه شد.

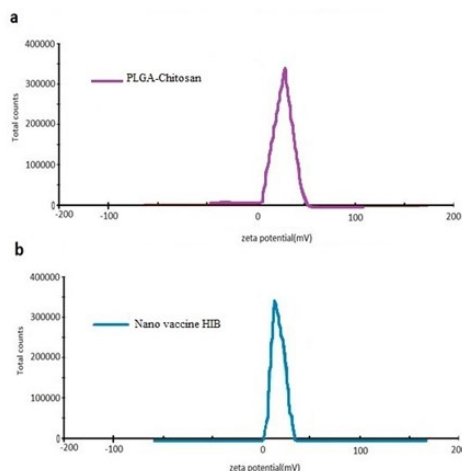
بر این اساس برای بررسی اختلاف عیارهای سرمی گروه‌های دریافت کننده آنتی‌ژن‌های مختلف در مقایسه با

ارتعاشات کششی N-H و O-H در کیتوزان شناسایی شد (شکل a). همچنین قله‌ها در ۱۶۳۴ و ۱۵۶۳ سانتی‌متر به ارتعاشات آمین اولیه و آمین‌های ثانویه در کیتوزان مربوط می‌شود. پیک در ۱۷۴۳ و ۱۰۸۰ سانتی‌متر بر روی ارتعاشات کششی گروه‌های C=O و C-O-C در PLGA مربوط می‌شود. این پیک‌های مشخص شده نیز در طیف FT-IR برای PLGA-کیتوزان و نانو واکسن HIB نیز مشاهده شد (شکل b). با توجه به نتایج حاصل حضور گروه‌های عاملی نانو ذرات PLGA و کیتوزان در ساختار سامانه نانو ذرات PLGA- Chitosan و نانو واکسن HIB نیز موفقیت آمیز بودن سنتز سامانه نانویی را نشان می‌دهد.



نمودار ۳: نمودارهای طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR). شکل‌های a و b به ترتیب نمودارهای نانوپاتیکل‌های PLGA-Chitosan و نانو واکسن Hib می‌باشد.

تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM): میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) یکی از قدرتمندترین ابزارهای تهیه تصویر توپوگرافی سطح بیومولکول‌ها در مقیاس کمتر از میکرومتر است AFM نه تنها در شرایط فیزیولوژیکی بلکه در حین فرآیندهای بیولوژیکی نیز قادر به تصویرسازی است. به دلیل نرمی و آسیب پذیری نمونه‌های زیستی، نمونه‌گیری نقش تعیین کننده‌ای دارد. نمونه‌های AFM نیازی به آغستن نمونه به مواد فلورسنت یا مواد دیگر ندارد. تکنیک AFM در مقایسه با SEM نیازی به تثبیت فیزیکی یا شیمیایی نمونه و اعمال پوشش‌های بر روی سطح آن ندارد. مزیت این روش توانایی تصویرگیری از سطح غیرهادی در محیط معمولی و زیر سطح مایع است.



نمودار ۲: شارژ سامانه Chitosan-PLGA و نانو واکسن پتاوالان. شکل‌های a و b به ترتیب مربوط به شارژ سامانه Chitosan-PLGA و نانو واکسن HIB می‌باشد. شیب نمودار به سمت مثبت نیز موفقیت آمیز بودن واکنش را نشان می‌دهد. شکل‌های a و b به ترتیب مربوط به سایز سامانه-Chitosan PLGA و نانو واکسن پتاوالان می‌باشد که به ترتیب شارژ از 20.29±2.6 (شکل a) به از 28.13±1.3 mV (شکل b) در نانو واکسن نیز موفقیت آمیز بودن واکنش را نشان می‌دهد.

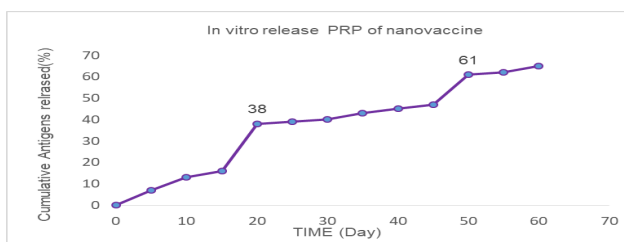
جدول ۱: میانگین تغییرات سایز و بار سامانه نانو ذرات PLGA-Chitosan

غلظت کیتوزان به PLGA (mg/ml)	پتانسیل زتا (mv)	میانگین اندازه ذرات ایجاد شده (nm)	اختلاف پراکندگی (PDI)
1.10	+20.29±2.6	167.03±3.47	0.229±0.053

جدول ۲: میزان احتباس آنتی‌ژن در سامانه نانو ذرات PLGA-Chitosan

غلظت کیتوزان به PLGA (mg/ml)	درصد کارایی احتباس	پتانسیل زتا (mv)	میانگین اندازه ذرات ایجاد شده (nm)	اختلاف پراکندگی (PDI)
1.10	78	28.29±1.3	209.05±2.4	0.0215±0.02

تایید انجام کانجوگیشن با طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR): طیف سنجی مادون قرمز فوری (FT-IR) برای درک گروه عملکردی هر مولکول آلی در مواد آماده شده مورد استفاده قرار گرفت. طیف FT-IR نانو ذرات PLGA-کیتوزان (a) در شکل ۱ نشان داده شده است. پیک ۳۳۵۶ cm⁻¹ به عنوان

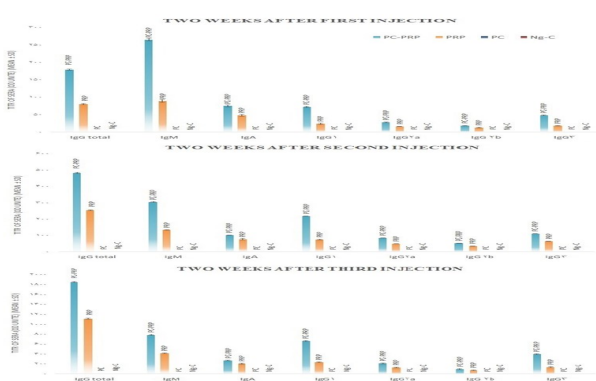


نمودار ۴: میزان رهاسازی PRP از ساختار نانوپارتیکل‌های PLGA-Chitosan

تزریق افزایش چشم‌گیری در عیار آنتی‌بادی IgG علیه نانو واکسن نشان نمی‌دهد اما دو هفته پس از تزریق‌های دوم و سوم ترتیب عیارهای آنتی‌بادی تولید شده در گروه‌های مختلف به این ترتیب بود:

Nanovaccine HIB > Vaccine HIB > Chitosan-PLGA

عیار IgG در گروه‌های واکسینه با Nanovaccine HIB در تزریق سوم نسبت به اول از ۱۷۹ به ۱۸۵۲ افزایش نشان داده است. با توجه به نتایج به دست آمده از طریق آزمون Tukey با $p < 0.01$ اختلاف عیار تمامی آنتی‌ژن‌های تزریق شده Nanovaccine HIB دو هفته پس از تزریق‌های اول، دوم و سوم در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود (نمودار ۵).

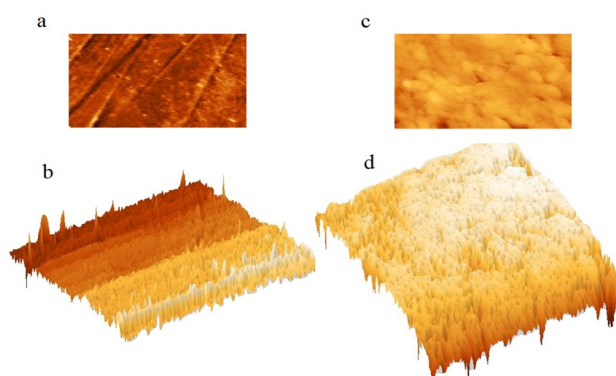


نمودار ۵: تغییرات عیار آنتی‌بادی‌ها دو هفته پس از تزریق‌های اول، دوم و سوم. علامت * نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0.01$) در مقایسه با گروه کنترل است.

دو هفته پس از سومین دوز تزریقی افزایش چشم‌گیری در عیار آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن PRP در موش‌های واکسینه با Chitosan- Nanovaccine HIB در مقایسه با commercial pentavalent vaccine مشاهده شد.

امروزه AFM برای تصویر گرفتن و بررسی ساختارهای پروتئین، DNA، سلول‌های سرطانی، باکتری‌ها، میکروب‌ها، ویروس‌ها، پروتئین‌ها، بر هم کنش‌های آنزیمی، غشاها، کروموزوم‌ها و ساختار مواد زیستی در شرایط فیزیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در تصاویر حاصل، نتایج با کیفیت دو بعدی و سه بعدی از مورفولوژی سطح، سایز نانوذره، زبری - صافی مشاهده می‌گردد. که در آزمایشگاه جامع تحقیقاتی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران با استفاده از دستگاه JPK ساخت کشور آلمان تصاویر AFM تهیه شده است.



شکل ۱: تصاویر AFM نانو سامانه سنتز شده (a, c) و نانو واکسن HIB (b, d) مقایسه تصاویر دو بعدی و سه بعدی و سه بعدی PLGA-Citosan قبل و پس از ترکیب آن با PRP هموفیلوس آنفولانزا بارگذاری و جذب موفقیت آمیز PRP را در سامانه نانوذرات PLGA-Citosan نشان می‌دهد.

تایید میزان کپسولاسیون و رهاسازی: پس از تایید بارگذاری موفقیت آمیز آنتی ژن PRP در سامانه نانوذرات PLGA-Chitosan راندمان لودینگ ۷۸٪ محاسبه شد.

همچنین میزان رهاسازی واکسن از نانوذرات به مدت ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). همان طور که مشاهده می‌شود، سرعت این انتشار تا ۲۰ روز (۳۸٪) قابل توجه است، و سپس میزان آن به آرامی کاهش می‌یابد به طوری که پس از ۴۸ روز این مقدار به ۶۱٪ می‌رسد و نشان دهنده این است که ساختار سنتز شده توانایی خوبی برای انتشار واکسن دارد.

بررسی میزان تحریک تولید آنتی‌بادی‌ها در مدل حیوانی: بررسی عیارهای به دست آمده دو هفته پس از اولین دوز

موجود، تهیه و در ساختار نانوپارتیکل‌های PLGA-Chitosan کپسوله شد. بدین منظور پس از مراحل آماده سازی نانوپارتیکل‌ها، آنتی‌ژن PRP در روش تک مرحله‌ای در ساختار نانو پارتیکل‌ها کپسوله شدند. پس از محاسبه درصد بارگذاری مشخص شد مواد مورد واکنش به میزان ۷۸ درصد درون کمپلکس نانوپارتیکل‌های PLGA-Chitosan بارگذاری شده‌اند. و به صورت تدریجی و تقریباً با دو پیک دو مرحله‌ای از سامانه نانوذرات یادشده پس از ۲۰ روز به میزان ۳۸ درصد و پس از ۴۸ روز به میزان ۶۱ درصد رهاسازی می‌شود.

آماده سازی موفقیت آمیز و سنتز با کارایی بالا از نانوذرات PLGA-کیتوزان توسط FT-IR، سایز و بار و AFM تایید شد. تغییر بار و سایز به ترتیب از 2.6 ± 20.29 و 3.47 ± 167.03 نانومتر در نانوذره PLGA-کیتوزان به $1/3 \pm 28.29$ و 2.4 ± 209.05 نانومتر در نانوواکسن HIB به دست آمد که موفقیت آمیز بودن کپسولاسیون و حفظ سایز نانو را نشان می‌دهد و همچنین مشخص می‌کند سامانه نانوذرات مورد استفاده قرار گرفته در تهیه واکنش قابلیت جذب سطحی (EPR) بالایی خواهد داشت.

سپس با استفاده از میکروسکوپ AFM سامانه نانوذرات و نانوواکسن HIB مورد بررسی قرار گرفت که تصاویر دو بعدی و سه بعدی حاصل لودینگ موفقیت آمیز آنتی‌ژن پلی ساکارییدی PRP را تایید نمود.

با توجه به نتایج مطلوب آزمایش‌های کیفی انجام شده نانوواکسن‌های تهیه شده برای ایمن سازی حیوانات استفاده گردید. در بررسی میزان القای تیتراژ سرمی آنتی‌بادی‌های مختلف و بررسی قدرت آنتی‌ژنیسیته علیه آنتی‌ژن PRP، پس از تزریق داخل صفاقی آنتی‌ژن‌ها به موش و خون‌گیری آزمایش‌های ایمنی انجام شد. واکنش‌های واکنشی و خون‌گیری از قلب موش‌ها با فواصل دو هفته‌ای انجام شد. سپس نمونه‌های سرمی گردآوری گردید و پاسخ‌های آنتی‌بادی علیه هر آنتی‌ژن به وسیله روش الیزا برای مجموع IgG1, IgA, IgG3, IgG2b, IgG2a, total IgG و Igm اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل حاکی از افزایش چشمگیر

نتایج انجام آزمون‌های پاتولوژی اندام‌های حیاتی موش سوری: پس از حصول نتایج مربوط به عیار آنتی‌بادی‌ها به منظور بررسی و شناسایی آسیب‌های احتمالی نانوواکسن تولید شده در بافت اندام‌های حیاتی موش تعداد ۹ سر موش سوری مطابق روش انجام شده در واکنش‌های صورت گرفته برای تعیین تیتراژ آنتی‌بادی‌ها واکنش‌ها شدند و پس از گذشت یک هفته با تزریق ۲ میلی‌لیتر کلرام هیدرات بی‌هوش شده و اندام‌های حیاتی آن‌ها جدا و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شد و پس از آماده نمودن نمونه‌ها تهیه برش و تهیه لام با روش هماتوکسیلین-اوتوزین H&E رنگ آمیزی انجام شد و بررسی پاتولوژیکی انجام گرفت و هیچ‌گونه اثر تخریبی و تجمع سلول‌های التهابی ناشی از تزریق نانوواکسن تهیه شده در آن مشاهده نشده و سلول‌ها کاملاً نرمال بودند.

بحث

امروزه نانو پارتیکل‌ها در استفاده به عنوان حامل در داروسازی و واکنش سازی توجه ویژه‌ای را به خود جلب نموده‌اند. آن‌ها به دلیل خواص جالب توجه و مزیت‌هایی مانند نسبت بزرگ سطح به حجم، سطح چند عملکردی و ویژگی‌های هدف با نفوذ پذیری پیشرفته و حفظ (EPR) موثر هستند. واکنش‌هایی که از نانوذرات تشکیل شده‌اند یک کلاس جدید از واکنش‌ها هستند که کارآمدتر و مقرون به صرفه‌تر از واکنش‌های معمولی هستند چون در آن‌ها هر دو ایمنی سلولی و هومورال القا می‌شود. نانوواکسن‌ها بر پایه پلیمرهای زیست تخریب پذیر، به دلیل تحویل دهی بهتر آنتی‌ژن، عدم سمیت و سیستم آهسته رهش، پاسخ‌های ایمنی قوی تری تولید می‌کند.

در میان نانوذرات، ویژگی‌های جالب، سازگاری زیستی، تجزیه زیستی و ویژگی‌های سطحی PLGA و کیتوزان توجه زیادی را در استفاده به عنوان حامل‌های دارویی به خود معطوف داشته‌اند. مطالعه حاضر بر روی سنتز واکنش PLGA-chitosan HIB-متمركز بود. در این مطالعه PRP هموفیلوس آنفولانزا به منظور تولید نانوواکسن HIB و مقایسه آن با واکنش تجاری

حامل، باید مطالعات بیشتری انجام شود. با این حال، این یافته‌ها تنها برای استفاده از این نانو حامل در تحویل دارو و کاهش دوز تزریق آن‌ها بسیار جالب است.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که بارگذاری PLGA-Chitosan با آنتی‌ژن PRP توانایی بهتری در تحریک سیستم ایمنی نسبت به PRP موجود در ساختار واکسن پتتاوالان معمول داشته و می‌تواند به صورت چشمگیر سیستم ایمنی را بدون هیچگونه تاثیر مخرب و آسیب بافتی در اندام‌های حیاتی بدن موش، تحریک نماید. در این تحقیق هم چنین مشخص گردید که نانوذره PLGA-Chitosan با خاصیت عدم سمیت و زیست تخریب پذیری قابلیت مناسبی برای استفاده به عنوان حامل در واکسن‌ها برخوردار است و لودینگ آنتی‌ژن‌ها در آن به صورت پایدار صورت می‌گیرد. بنابراین می‌توان اظهار داشت که نانو حامل تهیه شده در این پژوهش به عنوان یک کاندید نانو حامل در تهیه انواع نانو واکسن‌های تک‌گانه، چندگانه و پلی ساکارییدی نظیر واکسن هموفیلوس آنفولانزا و حتی کاهش دوز تزریق در آن‌ها موثر خواهد بود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از گروه داروسازی دانشگاه تهران و مدیر بخش ساخت واکسن‌های باکتریال موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج کمال سپاسگزاری را دارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

عیار آنتی‌بادی‌های مجموع IgG و IgM در مقایسه با واکسن موجود و همچنین عدم سمیت نانو واکسن HIB در اندام‌های حیاتی موش بود و تمامی گروه‌های دریافت کننده نانو واکسن به گروه‌های کنترل اختلاف معنی داری را نشان دادند. جالب توجه است پس از اولین دوز تزریق و پس از گذشت هفته دوم، میزان آنتی‌بادی‌ها به سرعت به بالاترین حد خود افزایش یافت. همانطور که IgG سرم شاخص اصلی محافظت ناشی از واکسن‌های پیشگیرانه است، نانو واکسن HIB، ایمنی بالاتری نسبت به واکسن موجود و گروه کنترل ایجاد کرده است.

این اثر مثبت در سایر فرمول بندی‌های تهیه شده در مطالعات پیشین نیز مشاهده شد. برتری نانو واکسن HIB نسبت به واکسن‌های موجود، احتمالاً به دلیل وجود هسته‌های آب دوست و همچنین کاهش تاثیر آزادسازی انفجاری می‌باشد که در نتیجه اجازه می‌دهد آزادسازی آنتی‌ژن از نانو واکسن بهتر شود. نتایج بیانگر این واقعیت است که نانو واکسن HIB حاصل به مراتب قدرت جذب و ایمنی‌زایی بیشتری داشته و به دلیل سایز نانو و قابلیت تحویل آنتی‌ژن به سلول‌های پذیرنده، سبب تحریک بیشتر سیستم ایمنی خواهد شد.

در ادامه این تحقیق به منظور بررسی میزان آسیب بافتی ناشی از تزریق نانو واکسن در اندام‌های حیاتی (کبد، کلیه، ریه) موش سوری، پس از بیهوشی با کلرام هیدرات و تشریح موش‌ها مراحل آماده سازی لام و رنگ آمیزی H&E انجام شد و لام‌های تهیه شده با بزرگنمایی $\times 10$ و $\times 40$ میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج حاصل از این آزمون حاکی از عدم ایجاد التهاب و تجمع سلول‌های التهابی و پرخونی عروق و عدم سمیت نانوذره مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد.

با توجه به چشم انداز ارزشمند PLGA و کیتوزان از جمله سازگاری زیستی، تجزیه زیستی، حلالیت بیشتری از نانو حامل، هیچ سمیت سلولی در محیط آزمایشگاهی و درون تنی نشان نداد و پاسخ‌های ایمنی بالا نشان می‌دهد که این نانو حامل می‌تواند به زودی به عنوان سیستم تحویل واکسن موثر و ایمن استفاده شود. واضح است که برای درک تمام ویژگی‌های نانو

Reference

1. Koo O.M, Rubinstein I. and Onyuksel H (2005). Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1:193-212.
2. Peer D, Karp J.M, Hong S, Farokhzad O.C, Margalit R. and Langer R (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*, 2:751.
3. Alimohammadi Y.H. and Joo S.W (2014). PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15:517-535.
4. Ghadi A, Mahjoub S, Tabandeh F. and Talebnia F (2014). Synthesis and optimization of chitosan nanoparticles: Potential applications in nanomedicine and biomedical engineering. *Caspian J Intern Med*, 5:156.
5. Esmaeili F, Ghahremani M.H, Esmaeili B, Khoshayand M.R, Atyabi F. and Dinarvand R (2008). PLGA nanoparticles of different surface properties: preparation and evaluation of their body distribution. *Int J Pharm*, 349:249-255.
6. Cho S.Y, Park J, Chung W.Y, Kim E, Jung I.Y, Choi S.H, Park K.K. and Lee S.J (2017). Proteome Expression in Human Periodontal Ligament after Delayed Hypothermic Preservation. *J Endod*, 43:1317-1322
7. Rezvani M, Mohammadnejad J, Narmani A. and Bidaki K (2018). Synthesis and in vitro study of modified chitosan-polycaprolactam nanocomplex as delivery system, *Int J Biol Macromol*.113:1287-1293.
8. Anirudhan T.S. and Parvathy J (2018). Novel Thiolated Chitosan-Polyethyleneglycol blend/ Montmorillonite composite formulations for the oral delivery of insulin. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre*
9. Safari M, Ghiaci M, Jafari-Asl M. and Ensafi A.A (2015). Nanohybrid organic–inorganic chitosan/dopamine/TiO₂ composites with controlled drug-delivery properties, *Appl. Surf. Sci.*342:26-33.
10. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*: Mosby; 2005.
11. Alikhani .Z, Salouti.M and Shafiee Ardestani.M. Synthesis and immunological evaluation of a nanovaccine based on PLGA nanoparticles and alginate antigen against infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*.2018 IOP Publishing Ltd.
12. Alikhani .Z, KazemiPour.N and Shafiee Ardestani.M, Development and characteristics of novel PLGA-chitosan as a new nano-carrier for pentavalent vaccine delivery.2020 *Current Pharmaceutical Biotechnology*.

13. Peltola H. Worldwide Haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000;13(2):302-17.
14. Jawetz M, editor. *Adelberg's Medical Microbiology*. Twenty; 2007.
15. Kelly DF, Moxon ER, Pollard AJ. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. *Immunology*. 2004;113(2):163-74.
16. Cripps AW, Foxwell R, Kyd J. Challenges for the development of vaccines against Haemophilus influenzae and Neisseria meningitidis. *Current opinion in immunology*. 2002;14(5):553-7.
17. Li W, Sydney Chung S. Flow cytometric evaluation of leukocyte function in rat whole blood. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 2003;39(10):413-9.
18. Eskola J, Ward J, Dagan R, Goldblatt D, Zepp F, Siegrist C-A. Combined vaccination of Haemophilus influenzae type b conjugate and diphtheria-tetanus-pertussis containing acellular pertussis. *Lancet*. 1999;354(9195):2063-8.
19. Mawas F, Bolgiano B, Rigsby P, Crane D, Belgrave D, Corbel MJ. Evaluation of the saccharide content and stability of the first WHO International Standard for Haemophilus influenzae b capsular polysaccharide. *Biologicals*. 2007;35(4):235-45.
20. Rappuoli R. Conjugates and reverse vaccinology to eliminate bacterial meningitis. *Vaccine*. 2001;19(17):2319-22.