

بررسی اثر سدیم الژینات به عنوان ادجوانت طبیعی جایگزین بر ایمنی زایی واکسن پروتئین نو ترکیب RBD-FC تولید شده توسط مخمر پیکیا پاستوریسی و بررسی دینامیک مولکولی

Effect of sodium alginate as alternative natural adjuvant on immunogenicity of Yeast-produced RBD-FC recombinant protein vaccine and molecular dynamics Investigations

محبوبه دهقان^۱، مسعود توحیدفر^{۲*}، سید امید رعنائی سیادت^۳، حسین عسکری^۲، فثانه فاطمی^۲، یحیی سفیدبخت^۳

۱- دانش‌آموخته دکتری مهندسی بیوتکنولوژی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- استاد، دانشیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استادیاران، مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

Dehghan M¹, Tohidfar M², Rananei Siadat SO³, Askari H², Fatemi F³, Sefidbakt Y³

1- PhD Graduated of Biotechnology Engineering, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2- Professor, Associate Professor, Associate Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

3- Assistant Professors, Protein Research Center, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m_tohidfar@sbu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۱)

چکیده

RBD نقش عمده‌ای در ایجاد عفونت SARS-COV-2 ایفا می‌کند، زیرا ورود ویروس به سلول میزبان با اتصال RBD به گیرنده‌ی انزیم مبدل انژیوتانسین_۲ (ACE2) اتفاق می‌افتد. RBD همچنین یک کاندید ایمنی مهم در توسعه‌ی واکسن‌هایی با زیرواحد پروتئین است. در این مطالعه بیان RBD نو ترکیب در مخمر پیکیا پاستوریسی به راحتی و با هزینه‌ی کم انجام شد. RBD نو ترکیب و ادجوانت‌هایی مانند سدیم الژینات، الوم و ترکیب این دو در مدل موشی در افزایش سطح آنتی بادی‌های خنثی کننده و افزایش پایداری واکسن مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از یک سیستم کمکی طبیعی جایگزین به جای ادجوانت الوم باعث افزایش ایمنی زایی آنتی ژن RBD و پایداری آن می‌شود، به طوری که RBD فرموله شده با سدیم الژینات به تنهایی و RBD فرموله شده با سدیم الژینات و الوم، تیر آنتی بادی و پایداری بالاتری نسبت به RBD فرموله شده با الوم به تنهایی نشان دادند. افزایش ایمنی زایی آنتی ژن RBD با فرمول RBD:SA:AL و RBD:SA توسط سنجش‌های سرولوژیکی نظیر الی‌زای مستقیم و تست خنثی سازی ویروس جایگزین (sVNT) تعیین شد. سطوح بالای IgG و آنتی بادی‌های خنثی کننده در سرم موش‌هایی که با فرمولاسیون RBD:SA:AL واکسینه شده بودند نشان داده شد. در مجموع، نتایج ما نشان داد که سدیم الژینات به عنوان یک ادجوانت طبیعی مؤثر در مقایسه با ادجوانت الوم است. علاوه بر این، با توجه به نتایج به دست آمده، ترکیب سدیم الژینات و الوم مؤثرتر از سدیم الژینات به تنهایی است. به منظور تجسم ساختار واکسن RBD-FC، شبیه سازی دینامیک مولکولی برای RBD-FC با گلیکان و بدون گلیکان انجام شد. تجزیه و تحلیل ریشه‌ی میانگین انحراف مربع (RMSD)، شعاع چرخش (RG) و ریشه میانگین نوسانات مربع (RMSF) نشان داد که سازه دارای فولدینگ پایدار و ساختار مناسب به دلیل استفاده از لینکر است.

واژه‌های کلیدی

ادجوانت طبیعی
تست خنثی سازی ویروس جانشین
دامنه اتصال گیرنده
سدیم الژینات

مقدمه

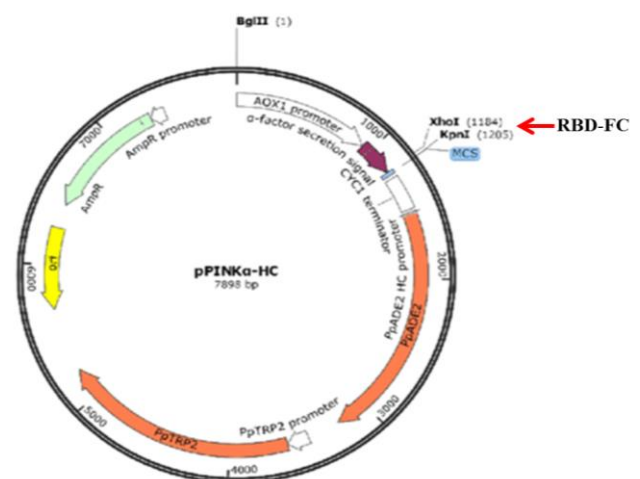
SARS-COV-2 عضو جدیدی از کرونا ویروس‌ها است که شامل گروه بزرگی از ویروس‌های RNA دار تک رشته‌ای پوشش‌دار متنوع است (Zumla et al. 2016). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که منشأ SARS-COV-2 به دلیل شباهت توالی ژنتیکی‌شان به سایر COVs از خفاش‌هاست (Zhou et al. 2020). کرونا ویروس‌ها دارای چهار چارچوب خواندن باز (ORF) برای پروتئین‌های ساختاری Spike، Envelope، Membrane، Nucleocapsid هستند. اسپایک یا پروتئین‌های S در کرونا ویروس‌ها به دو زیرواحد عملکردی مهم تقسیم می‌شوند که در آن‌ها N ترمینال زیرواحد S1 و C ترمینال زیر واحد S2 پروتئین را تشکیل می‌دهد. اسیدهای آمینه 591-319 از S1 مربوط به RBD است که مسئول تعامل با ACE2 است (Sanyal et al. 2020). RBD موجود در S1 مربوط به SARS-CoV و SARS-CoV-2 با شناسایی گیرنده ACE2 (آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲) بر روی سلول‌های میزبان، به آن متصل شده و باعث تغییرات ساختاری در S2 می‌شود که این امر منجر به ادغام ویروس با میزبان و ورود آن به سلول میزبان برای همانند سازی می‌شود (Zhou et al. 2020; Xia et al. 2020). ACE2 به عنوان گیرنده سلولی SARS-COV شناسایی شد (Zhou et al. 2020; Teng et al. 2021). مطالعات قبلی نشان داده است که RBD مربوط به SARS COV، حاوی چندین اپی توپ وابسته به ساختار است و می‌تواند آنتی بادی‌های خنثی‌کننده با تیترا بالا را القاء کند (Wanget al. 2020; He et al. 2004). یکی از مهم‌ترین اهداف برای توسعه ویاکسن SARS است (He et al. 2004). آنتی بادی‌های ضد RBD با پاسخ ایمنی هومورال و غیر فعال کردن سلول‌های ویروسی از اتصال RBD به گیرنده ACE2 و ورود ویروس به سلول‌های میزبان جلوگیری می‌کنند (Kato et al. 2003). در مطالعات قبلی نشان داده شده است که قطعه‌ی FC مربوط به IgG انسانی در واکسن مبتنی بر RBD (RBD-FC)، می‌تواند به عنوان یک تقویت‌کننده‌ی مهم ایمنی برای افزایش ایمنی‌زایی RBD عمل کند (He et al. 2004; Du et al. 2006; He et al. 2007). با توجه به مطالعات انجام شده برای تولید یک واکسن کارآمد، استفاده از حامل‌ها یا ادجوانت‌های

ایمنی‌زای قوی‌تر ضروری است. الوم در حال حاضر رایج‌ترین ادجوانت در زمینه‌ی واکسن‌ها می‌باشد، اما موانعی ایجاد می‌کند که باید بر آن‌ها غلبه کرد. مضراتی مانند: پاسخ ایمنی ضعیف در برخی از افراد واکسینه شده و سوسپانسیون حساس به سرما. الوم مانند هر ادجوانت معدنی، به سختی در یک روش فیزیکوشیمیایی قابل تکرار ساخته می‌شود. این نقص بر ایمنی‌زایی فرمولاسیون آن تاثیر می‌گذارد. علاوه بر این، الوم را نمی‌توان به راحتی منجمد یا لیوفیلیز کرد، زیرا هر دوی این فرایندها باعث فروپاشی ژل و در نتیجه تجمع ناخالصی و رسوب می‌شود (Itodo et al. 2009). برای این منظور لازم است که از یک سیستم کمکی طبیعی جایگزین استفاده شود که ایمنی‌زایی بالایی ایجاد کند و دوز و هزینه را کاهش دهد. تمایل کلی به استفاده از محصولات طبیعی به عنوان منبع بالقوه ترکیبات تعدیل‌کننده‌ی ایمنی وجود دارد (Vasiliev 2015; Leary et al. 2013). ترکیبات مختلفی که از منابع طبیعی مانند گیاهان، میکروارگانیسم‌ها، جلبک‌ها یا حشرات به دست می‌آیند، در توسعه‌ی ادجوانت‌های جدید در داروها و واکسن‌ها برای درمان بیماری‌هایی مانند آلرژی و سرطان که نیاز به درمان تعدیل‌کننده دارند، استفاده شده‌اند (Leary et al. 2013; Scherlie et al. 2013). سدیم الزینات یک پلی ساکارید طبیعی از اسید الزینیک سدیم است. این صمغی است که از دیواره‌ی سلولی جلبک قهوه‌ای استخراج می‌شود و به طور کلی غیر سمی و غیر تحریک‌کننده است. سدیم الزینات به عنوان یک پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر که در صورت مصرف باعث ایجاد سمیت نمی‌شود، پلیمر مناسبی برای استفاده در ساخت واکسن است (Dobakhti et al. 2009). در این مطالعه، ما یک واکسن زیر واحد نوترکیب RBD-FC طراحی کرده‌ایم که حاوی RBD مربوط به SARS-COV-2 در S1 و قطعه‌ی FC از IgG انسانی است. از سوی دیگر، فرمولاسیون‌های مختلف آنتی ژن RBD-FC به همراه ادجوانت‌های سدیم الزینات و الوم به تنهایی و ترکیب این دو با روش الیازی رقابتی و sVNT بر روی موش‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و توانستیم تیترا بالایی از IgG را در سرم موش‌های واکسینه شده تشخیص دهیم. این مطالعه دیدگاه جدیدی در مورد تأثیر ادجوانت‌ها بر پایداری و اثر بخشی بهینه‌ی واکسن ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها

رزین پروتیین A از شرکت سپهدار فرجام خریداری شد. IgG-FC ضد انسان مونوکلونال موش کانجوه با HRP از شرکت Southern Biotech تهیه شد. پودر سدیم الزینات از فرم سیگما الدریج (ایالات متحده آمریکا) بود. موش Balb-C از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (ایران) خریداری شد.

در ساخت وکتور نوترکیب، برای بیان RBD مونومر مربوط به SARS-COV-2 در مخمر پیکیا پاستوریس، ژن RBD (V32 to G550) مربوط به SARS-COV-2، سویه ی ووهان چین کدون اپتیمایز و سنتز شد. ژن RBD بهینه شده، دارای برچسب FC در C ترمینال، در ناقل Ppink- α -HC قرار داده شد و پلاسمید Ppink- α -HC-RBD را تولید کرد (Zang et al. 2021). (شکل ۱)



شکل ۱- پلاسمید نوترکیب pPink α -HC-RBD، مقاوم به آمپی سیلین، آنزیم محدود کننده ی XhoI, KpnI

پلاسمید (Ppink- α -HC-RBD) با هضم آنزیمی BSPE1 خطی شد و توسط الکتروپوریشن به سلول‌های مستعد مخمر Pichia Pink، سویه ی ۴ منتقل شد. بعد از انتقال، سلول‌های مخمر روی پلیت‌های انتخابی PAD فاقد آدنین همراه با آمپی سیلین قرار گرفتند. به منظور تایید ترنسفورم شدن مخمر، ۱۰ کلونی به طور تصادفی انتخاب و کلنی پی سی ار انجام شد. برای تولید پروتیین مونومر RBD، کلون‌های مخمر انتخاب شده به طور جداگانه در محیط ۴۰ میلی لیتر YPG در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در داخل شیکر قرار گرفتند تا (OD: 8-12) حاصل شود. سلول‌های مخمر

توسط سانتریفیوژ جمع‌آوری شده و در محیط ۴۰ میلی لیتری YP با متانول ۱ درصد معلق شدند. پس از ۷۲-۴۸ ساعت القاء در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، مایع رویی محیط کشت برداشت شد و با سولفات آمونیوم ۸۰٪ تغلیظ شد. سپس پروتیین‌های RBD-FC با استفاده از رزین پروتیین A طبق دستورالعمل سازنده خالص شدند. پروتیین‌های RBD خالص شده توسط SDS-PAGE (۱۲٪ اکریل امید) و وسترن بلات همان‌طور که در زیر توضیح داده شده است آنالیز شدند (Zang et al. 2021).

پروتیین‌های RBD نوترکیب خالص شده، توسط SDS-PAGE جدا شده و به غشاء PVDF منتقل شدند. پس از بلوکه شدن توسط TBS 1X (Ph: 7.5) حاوی ۵ درصد skim milk به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق، غشاء با آنتی بادی های کونژوگه IgG- HRP انسانی (رقت ۱:۲۰۰۰) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شستشوی غشاء با بافر TBST حاوی (TBS 1X + tween 20) به مدت ۵ دقیقه، ۳ و ۳-دیی آمینو بنزیدین تتراییدرو کلراید (DAB) برای تجسم واکنش اعمال شد (Zang et al. 2021).

ادجوانت‌های سدیم الزینات و الومینیوم هیدروکسید (الوم) به ترتیب با غلظت‌های ۵ mg/ml و 0.5 mg/ml تهیه شدند (Zang et al. 2021). همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، از فرمولاسیون‌های مختلف واکسن کمکی، برای به دست آوردن غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از آنتی ژن RBD استفاده شد. ادجوانت سدیم الزینات با آنتی ژن RBD و ادجوانت الوم با آنتی ژن RBD به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر انکوبه شدند تا آنتی ژن و ادجوانت کاملاً جذب شود. فرمول الوم با سدیم الزینات (AL:SA) با افزودن الوم به آنتی ژن تهیه شد و دوباره به مدت ۱ ساعت در شیکر در دمای اتاق انکوبه شد. موش‌های Balb/c چهار تا ۶ هفته‌ای به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند که هر گروه شامل ۶ موش ماده بود. چهار گروه موش به صورت زیر جلدی با (10 μ g Ag RBD/100 μ l/mouse) واکسینه شدند (Darvish et al. 2023). طبق جدول ۱) نرمال سالین به عنوان کنترل منفی، ۲) بارگزاری شدن ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی ژن RBD بر روی الوم ۳) بارگزاری شدن ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی ژن RBD بر روی سدیم الزینات ۴)

$$LE(\%) = \frac{\text{total amount of RBD Ag} - \text{free RBD Ag}}{\text{total amount of RBD Ag}} * 100$$

سرم نمونه خون با سانتیفریوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ g جمع‌آوری شد. برای اندازه‌گیری IgG اختصاصی RBD در نمونه سرم، RBD خالص (۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در بافر کرینات 0.05 M با (pH=9.6) مخلوط شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن در داخل هر چاهک پلیت الیزا توزیع شد. بعد از انکوباسیون پلیت کوت شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در طول شب، توسط بافر بلوکه‌کننده (PBS شامل 2% BSA) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پلیت ۴ بار با PBST (PBS+ 0.05% Tween20) شسته شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سرم هر گروه به چاهک‌ها اضافه شد. پس از انکوباسیون پلیت به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۳۷ درجه سانتی‌گراد، آنتی بادی بزی علیه IgG موشی کنژوگه با HRP اضافه شد و یک ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از ۴ بار شستشو با PBST، ۱۰۰ میکرولیتر TMB (۰.۵، ۳.۳، ۵.۵-ترامتیل‌بنزیدین) به عنوان سوپسترا به هر چاهک اضافه شد. واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۰/۲ مولار متوقف شد و جذب در ۱۰ دقیقه در ۴۵۰ تا ۶۳۰ نانومتر در دستگاه الیزا (بیوتک، ایالات متحده آمریکا) خوانده شد.

اختصاصیت ایمنوننتیک آنتی بادی سرم علیه آنتی ژن RBD و میزان مهار آن با روش الیزای رقابتی یا مهار تعیین شد (Borges et al. 2008). در این آزمایش مقادیر مختلف آنتی ژن (غلظت ۱ تا ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با سرم موش پس از ایمن سازی به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مجدداً به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

بارگزاری شدن ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی ژن RBD بر روی الوم و سدیم الزینات (AL:SA). تزریق دوم واکسن پس از ۲۱ روز از تزریق اول با همان مقدار تزریق قبلی (10µg Ag RBD/100 µl/mouse) انجام شد. ۱۰ روز بعد از هر تزریق واکسن برای شناسایی IgG، نمونه خون جمع‌آوری شد. موش‌های Balb/c چهار تا ۶ هفته‌ای به‌طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند که هر گروه شامل ۶ موش ماده بود. چهار گروه موش به‌صورت زیر جلدی با (10 µg Ag RBD/100 µl/mouse) واکسینه شدند (Darvish et al. 2023). طبق جدول ۱ نرمال سالیین به‌عنوان کنترل منفی، (۲) بارگزاری شدن ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی ژن RBD بر روی الوم (۳) بارگزاری شدن ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی ژن RBD بر روی سدیم الزینات (۴) بارگزاری شدن ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی ژن RBD بر روی الوم و سدیم الزینات (AL:SA). تزریق دوم واکسن پس از ۲۱ روز از تزریق اول با همان مقدار تزریق قبلی (10 µg Ag RBD/100 µl/mouse) انجام شد. ۱۰ روز بعد از هر تزریق واکسن برای شناسایی IgG، نمونه خون جمع‌آوری شد.

بازده بارگزاری (loading efficiency) هر فرمولاسیون واکسن، یعنی Al:Sa, Sa, Al به‌طور غیر مستقیم با کمی کردن آنتی ژن آزاد (RBD) باقی‌مانده در مایع رویی پس از سانتیفریوژ کردن مخلوط در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه اندازه‌گیری شد و غلظت آنتی ژن در مایع رویی با استفاده از منحنی استاندارد BSA به روش لوری تعیین شد و بازده بارگزاری (LE) بر اساس رابطه‌ی زیر محاسبه شد (۲۰ و ۱۸):

جدول ۱- ترکیب فرمولاسیون سیستم کمکی (ادجوانت)

کنترل منفی	(Al) الوم	(Sa) سدیم الزینات	(AlSa) الوم+سدیم الزینات
نرمال سالیین	✓		
آنتی ژن RBD (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)		✓	✓
Alum (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	✓		✓
سدیم الزینات (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)		✓	✓

الایزا در طول موج‌های ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Raghav et al. 2017). به منظور شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، Gromacs 20.20.6 برای 200 ns استفاده شد (Zhang et al. 2022). ابتدا پروتیین توسط سرور I-TASSER مدل‌سازی شد (Abraham et al. 2015). کیفیت ساختار توسط SAVES v6.0 (۲۵) و ProSA (Colovos and Yeates, 1993) ارزیابی شد، سپس اتم‌های هیدروژن توسط سرور H++ به پروتیین اضافه شدند. طبق مقالات اخیر (Sipl 1993; Shah 2017) زنجیره‌های گلیکان از طریق مازول Glycan Reader در سرور CHARMM-GUI به ساختار اضافه شدند (Woo et al. 2020). در توپولوژی سیستم، میدان نیروی CHARMM 36(m) با فواصل برش 12 Å و الگوریتم‌های حل محدودیت خطی (LINCS) در نظر گرفته شد. همچنین سیستم با 0.15 M KCl خنثی و با مدل ایی TIP 3P حل شد. دمای ۳۱۰ کلونین برای شبیه‌سازی در نظر گرفته شده است. در نهایت پارامترهای RMSF، RMSD، شعاع چرخش (Rg)، SASA و پارامترهای پیوند H درون ملکولی (Intramolecular H-bonds) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تولید RBD مونومر مربوط به SARS-CoV-2 در مخمر پیکیا پاستوریس

برای تولید پروتیین نوترکیب RBD مربوط به SARS-CoV-2 در مخمر، یک ناقل بیانی به نام pPink α -HC-RBD ساخته شد. این ناقل، RBD مربوط به SARS-CoV-2 را رمزگذاری می‌کند که با یک سیگنال پپتید α -mating factor در N ترمینال و یک برچسب FC (fc-tag) در C ترمینال ترکیب شده است. برای ترنسفورم کردن مخمر پیکیا پاستوریس از وکتور pPink α -HC-RBD استفاده شد. مخمرهای ترنسفورم شده برای تایید حضور RBD با کلنی پی سی آر آنالیز شدند (شکل ۲ و).

برای تایید بیان پروتیین در این مرحله از SDS-PAGE و وسترن بلات استفاده شد. پروتیین نوترکیب RBD از مایع رویی کشت مخمر، همان‌طور که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شد، خالص‌سازی شد. RBD خالص شده به‌عنوان یک باند پروتیینی ~55 kDa در SDS-PAGE ظاهر شد (شکل ۲ ی). تجزیه و تحلیل وسترن بلات برای شناسایی پروتیین RBD با یک آنتی‌بادی مونوکلونال FC انجام شد (شکل ۲ ن).

سپس کمپلکس ایمنی تشکیل شده (آنتی ژن - سرم) به چاهک‌های تحت پوشش RBD اضافه شد. مراحل بعدی مانند الایزا با اتصال مستقیم انجام شد. همچنین گروه سرمی به‌عنوان شاهد به جای آنتی ژن با بافر سنجش انکوبه شد. چاهک‌های پوشش داده شده با نمونه‌ی کنترل فاقد آنتی ژن (NAC) حداکثر OD را نشان دادند.

با استفاده از رابطه‌ی زیر، درصد مهار چاهک‌های مختلف حاوی محاسبه شد: NAC-نمونه (آنتی ژن - سرم) در برابر چاهک‌های

$$Inhibition\% = (A_{NAC} - A_{inhibited}) / A_{NAC} \times 100$$

A_{NAC} و $A_{inhibited}$ به ترتیب جذب چاهک‌های مهار شده و کنترل فاقد آنتی ژن هستند.

نتایج

sVNT بر اساس کیت تست آنتی بادی خنثی کننده SARS-CoV-2 به روش الایزا مورد سنجش قرار گرفت. در این کیت، چاهک‌های پلیت با آنتی ژن RBD (۱ میکروگرم RBD در ۱۰۰ میکرولیتر بافر در هر چاهک) پوشش داده شد و مجموعه‌ی استانداردها (آنتی‌بادی خنثی‌کننده SARS-CoV-2 با عملکرد خنثی‌سازی SARS-CoV-2 تأیید شده) با غلظت‌های (۴۰ و ۱۰ و ۵ و ۲/۵ و ۱ و ۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ارزیابی شد. ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد و نمونه‌ها در چاهک مربوطه ریخته می‌شود، به این صورت که شش چاهک اول برای استانداردهای مختلف و چاهک‌های بعدی برای کنترل مثبت و منفی و چاهک‌های دیگر برای نمونه‌ها استفاده می‌شود. بلافاصله ۵۰ میکرولیتر hACE2 کونژوگه با HRP به چاهک‌های مربوطه اضافه شد. محتویات چاهک‌ها به آرامی مخلوط شده و چاهک‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون و ۵ بار شستشو با PBST، ۱۰۰ میکرولیتر TMB به‌عنوان سوبسترا به هر چاهک اضافه شد. چاهک‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق قرار گرفتند. با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر چاهک، واکنش‌های آنزیمی متوقف شد و جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه

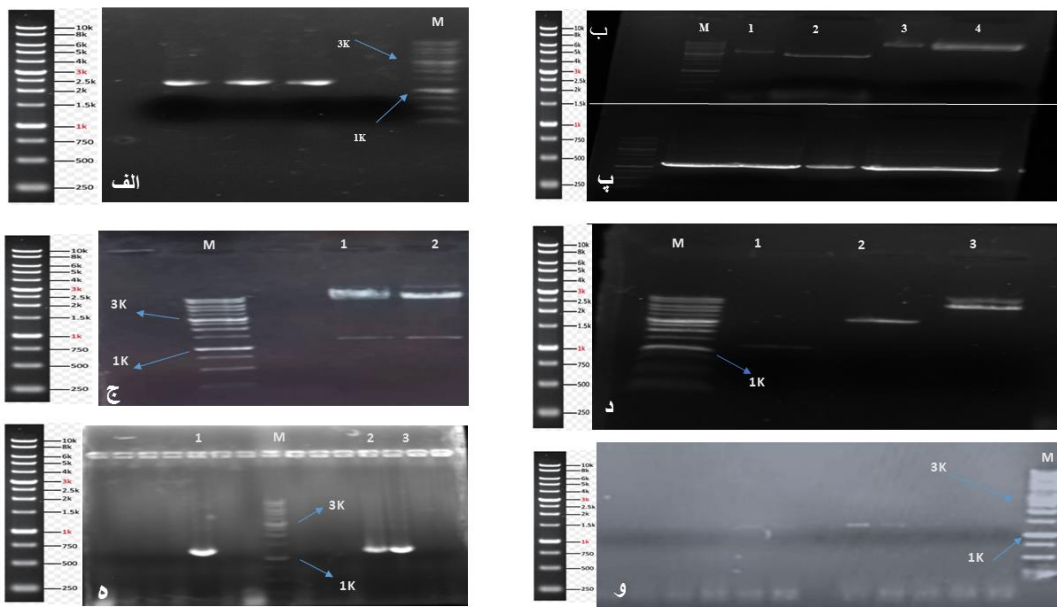
IgG ضد RBD آنالیز شد. هیچ یک از نمونه‌های سرم از گروه کنترل، هیچ گونه فعالیت اتصال قابل توجهی را حتی در کمترین رقت سرم آزمایش شده (۱:۱۰) نشان ندادند (شکل ۳). در مقابل، نمونه‌های سرم موش‌های واکنش داده شده با RBD، پس از اولین خون‌گیری، فعالیت اتصال قابل توجهی را نشان دادند و تیتراژ آنتی بادی اختصاصی RBD در خون‌گیری دوم بسیار افزایش یافت (شکل ۳).

اثر ادجوانت مختلف بر ایمنی‌زایی RBD مونومر بیان شده در مخمر

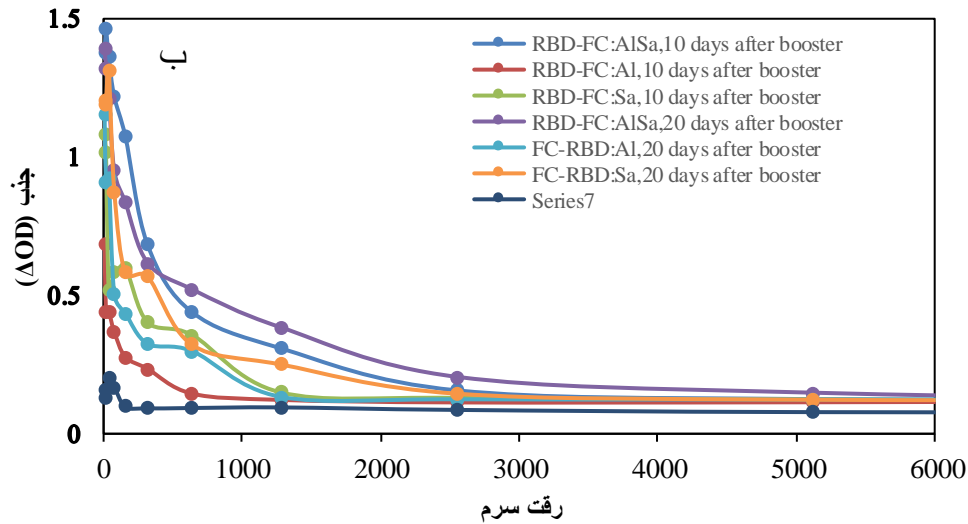
با علم به اینکه RBD مونومر بیان شده در مخمر، آنتی ژنی است که قادر به القای آنتی بادی‌های خنثی‌کننده است، بنابراین آزمایش ایمن سازی موش دیگری را برای ارزیابی فرمولاسیون‌های مختلف RBD انجام دادیم.

القای آنتی بادی‌های خنثی‌کننده‌ی قوی در موش توسط RBD مونومر بیان شده در مخمر

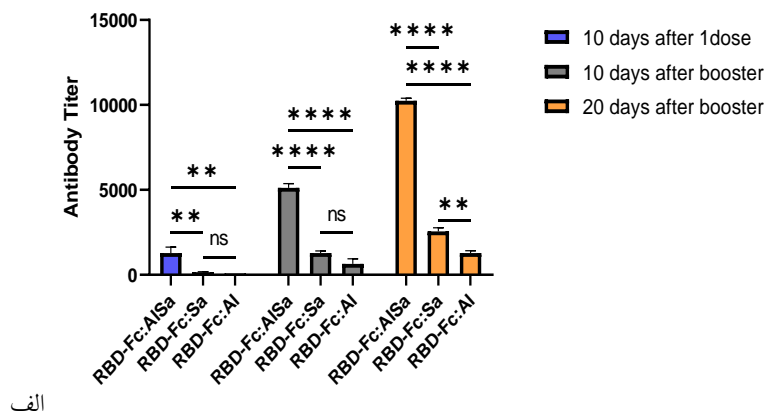
برای ارزیابی سریع ایمنی‌زایی RBD مونومر تولید شده توسط مخمر، موش‌ها با سه نوع واکنش‌کننده ایمن شدند. گروهی از موش‌های BALB/c (n=6) با تزریق زیر جلدی با واکنش‌کننده (۱۰۰ میکروگرم RBD مونومر فرموله شده با ادجوانت الوم) در ۲ دوز، که دوز دوم سه هفته بعد از اولین دوز است ایمن شدند. گروه دوم موش‌ها (n=6) با (۱۰۰ میکروگرم RBD مونومر فرموله شده با ادجوانت سدیم الژینات) و گروه سوم موش‌ها (n=6) با (۱۰۰ میکروگرم RBD مونومر فرموله شده با ادجوانت سدیم الژینات و الوم) ایمن شدند. به گروه دیگر موش‌ها ۰/۹٪ NaCl تزریق شد که به عنوان شاهد استفاده می‌شود. نمونه‌های خون، ۱۰ روز بعد از واکنش‌یابی اول و دوم و ۲۰ روز بعد از واکنش‌یابی دوم جمع‌آوری شد و برای



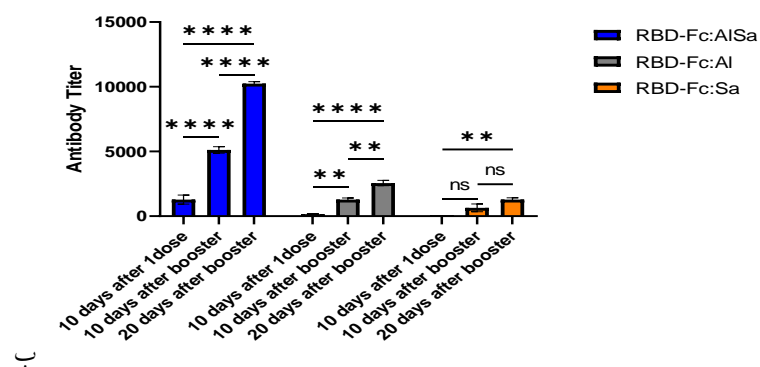
شکل ۲- الف) PCR-RBD-PMA. لاین (M): DNA Ladder و لاین‌های دیگر RBD با 1300bp. ب) Double Digest: با آنزیم‌های kpn1 و xho1 لاین (M): DNA Ladder (DM3100, SMOBiO) و لاین (۱) un cut Ppicz و لاین (۲) cut Ppicz: و لاین (۳) un cut pPinkα-HC: و لاین (۴) cut pPinkα-HC: با آنزیم‌های kpn1 و xho1. پ) Double Digest: با آنزیم‌های kpn1 و xho1. د) بعد از ریکواری ژل. لاین (M): DNA Ladder. لاین (۱): RBD و لاین (۲) و (۳): RBD. ج) دبل دایجست پلاسمید استخراج شده از باکتری ترانسفورم. لاین (M): DNA Ladder و لاین (۱) و (۲): از بالا به پایین pPinkα-HC و RBD. د) بعد از ریکواری ژل. لاین (M): DNA Ladder. لاین (۱): RBD و لاین (۲) و (۳): pPinkα-HC. ه) کلنی پی سی ار ایکولای برای تأیید ترانسفورماسیون. لاین (M): DNA marker و لاین (۱) و (۲) و (۳): RBD با 1300bp. و) کلنی پی سی ار مخمر برای تأیید ترانسفورماسیون. لاین (M): DNA marker و لاین‌های دیگر RBD با 1300bp. ی) آنالیز SDS-PAGE مربوط به RBD-FC نوترکیب بیان شده در مخمر *Pichia pink*. پروتئین کلی استخراج شده از سلول‌های مخمر *Pichia pink*. لاین (M): protein ladder. لاین (۱) و (۲): RBD-FC نوترکیب محلول استخراج شده سلولی. ن) ارزیابی وسترن بلات پروتئین RBD. لاین (M): protein marker (BioBasic) و لاین (۱) و (۳) و (۴): پروتئین RBD و لاین (۲): کنترل منفی (pPinkα-HC) القاء شده برای ۹۶ ساعت.



شکل ۳- تیتراژ IgG ضد RBD موش‌های ایمن سازی شده با فرمولاسیون‌های مختلف. (الف) سرم ۱۰ روز پس از اولین و دومین تزریق جمع‌آوری شد و IgG ضد RBD کل سرم تعیین شد. (ب) تیتراژهای سرم برای فرمولاسیون‌های مختلف، ۱۰ و ۲۰ روز پس از تزریق دوم آنالیز شد.

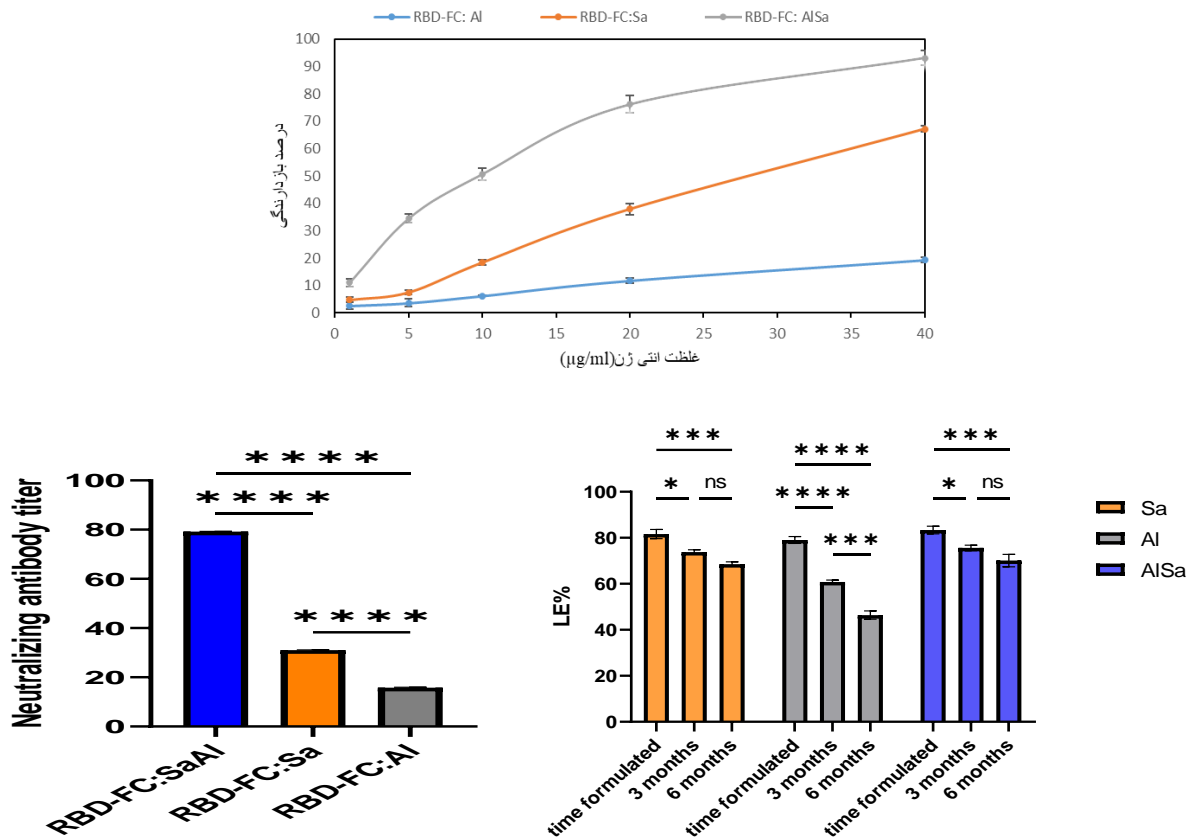


الف



ب

شکل ۴- سطوح IgG اختصاصی آنتی ژن RBD در موش‌های ایمن سازی شده با فرمول‌های واکسن کمکی (ادجوانت) تک و دوگانه. (الف) نمودار، تفاوت سطوح IgG فرمولاسیون‌های تک و دوتایی را در زمان‌های مختلف تزریق نشان می‌دهد. (ب) نمودار، افزایش سطح IgG هر واکسن کمکی (Al, Sa, Al/Sa) را پس از ۱۰ و ۲۰ روز پس از تزریق دوم نشان می‌دهد.



شکل ۵- (الف) الایزای رقابتی نشان دهنده درصد بازدارندگی برای برهم کنش ضد RBD در سرم موش‌های ایمن‌سازی شده با آنتی ژن RBD. (ب) اثر بارگزاری (LE%) آنتی ژن RBD در فرمولاسیون واکسن در زمان‌های مختلف. فرمول دوگانه‌ی حاوی الوم و سدیم الزینات در مقایسه با فرمول منفرد حاوی الوم یا سدیم الزینات، درصد LE بیشتری را نشان داد. (ج) تیتراژ آنتی بادی خنثی‌کننده‌ی سرم موش‌های ایمن شده با (RBD:Al, RBD:Sa, RBD:AlSa).

۴ گروه از موش‌های BALB/c (۶ نفر در هر گروه) با کنترل (نرمال سالین ۰/۹٪) یا با یکی از ۳ فرمولاسیون تجربی، شامل: (الوم + ۱۰۰ µg RBD) یا (الوم و سدیم الزینات + ۱۰۰ µg RBD) یا (سدیم الزینات + ۱۰۰ µg RBD). نمونه‌های سرمی از موش‌های جداگانه در نقاط زمانی مشخص شده برای اندازه‌گیری آنتی بادی جمع‌آوری شد. تمام موش‌های ۳ گروه فرمولاسیون، قبلاً سطوح قابل توجهی از آنتی بادی‌های اختصاصی RBD را در اولین خون‌گیری ایجاد کرده بودند (شکل ۴ الف). و تیتراژ آنتی‌بادی در خون‌گیری دوم بیشتر شد (شکل ۴ الف). علاوه بر این، مشخص شد که در حضور ادجوانت سدیم الزینات به تنهایی و ترکیب سدیم الزینات و الوم، سطوح بالاتری از آنتی‌بادی‌های اختصاصی RBD نسبت به ادجوانت الوم به تنهایی القاء می‌شود. بر اساس نتایج سنجش ایمونوفلورسانس (IFA)، آنتی سرم‌های ترکیبی (۱۰۰ µg RBD+Alum) و (۱۰۰ µg RBD+Alum+SA) و

۱۰۰۰ RBD+SA) µg، به ترتیب در رقت‌های (۱:۶۴۰، ۱:۲۵۶۰، ۱:۱۲۸۰) در خون‌گیری اول و (۱:۵۱۲۰، ۱:۲۵۶۰، ۱:۱۲۸۰) در خون‌گیری دوم، توانستند تیتراژ آنتی بادی قابل توجهی را ایجاد کنند. در حالی‌که سرم‌های کنترل حتی در رقت ۱۰:۱ غیر خنثی‌کننده بودند (شکل ۴ ب).

تست مهار (INHIBITION TEST)

ویژگی تیتراژ آنتی بادی القا شده در سرم موش‌های ایمن شده، با روش الایزای مهار (رقابتی) ارزیابی شد. موش‌های ایمن‌سازی شده با فرمولاسیون‌های RBD:ALSA, RBD:SA, RBD:AL به ترتیب مهارهای ۱۱/۸۴۵٪ و ۳۷/۹۳۵٪ و ۷۶/۱۶٪ را با غلظت RBD (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نشان دادند (شکل ۵ الف). بنابراین رابطه‌ی نزدیکی بین RBD نوترکیب و آنتی‌بادی القاء شده علیه SARS-COV-2 وجود دارد. جذب آنتی ژن RBD در فرمولاسیون واکسن

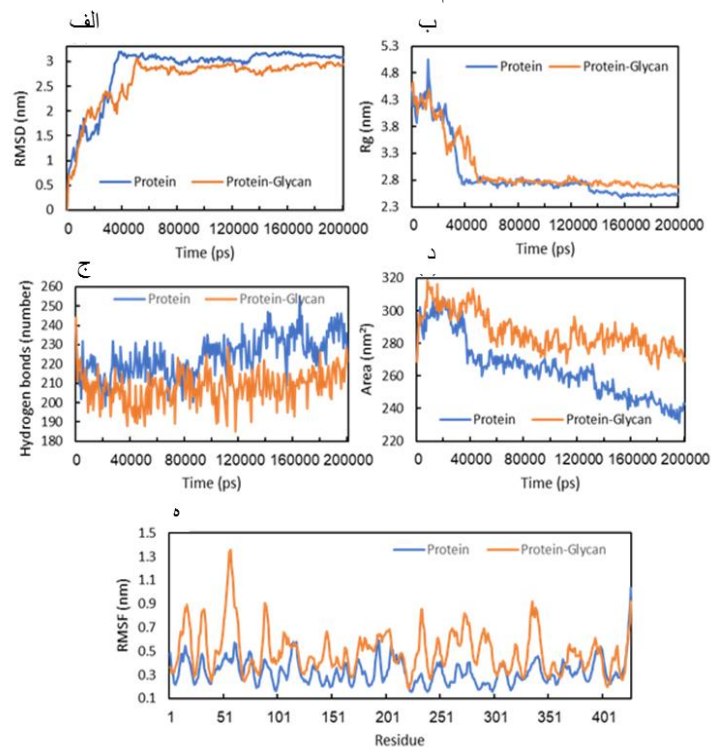
میلی‌لیتر، مثبت در نظر گرفته می‌شود. مطابق نمودار (شکل ۵ ج)، هر سه فرمول (RBD:AL:SA, RBD:SA, RBD:AL)، مقدار آنتی‌بادی خنثی‌کننده‌ی آن‌ها بیش از ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. این مقادیر به ترتیب (۱۵/۸ و ۳۱ و ۷۹/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) هستند. همچنین آنتی‌بادی خنثی‌کننده‌ی مربوط به فرمولاسیون (RBD:AL:SA) بیش از ۲ برابر فرمولاسیون (RBD:SA) و حدود ۴ برابر بیشتر از فرمولاسیون (RBD:AL) نشان داده شده است.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

برای تجزیه و تحلیل پایداری ساختاری واکسن RBD-FC، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ۲۰۰ ns برای RBD-FC با گلیکان و RBD-FC بدون گلیکان انجام شد. RMSD مربوط به RBD-FC فاقد گروه‌های گلیکان و حاوی گروه‌های گلیکان در موقعیت‌های ۲ و ۱۴ در بخش RBD و ۲۷۷ در بخش FC، مقایسه شد (شکل الف).

اثر بارگزاری (LE) آنتی ژن RBD روی فرمول سوسپانسیون الوم (AL:SA) اندازه‌گیری شد تا تأیید شود که افزودن سدیم ژئینات به الوم، جذب آنتی ژن را به الوم کاهش نمی‌دهد. در مقابل، درصد LE آنتی ژن RBD در فرمول (AL:SA)، به‌طور قابل توجهی نسبت به الوم به تنهایی افزایش یافت. درصد LE (Al, Sa) در سه بازه‌ی زمانی (زمان فرموله شده، ۳ ماه و ۶ ماه) اندازه‌گیری شد. در زمان فرموله شده، درصد LE (Al, Sa) و (AlSa) به ترتیب (۸۱/۶۳٪ و ۷۹/۰۷٪ و ۸۳/۳۶٪) و در ۳ ماه LE درصد (Al, Sa) و (AlSa) به ترتیب (۷۳/۸٪ و ۶۰/۸٪ و ۷۵/۶٪) اندازه‌گیری شد. و در نهایت در ۶ ماه، درصد LE (Al, Sa) و (AlSa) به ترتیب (۶۸/۵۴٪ و ۴۶/۴٪ و ۷۰/۹٪) اندازه‌گیری شد (شکل ۵ ب). بنابراین تأیید می‌شود که ادجوانت جدید حاوی الوم و سدیم ژئینات با هم و سدیم ژئینات به تنهایی، تأثیر مثبتی بر جذب آنتی ژن RBD داشته است.

sVNT با توجه به اعتبار سنجی انجام شده توسط کیت پیشگام پزشکی، مقدار آنتی‌بادی خنثی‌کننده‌ی بیشتر از ۲/۵ میکروگرم در



شکل ۶- الف) نمودار RMSD (ب) شعاع چرخش (Rg)، ساختار شماتیک RBD-FC با گلیکان در داخل نمودار قرار گرفته است که در آن RBD و FC توسط لینکر به یکدیگر متصل هستند. همان‌طور که می‌توان استنباط کرد، لینکر ساختار ثانویه خاصی ندارد و با حداقل فاصله ۱ نانومتری از بخش FC تشکیل شده است. از این رو دارای انعطاف کافی است که جهت‌گیری‌های مختلف RBD را دریافت می‌کند و بنابراین RBD به‌طور رایگان برای فعال‌سازی سیستم ایمنی در دسترس است. (ج) پیوندهای هیدروژنی (د) سطح قابل دسترسی با حلال (ه) نوسانات مربع میانگین ریشه (RMSF).

بحث

مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی امکان تولید واکسن‌های پروتئین نوترکیب مبتنی بر RBD مربوط به SARS-COV-2 در مخمر انجام شد. مشخص شد که RBD می‌تواند به‌عنوان یک پروتئین ترشحی در مخمر پیکیا پاستوریس بیان شود و این پروتئین می‌تواند باعث القای آنتی بادی‌های خنثی‌کننده‌ی گسترده و ایمنی محافظتی پایدار در موش‌ها می‌شود. برای افزایش ایمنی زایی پروتئین RBD، نیاز به توسعه‌ی ادجوانت‌های جدید وجود دارد. ادجوانت‌های الوم بیش از ۸۰ سال است که در واکسیناسیون عملی استفاده می‌شود. اما معایبی هم دارد که نمی‌توان آن‌ها را نادیده گرفت. یکی از مشکلات ذکر شده این است که واکسن‌های سنتی جذب شده با الوم، سوسپانسیون‌های حساس به سرما هستند و بنابراین نمی‌توانند لیوفیلیز شوند (Itodo et al. 2016; AbdelAllah et al. 2009). در نتیجه نگهداری و حمل و نقل طولانی مدت آن‌ها مشکل می‌شود. ادجوانت الوم نیز باعث التهاب و واکنش‌های موضعی در محل تزریق می‌شود (Kato et al. 2003). برای این منظور لازم است تا سایر سیستم‌های کمکی از جمله سیستم‌های کمکی طبیعی بررسی شود تا بتواند ایمنی زایی بالایی ایجاد کند و دوز و هزینه را کاهش دهد. برای این منظور، در این مطالعه، پاسخ ایمنی سیستم‌های کمکی مختلف مانند: سدیم الزینات و الوم به تنهایی و ترکیب سدیم الزینات و الوم را بررسی کردیم. سدیم الزینات یک پلی ساکارید طبیعی است که از دیواره‌ی سلولی جلبک قهوه‌ای به شکل صمغ استخراج می‌شود که به‌طور کلی غیر سمی و غیر تحریک‌کننده است. این یک پلیمر زیست تخریب‌پذیر است که در هنگام مصرف باعث ایجاد سمیت نمی‌شود و پلیمر مناسبی برای استفاده در ساخت واکسن می‌باشد. سدیم الزینات به‌عنوان یک ماده‌ی غذایی و دارویی بی‌خطر توسط FDA شناخته شده است. در این مطالعه، پروتئین‌های RBD در ۳ نوع سیستم فرمولاسیون شامل RBD:AL:SA، RBD:SA، RBD:AL از نظر پاسخ ایمنی در داخل بدن مورد ارزیابی قرار گرفته اند. نتایج نشان داد که فرمول RBD:AL:SA دارای بالاترین سطح IgG در مقایسه با فرمول RBD:AL و RBD:SA است (شکل ۳). ترکیب الوم و سدیم

RMSD در سیستم گلیکوزیله در حدود 50 ns تثبیت می‌شود در حالی که این زمان برای ساختار غیر گلیکوزیله به 40 ns کوتاه می‌شود. این ممکن است به دلیل اثر گلیکان در معرض حلال باشد. هر دو ساختار به اندازه‌ی کافی برای بقیه شبیه‌سازی پایدار هستند که پذیرش کلی شبیه‌سازی را نشان می‌دهد. چرخش شعاع (Rg) برای هر دو ساختار از ۴/۳ نانومتر شروع می‌شود و برای بقیه مسیردینامیک ملکولی (MD) به ۲/۸ نانومتر کاهش می‌یابد. Rg الگوی مشابه RMSD را نشان داد در حالی که در اینجا می‌توان استنباط کرد که لینکر توسعه یافته عامل تعیین کننده است و هر دو RBD و FC را نگه می‌دارد تا در طول شبیه سازی روی یکدیگر فرو نریزند (شکل ۶ ب).

تجزیه و تحلیل پیوند هیدروژنی نشان داد که به‌طور متوسط حضور ۲۲۳ پیوند هیدروژنی در هر دو سازه، ممکن است به دلیل پوسته‌ی هیدراتاسیون در معرض مشابه باشد، که نشان دهنده‌ی فولدینگ مشابه است (شکل ۶ ج).

سطح قابل دسترس حلال (SASA) ناحیه‌ای از سطح پروتئین است که در دسترس حلال است. بنابراین، مقدار SASA برای دو ساختار RBD-FC با گلیکان و RBD-FC بدون گلیکان محاسبه شد و نتایج به صورت نمودار در (شکل ۶ د) نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان SASA در ساختار RBD-FC با گلیکان بیشتر از ساختار RBD-FC بدون گلیکان بوده و ۱۵ درصد افزایش دارد. به‌طوری که در RBD-FC با گلیکان این مقدار برابر با ۲۸۰ نانومتر و در RBD-FC بدون گلیکان برابر با ۲۴۰ نانومتر است و این افزایش ساختار RBD-FC با گلیکان به دلیل وجود ۳ زنجیره گلیکان است و نشان دهنده‌ی ساختار بازتر و پراکنده‌تری باشد.

ریشه میانگین نوسان مربع (RMSF) برای اسیدهای آمینه محاسبه شد و میانگین نوسان در اسیدهای آمینه‌ی مدل سازه‌ی RBD-FC بدون گلیکان و با گلیکان را با حداکثر نوسانات در انتهای N و C و قسمت FC نشان داد. همان‌طور که در شکل (شکل ۶ ه) مشاهده می‌شود، میزان نوسانات اسیدهای آمینه در ساختار RBD-FC با گلیکان بیشتر از ساختار RBD-FC بدون گلیکان است. لینکر، نوسانات محدودی به دلیل وجود اسیدهای آمینه‌ی متعدد پرولین دارد (یعنی ۹ اسید آمینه‌ی پرولین در ۲۷ اسید آمینه‌ی لینکر).

در این مطالعه شبیه سازی‌های دینامیک مولکولی برای RBD-FC با گلیکان و RBD-FC بدون گلیکان به منظور بررسی و اعتبار سنجی تفاوت‌ها در ساختارها انجام شد. لاو و همکاران (Park et al. 2019) به این نتیجه رسیدند که MD قادر است دو مدل مشابه را از نظر کیفیت و پایداری متمایز کند. شبیه‌سازی MD برای به دست آوردن اطلاعات دقیق در مورد اثر فشار بالا بر پروتئین و اشکارسازی شباهت‌ها و تفاوت‌های بین مدل‌های پروتئینی در دماها و فشارهای مختلف استفاده می‌شود (Li and Hi 2009; McCarthy and Grigera 2006). دینامیک پروتئین برای توضیح رابطه بین ساختار و عملکرد مورد مطالعه قرار گرفته است (Medvedev et al. 2014). در این مطالعه، مقایسه هر دو سازه RBD-FC بدون گلیکان و با گلیکان بهبود جزئی پایداری سازه و معماری سازه را در ساختار RBD-FC با گلیکان نشان داد. با این حال، تفاوت معنی‌داری بین این دو ساختار وجود نداشت. پایداری پروتئین را می‌توان با استفاده از مطالعه MD و با ارزیابی RMSD ساختار پروتئین تجزیه و تحلیل کرد (Hollingsworth and Dror 2018; Pikkemaat et al. 2002). بر اساس نتایج شبیه‌سازی ارائه شده در شکل (۶)، هر دو ساختار مقداری افزایش در مقادیر RMSD را در طول شبیه‌سازی نشان دادند. مقادیر بالای RMSD نشان دهنده تغییرات ساختاری در طول شبیه‌سازی است که می‌توان از آن برای شناسایی کیفیت ساختار استفاده کرد (Park et al. 2019). مقدار RMSD ساختار RBD-FC بدون گلیکان تا ۳/۲ نانومتر تا ۴۰ نانو ثانیه از شبیه‌سازی افزایش می‌یابد. RMSD سازه پس از ۴۰ نانو ثانیه از شبیه‌سازی پایدار بود. نتایج ما نشان داد که ساختار RBD-FC بدون گلیکان، تغییرات ساختاری جزئی را در طول شبیه‌سازی MD همان‌طور که در شکل (۶) نشان داده شده است تحمل کرد. افزایش ارزش RMSD در هر دو ساختار به دلیل افزایش حرکات بین اتم‌ها است. بنابراین نشان داده شده است که ساختارهای RBD-FC با گلیکان دارای ثبات نسبی ساختاری بهتری نسبت به RBD-FC بدون گلیکان هستند. علاوه بر RMSD، تجزیه و تحلیل شعاع چرخش و نوسانات مربع میانگین ریشه (RMSF) و سطح قابل دسترس حلال (SASA) و تجزیه و تحلیل پیوند هیدروژنی نیز انجام شد. با توجه به نتایج به دست آمده، مقدار شعاع چرخش تا ۲/۷

ژئینات به عنوان ادجوانت، از تخریب آنتی ژن داخل بدن جلوگیری می‌کند و آن را حفظ می‌کند. بنابراین قدرت واکنش را افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ای که بر روی واکنش هپاتیت B انجام شد، استفاده از سدیم ژئینات به عنوان یک سیستم کمکی طبیعی، قدرت ایمنی زایی واکنش هپاتیت B را افزایش داد (AbdelAllah et al. 2016).

کارایی جذب واکنش ادجوانت الموم یکی از پارامترهای دیگری است که باید مورد ارزیابی قرار گیرد. ارزیابی جذب آنتی ژن به ادجوانت‌های الومینیوم قبل از تجویز انجام می‌شود زیرا اثر بارگزاری در افزایش ایمنی‌زایی و جلوگیری از تخریب سریع آنتی ژن پس از تجویز ضروری است. سرعت جذب یکی از پارامترهای ارزیابی اثربخشی واکنش است. در این مطالعه، ترکیب ادجوانت‌های الومینیوم و سدیم ژئینات منجر به بارگزاری مؤثر آنتی ژن در فرمولاسیون واکنش شد و بالاترین کارایی جذب و بارگزاری را نشان داد، بنابراین به عنوان ایمنی‌زا ترین فرمولاسیون تایید شد. از سوی دیگر، ادجوانت سدیم ژئینات اثر بارگزاری بیشتری را در مقایسه با ادجوانت الموم نشان داد. از این رو می‌توان آن را به عنوان جایگزینی برای الموم ادجوانت معرفی کرد.

در این مطالعه، سه گروه موش با دوز ۱۰ میکروگرم آنتی ژن RBD کونژوگه با الموم یا سدیم ژئینات یا ترکیبی از الموم و سدیم ژئینات به صورت زیر جلدی واکنش شدند. بر اساس ارزیابی‌های انجام شده در بین این گروه از موش‌ها، فرمول RBD:SA:AL سطح IgG بالاتری نسبت به دو فرمولاسیون دیگر نشان داد. برای ارزیابی ویژگی آنتی بادی‌های القاء شده در سرم موش‌های ایمن شده، sVNT انجام شد. از آنجایی که الایزای مستقیم RBD قادر به تشخیص بین آنتی بادی‌های اتصالی کل و آنتی بادی‌های خنثی کننده نیست، بنابراین استفاده از sVNT مبتنی بر RBD روش مناسبی برای ارزیابی آنتی بادی‌های خنثی کننده مبتنی بر RBD است. با توجه به ارزیابی sVNT مربوط به RBD فرموله شده با ترکیب سدیم ژئینات و الموم یا سدیم ژئینات و الموم به تنهایی، مقدار آنتی بادی خنثی کننده فرمولاسیون‌ها به ترتیب ۷۹/۲ و ۳۱ و ۱۵/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. در بین این ۳ فرمول، میزان آنتی بادی خنثی کننده فرمول RBD:SA:AL بیشتر از دو فرمولاسیون دیگر است.

کونژوگه با PEG، به این نتیجه رسید که میزان SASA در انسولین کونژوگه نسبت به انسولین آزاد کاهش یافته است و این کاهش در سطح دسترسی پروتئین، باعث محافظت از پروتئین در برابر تخریب آنزیمی و کاهش ایمنی زایی آن می‌شود. پیوندهای هیدروژنی در چین خوردگی پروتئین و ساختار پروتئین مهم هستند. این پیوندها در شکل‌گیری ساختار ثانویه پروتئین، که شامل ماریچ‌های آلفا و رشته‌های بتا است، حیاتی هستند. بر اساس ارزیابی‌ها، تعداد پیوندهای هیدروژنی در هر دو مدل با میانگین ۲۲۳ یکسان است که ممکن است به دلیل پوسته هیدراتاسیون در معرض مشابه باشد که باز هم چین خوردگی مشابه را نشان می‌دهد و به همین ترتیب، ارزیابی پایداری پیوندهای هیدروژنی در هر دو مدل نشان داد که پایداری در RBD-FC با گلیکان بیشتر از RBD-FC بدون گلیکان است.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور خلاصه، RBD نو ترکیب به‌عنوان یک واکسن کاندید علیه SARS-COV-2 با یک روش القایی کارآمد در مخمر پیکیا پاستوریس تولید شد. مطالعه انجام شده یک ادجوانت طبیعی جدید برای واکسن مبتنی بر RBD معرفی می‌کند. سدیم الزینات به تنهایی یا در ترکیب با هیدروکسید آلومینیوم به‌عنوان یک ادجوانت طبیعی ایمن، غیر سمی و ایمنی‌زا می‌تواند در مقایسه با ادجوانت الوم در برابر آنتی ژن RBD پاسخ هومورال موثرتری را نشان دهد. RBD در ترکیب با سدیم الزینات و الوم (SA:AL) تأثیر زیادی در تولید آنتی بادی‌های خنثی کننده نشان داد. از آنجایی که آزمایش خنثی‌سازی ویروس جایگزین (svNT) انجام شد، نتیجه‌ی مذکور را تأیید می‌کند. در این مطالعه، با معرفی سدیم الزینات به‌عنوان یک ادجوانت طبیعی مؤثر در سیستم واکسن، بستر مناسبی برای بهبود سیستم واکسن مبتنی بر زیرواحد در اختیار محققان قرار می‌گیرد. دینامیک مولکولی سازه RBD-FC ترکیب کلی و نقش لینکر را در حفظ فاصله‌ی بین آن‌ها نشان داد.

نانومتر در زمان باقی‌مانده شبیه‌سازی در هر دو سازه کاهش یافت. توزیع اجزای یک جسم حول یک محور و فشرده‌سازی ساختار پروتئین، که باز شدن و دناتوره شدن پروتئین را نشان می‌دهد توسط (Rg) توضیح داده شده است. Galzitskaya و Garbuzynskiy پیشنهاد کردند که پروتئین‌هایی با ارزش شعاع چرخش زیاد فشرده‌تر هستند (۳۶). نتایج نشان داد که انعطاف پذیری در هر دو سازه تقریباً یکسان است. برای درک بیشتر تغییرات ساختاری و انعطاف پذیری ساختاری در هر دو پروتئین، RMSF نیز برای بررسی نوسانات هر اسید آمینه در طول زمان شبیه‌سازی اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل RMSF نشان داد که میزان نوسانات در هر دو ساختار در نواحی N ترمینال و FC و C ترمینال بیشتر است و به‌طور کلی، میزان نوسانات در ساختار RBD-FC با گلیکان بیشتر از ساختار RBD-FC بدون گلیکان است. با توجه به مطالعات انجام شده، گفته می‌شود که اسیدهای آمینه موجود در نواحی داخلی ساختارهای پروتئینی مقادیر RMSF پایینی را نشان می‌دهند، اما اسیدهای آمینه‌ی واقع در سطح ناحیه‌ی پروتئین و لوپ دارای مقادیر RMSF بالاتری هستند (۳۷). مقدار SASA برای دو ساختار RBD-FC با گلیکان و RBD-FC بدون گلیکان محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد که میزان SASA در ساختار RBD-FC با گلیکان بیشتر از ساختار RBD-FC بدون گلیکان بوده و ۱۵ درصد افزایش دارد. این افزایش در ساختار RBD-FC با گلیکان به دلیل وجود ۳ زنجیره‌ی گلیکان است و نشان دهنده‌ی ساختار بازتر و پراکنده‌تر است و افزایش سطح ممکن است از یک طرف در تحریک سیستم ایمنی و از طرف دیگر در سایه اندازی اسیدهای آمینه‌ی متقابل مهم باشد. از طرفی میزان SASA در هر دو مدل کاهش یافت که می‌تواند نتیجه‌ی خوبی باشد زیرا مقدار کمتر SASA نشان دهنده‌ی کاهش سطح پروتئین قابل دسترس در حلال است و این می‌تواند پروتئین را در برابر پروتئولیز محافظت کند. در مطالعه‌ی با مقایسه‌ی میزان SASA بین دو مدل انسولین آزاد و انسولین

منابع

AbdelAllah NH, Abdeltawab NF, Boseila AA, Amin MA (2016) Chitosan and sodium alginate combinations are alternative, efficient, and safe natural adjuvant systems for

hepatitis B vaccine in mouse model. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E (2015) GROMACS: High performance

- molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1:19-25.
- Baweja M, Singh PK, Sadaf A, Tiwari R, Nain L, Khare SK, Shukla P (2017) Cost effective characterization process and molecular dynamic simulation of detergent compatible alkaline protease from *Bacillus pumilus* strain MP27. *Process Biochemistry* 58:199-203.
- Borges O, Silva M, de Sousa A, Borchard G, (2008) Junginger HE, Cordeiro-da-Silva A Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen. *International immunopharmacology* 8:1773-80.
- Colovos C, Yeates TO (1993) Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein science*. 2:1511-9.
- Darvish M, Moosavi-Nejad Z, Siadat SOR, Fatemi F, Khatibi A (2023) Enhancing neutralizing antibodies against receptor binding domain of SARS-CoV-2 by a safe natural adjuvant system. *Virus Research* 326:199047.
- Dobakhti F, Naghibi T, Taghikhani M, Ajdary S, Rafinejad A, Bayati K, Rafiei S, Rafiee-Tehrani M (2009) Adjuvanticity effect of sodium alginate on subcutaneously injected BCG in BALB/c mice. *Microbes and infection* 11:296-301.
- Du L, Zhao G, He Y, Guo Y, Zheng B-J, Jiang S, et al. (2007) Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces long-term protective immunity in an animal model. *Vaccine* 25:2832-8.
- Galzitskaya OV, Garbuzynskiy SO (2016) Entropy capacity determines protein folding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 63:144-54.
- He Y, Li J, Li W, Lustigman S, Farzan M, Jiang S (2006) Cross-neutralization of human and palm civet severe acute respiratory syndrome coronaviruses by antibodies targeting the receptor-binding domain of spike protein. *The Journal of Immunology* 176:6085-92.
- He Y, Zhou Y, Liu S, Kou Z, Li W, Farzan M, et al. (2004) Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine. *Biochemical and biophysical research communications* 324:773-81.
- Hollingsworth S, Dror R. *Molecular dynamics simulation for all*. *Neu-ron* 99: 1129-1143. 2018.
- Itodo A, Umoh J, Adekeye J, Odugbo M, Haruna G, Sugun M (2009) Field trial of sodium alginate-adsorbed *Clostridium perfringens* types C and D toxoid against clostridial enterotoxemia in sheep. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 64:2.
- Kato Y, Onishi H, Machida Y (2003) Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 4:303-9.
- Leary SL, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, et al. editors. *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition* 2013: American Veterinary Medical Association Schaumburg, IL.
- Li D, He X (2009) Desiccation induced structural alterations in a 66-amino acid fragment of an anhydrobiotic nematode late embryogenesis abundant (LEA) protein. *Biomacromolecules* 10:1469-77.
- Ma X, Zou F, Yu F, Li R, Yuan Y, Zhang Y, et al (2020) Nanoparticle vaccines based on the receptor binding domain (RBD) and heptad repeat (HR) of SARS-CoV-2 elicit robust protective immune responses. *Immunity*. 53:1315-30. e9.
- McCarthy AN, Grigera JR (2006) Effect of pressure on the conformation of proteins. A molecular dynamics simulation of lysozyme. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 24:254-61.
- Medvedev KE, Alesasov NA, Vorobjev YN, Boldyreva EV, Kolchanov NA, Afonnikov DA (2014) Molecular dynamics simulations of the Nip7 proteins from the marine deep-and shallow-water *Pyrococcus* species. *BMC Structural Biology* 14:1-21.
- Park S-J, Lee J, Qi Y, Kern NR, Lee HS, Jo S, et al. (2019) CHARMM-GUI Glycan Modeler for modeling and simulation of carbohydrates and glycoconjugates. *Glycobiology* 29:320-31.
- Pikkemaat MG, Linssen AB, Berendsen HJ, Janssen DB (2002) Molecular dynamics simulations as a tool for improving protein stability. *Protein engineering* 15:185-92.
- Raghav A, Ahmad J, Alam K (2017) Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin and its effect on antibodies profile in patients with diabetes mellitus. *PLoS One* 12:e0176970.
- Sanyal D, Chowdhury S, Uversky VN, Chattopadhyay K (2020) An exploration of the SARS-CoV-2 spike receptor binding domain (RBD)—a complex palette of evolutionary and structural features. *BioRxiv* 2020.05. 31.126615.
- Sargsyan K, Grauffel C, Lim C (2017) How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. *Journal of chemical theory and computation*. 13:1518-24.
- Scherließ R, Buske S, Young K, Weber B, Rades T, Hook S (2013) In vivo evaluation of chitosan as an adjuvant in subcutaneous vaccine formulations. *Vaccine*. 31:4812-9.
- Shah IS, Lovell S, Mehzabeen N, Battaile KP, Tolbert TJ (2017) Structural characterization of the Man5 glycoform of human IgG3 Fc. *Molecular immunology* 92:28-37.
- Sippl MJ (1993) Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 17:355-62.
- Teng S, Sobitan A, Rhoades R, Liu D, Tang Q (2021) Systemic effects of missense mutations on SARS-CoV-2 spike glycoprotein stability and receptor-binding affinity. *Briefings in bioinformatics* 22:1239-53.
- Vasiliev YM (2015) Chitosan-based vaccine adjuvants: incomplete characterization complicates preclinical and clinical evaluation. *Expert review of vaccines*. 14:37-53.
- Wang N, Shang J, Jiang S, Du L (2020) Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses. *Frontiers in microbiology* 11:298.
- Woo H, Park S-J, Choi YK, Park T, Tanveer M, Cao Y, et al. (2020) Developing a fully glycosylated full-length SARS-CoV-2 spike protein model in a viral membrane. *The journal of physical chemistry B* 124:7128-37.
- Xia S, Liu M, Wang C, Xu W, Lan Q, Feng S, et al. (2020) Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high

capacity to mediate membrane fusion. *Cell research*. 30:343-55.

Yang C, Lu D, Liu Z (2011) How PEGylation enhances the stability and potency of insulin: a molecular dynamics simulation. *Biochemistry* 50:2585-93.

Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods* 12:7-8.

Zang J, Zhu Y, Zhou Y, Gu C, Yi Y, Wang S, et al. (2021) Yeast-produced RBD-based recombinant protein vaccines elicit broadly neutralizing antibodies and durable protective immunity against SARS-CoV-2 infection. *Cell Discovery*. 7:71.

Zhang S, Gao C, Das T, Luo S, Tang H, Yao X, et al. (2022) The spike-ACE2 binding assay: An in vitro platform for evaluating vaccination efficacy and for screening SARS-CoV-2 inhibitors and neutralizing

antibodies. *Journal of Immunological Methods* 503:113244.

Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *nature*. 579:270-3.

Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. (2020) Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *BioRxiv*. 2020.01. 22.914952.

Zumla A, Chan JF, Azhar EI, Hui DS, Yuen K-Y (2016) Coronaviruses-drug discovery and therapeutic options. *Nature reviews Drug discovery*. 15:327-47.