مقایسه اثر ایمنی زایی نمک‌های آلومینیوم به عنوان ادجوانت در فرمولاسیون واکسن هپاتیت- ب نوترکیب

محمد رضا فاضلی[۱]
محمد عباسپور[۱]
محمد حسین قهرمانی[۲]
مهرداد علیمیان[۳]
هوشمند ایلکا[۳]
حسین جمالی فر[۱]
سعید آزادی[۳]
ابراهیم عزیزی[۲*]

۱- گروه کنترل دارو وغذا
۲-گروه سم شناسی و دارو شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳-واحد بیوتکنولوژی شرکت تولیدی دارویخش

*نویسنده مسئول، نشانی: تهران، آزمایشگاه تحقیقات مولکولی، گروه داروشناسی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
تلفن و نمابر: ۶۶۹۵۹۱۰۰
Email: aziziebr@tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: نمکهای آلومینیوم متداولترین ادجوانت‌ها در تهیه واکسن‌های انسانی و حیوانی هستند. دو ادجوانت آلومینیوم فسفات و آلومینیوم هیدروکساید با بسیاری از آنتی‌ژن‌ها اثرات ایمونوادجوانتی خوبی نشان می‌دهند. این دو نمک ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوتی دارند که هر کدام را برای استفاده با آنتی‌ژن خاصی مناسب می‌کند. آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت ب (HBsAg) اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک فراوانی داشته که با مکانیسم تعویض لیگاند به ادجوانت‌های آلومینیوم اتصال می‌یابد.

روش بررسی: محلول حاوی HBsAg نوترکیب جهت تهیه فرمولاسیونهای مختلف واکسن با ادجوانتهای آلومینیوم هیدروکساید (Alhydrogel) و آلومینیوم فسفات (Adju-Phos) از شرکت دارو پخش تهیه گردید. میزان پروتئین تام محلول به روش BCA، آنتی‌ژنیسیتی به روش الایزا و خلوص پروتئین HBs به روش SDS-PAGE سنجیده شد. در این تحقیق فرمولاسیونهای مختلف تهیه شده در آزمایشگاه از طریق داخل صفاقی به موشهای Balb/C تجویز گردید. پس از ۲۸ روز خون‌گیری از قلب حیوانات و تهیه سرم، تعیین تیتر آنتی بادی ضد HbsAg به روش الایزا با استفاده از کیت مربوطه انجام شد.

یافته‌ها: این پژوهش نشان می‌دهد که در حیوانات مورد آزمایش در مقایسه با گروه کنترل منفی (محلول بدون آنتی ژن)، واکسن فرموله شده با ادجوانت آلومینیوم فسفات (Adju-Phos) نسبت به ادجوانت آلومینیوم هیدروکساید (Alhydrogel) و حتی واکسن Engerix موجود در بازار داروئی اثر ایمنی زایی بیشتری ایجاد می‌نماید.

نتیجه‌گیری: اگرچه نتایج بیانگر توانائی ایمنی‌زائی بیشتر واکسن فرموله شده با ادجوانت آلومینیوم فسفات می‌باشد ولی آزمایشات تائیدی بعدی جهت ارزیابیهای بیولوژیک لازم از نظر سودمندی – عوارض و همچنین پایداری داروئی و در نهایت امکان تولید و عرضه این فرمولاسیون جدید به عنوان واکسن ضد هپاتیت ضروری میباشد.

کلمات کلیدی: واکسن هپاتیت، ادجوانتهای آلومینیوم، ایمنی‌زائی، فرمولاسیون

مقدمه

ادجوانت‌ها موادی هستند که به بروز پاسخ ایمنی هومورال و یا سلولار در بدن کمک نموده و یا آنرا افزایش می‌دهند.[۱] به عبارت دیگر ادجوانت‌ها ایمونوژنیسیته ایمونوژن‌ها را افزایش می‌دهند.[۲] نمک‌های آلومینیوم بیش از ۷۰ سال است که در واکسن‌های انسانی به عنوان ادجوانت استفاده می‌شوند.[۳] زیرا این ادجوانت‌ها می‌توانند سبب القاء سریع تولید آنتی‌بادی، افزایش تیتر آنتی‌بادی، طولانی شدن زمان تولید آنتی‌بادی[۴] و کاهش تعداد دوز تزریق واکسن و همچنین کاهش مقدار آنتی‌ژن پروتئینی لازم برای هر دوز واکسن[۵] شوند. برای

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

مثال مطالعات نشان داده است که تزریق HBsAg فرموله شده با ادجوانت‌های آلومینیوم، تیتر آنتی‌بادی بیشتری را نسبت به واکسن حاوی HBsAg تنها، ایجاد می‌کند.[۶و۷] متداولترین نمک‌های آلومینیومی که بعنوان ادجوانت به کار می‌روند، آلومینیوم هیدروکساید و آلومینیوم فسفات می‌باشند. این دو ترکیب به صورت تجاری در گریدهای کلینیکال با نام‌های Alhydrogel ® و Adju- Phos ® در دسترس هستند. این ژلها قادرند آنتی‌ژن‌های پروتئینی موجود در محلولهای آبی را جذب کنند.[۸] آلومینیوم هیدروکساید در واقع آلومینیوم اکسی‌هیدروکساید ((AlO(OH) است که سطح زیادی دارد و pH ایزوالکتریک آن ۱۱ است. این ادجوانت برای جذب پروتئین‌هایی با بار سطحی منفی (پروتئین‌های اسیدی) مناسب است. در مقابل آلومینیوم فسفات در واقع آلومینیوم هیدروکسی فسفات بی‌شکل (Al(OH)m(PO4)n همراه با کمی سولفات است که مقدار سولفات به شرایط تولید ژل بستگی دارد. نسبت مولی‌بین آلومینیوم و فسفات در انواع مختلف آلومینیوم هیدروکسی فسفات آمورف تولید شده، متفاوت است. به همین دلیل PH ایزوالکتریک انواع مختلف ژل آلومینیوم فسفات آمورف تولید شده، متفاوت بوده و بین پنج تا هفت می‌باشد. بنابراین این ژلها، در pH خنثی بار سطحی منفی داشته و پروتئین های بار سطحی مثبت (پروتئین‌های بازی) را بخوبی جذب می‌کند.[۶و۱۲-۸] در این مطالعه دو نوع ادجوانت Adju-PhoS و Alhydrogel در فرمولاسیون واکسن هپاتیت- ب استفاده شد. نهایتا" ایمنی‌زایی واکسن‌های فرموله شده با توجه بهGMT و درصد تغییرات سرمی (Seroconversion) مقایسه گردید.

روش بررسی

پروتئین نوترکیب HBsAg از شرکت دارو پخش واحد بیوتکنولوژی تهیه گردید. مقدار HBsAg به روش الایزا با استفاده از کیت Hepanostika HBsAg uni-Form ll از شرکت Biomeurix و مقدار توتال پروتئین محلول به روشBCA با کیت از شرکت Pierce تعیین شد. برای تعیین خلوص محلول حاوی HBsAg از روش الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل‌آمید با غلظت ۱۵٪ در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد. سپس ژل به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید.

ژل‌های Adju-Phos و Alhydrogel از شرکت Brenntay Bioector دانمارک خریداری شد. غلظت ادجوانت بر اساس مقدار آلومینیوم موجود در آن تعیین گردید. برای انجام تست های حیوانی از موش Balb/C ماده با سن شش تا چهار هفته استفاده شد. حیوانات از شرکت دارو پخش تهیه گردید. فرمولاسیون واکسن با هر نوع ادجوانت به گونه‌ای انجام شد که هر دوز واکسن حاوی ۲۰ میکروگرم HBsAg و ۰/۵ میلی‌گرم آلومینیوم باشد. سپس رقت‌های دیگر از واکسن اولیه تهیه می‌شود. جهت فرمولاسیون واکسن با ژل Alhydrogel، برای تهیه ۳۰ میلی‌لیتر از واکسن ابتداء ۱/۵ میلی لیتر از ژل Alhydrogel را در ظرف استریل ریخته سپس شش میلی‌لیتر محلول غلیظ آنتی ژن را اضافه کرده و به مدت پنج دقیقه روی شیکر با سرعت ۲۵۰ rpm قرار می‌دهیم. سپس ۲۲/۵ میلی‌لیتر بافر فرمولاسیون به ظرف اضافه کرده آن را دوباره به مدت نیم ساعت روی شیکر با سرعت ۲۵۰rpm قرارمی‌دهیم.

جهت فرمولاسیون واکسن با ژل Adju-Phos، برای تهیه ۳۰ میلی‌لیتر از واکسن ابتداء ۳/۴ میلی لیتر از ژل Adju-Phos را در ظرف استریل ریخته سپس شش میلی‌لیتر محلول غلیظ آنتی‌ژن را اضافه کرده و به مدت پنج دقیقه روی شیکر با سرعت ۲۵۰rpm قرارمی‌دهیم. سپس۲۰/۶ میلی‌لیتر بافر فرمولاسیون به ظرف اضافه کرده آن را دوباره به مدت نیم ساعت روی شیکر با سرعت ۲۵۰ rpm قرارمی‌دهیم. ضمنا از هر دو واکسن رقت‌های ۱:۴ و۱:۱۶ و۱:۳۲ و۱:۶۴ و ۱:۱۲۸ تهیه گردید. تعیین درصد جذب آنتی‌ژن به ادجوانتها در واکسن‌های فرموله شده ابتداء ۱/۵ میلی‌لیتر از واکسن‌های تهیه شده را (بدون رقیق سازی) داخل ویال اپندورف ریخته به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌کنیم. سپس محلول رویی را جدا کرده از آن رقت های ۱:۲۰و ۱:۲۰۰ تهیه شده نهایتا مقدار HBsAg جذب شده با فرمول زیر تعیین گردید.[۱۳]

مقدار آنتی‌ژن اولیه / ۱۰۰ ×(مقدار آنتی ژن در محلول آبی – مقدار آنتی ژن اولیه)= درصد جذب

آزمایشات حیوانی: موش‌ها را به گروه‌های ۱۵ تایی تقسیم کرده به هر گروه یک رقت از واکسن فرموله شده و واکسن Engrix و محلول بافر–ادجوانت تزریق شد. بعد از گذشت ۲۸ روز از تزریق از موش‌ها خون‌گیری انجام شد. نهایتا سرم جدا شده و مقدار آنتی بادی

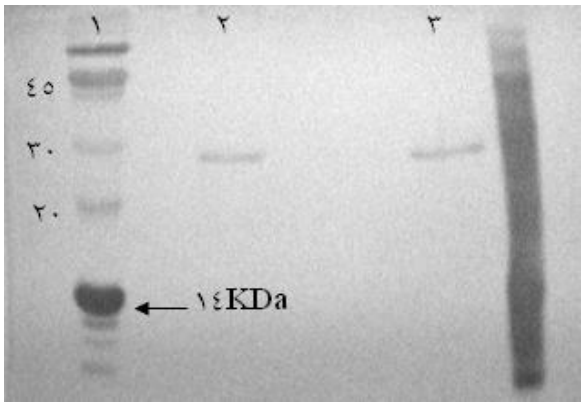
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-23]

ضد HBsAg در آنها به روش الایـزا بـا اسـتفاده از کیـت ETT-AB-AUK-3از شرکت Diasorine تعیین گردید.

یافته‌ها

نتیجه آنالیز محلول HBsAg: توتال پروتئین محلول به روش BCA برابر ۷۶/۶ ug/ml بدست آمد و مقدار آنتی ژن برابر ۷۴/۶ug/ml بدست آمد. با این تفاسیر نسبت توتال پروتیئن به توتال آنتی‌ژن برابر ۱/۰۲ می‌باشد. نتایج SDS-PAGE در شکل شماره ۱ آمده است. یک تک باند HBsAg بین باندهای ۲۰/۱KDa و ۳۰ KDa دیده می‌شود.

مقدار HBsAg جذب شده به ادجوانتها در واکسن‌های فرموله شده برای واکسن با ادجوانت Adju-Phos میزان جذب برابر ۹۵/۹٪ و برای واکسن با ادجوانت Alhydrogel برای ۹۹/۹۹٪ بدست آمد.تیتر آنتی بادی ضد HBsAg حاصل از تزریق واکسن های فرموله شده نتایج تیتر آنتی‌بادی ضد HBsAg بر اساس GMT و درصد Seroconversion (حالتی که تیتر آنتی‌بادی ضد HBsAg بیشتر از۱mIU/ml باشد.) و درصد Seroprotection (حالتی که تیترآنتی‌بادی ضد HBsAg بیشتر از۱۰ mIU/ml باشد.) و تعداد موارد عدم پاسخ بیان شده است. نتایج در جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۱ آمده است. تیتر آنتی‌بادی ضد HBsAg حاصل از تزریق محلول ادجوانت- بافر به یک گروه پنج تایی موش Balb/C بعنوان کنترل منفی یک میلی‌لیتر از محلول ادجوانت – بافر تزریق شد که در تمام موارد تیتر آنتی‌بادی ضد HBsAg صفر بدست آمد.



شکل-۱: SDS-PAGE پروتئین HBs .

ستون -۱: حاوی مارکر وزن ملکولی (۱۴-۹۷ کیلودالتون)

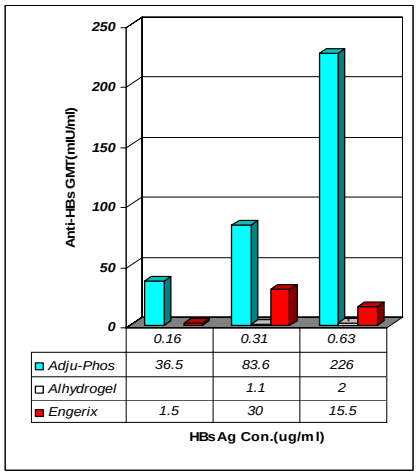
ستون- ۲و۳: نمونه های مختلف تخلیص شده پروتئین HBs

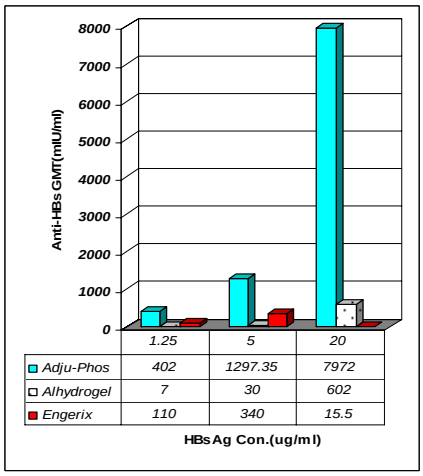
جدول-۱: مقایسه اثر ایمنی زایی ادجوانت های آلومینیوم

Adjuvant Type	Dilution	Number of Animals	SC1%	SP2%	Negative Response	GMT3 (mIU/ml)
Adju-Phos	Direct	15	100	100	0	7972.025
	1:4	15	100	100	0	1297.35
	1:16	15	100	100	0	402.18
	1:32	15	100	100	0	226.08
	1:64	15	80	73.33	3	83.6
	1:128	15	93.33	80	1	36.47
Alhydrogel	Direct	15	100	100	0	601.8
	1:4	15	93.33	80	1	29.29
	1:16	15	66.66	33.33	5	6.8
	1:32	15	13.33	13.33	11	1.93
	1:64	15	0.66	0	14	1.15
Engerix	Direct	15	100	100	0	1286.798
	1:4	15	100	100	0	339.53
	1:16	15	100	100	0	110.25
	1:32	15	66.66	40	5	15.56
	1:64	15	73.33	46.67	4	30
	1:128	15	20	6.67	12	1.45

Note: [1]Seroconversion, [2]Seroprotection, [3]Geometric Mean Titer

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





نمودار-۱: مقایسه اثر ادجوانت‌ها در غلظت های مختلف HBsAg. به ۶ گروه از موشهای Balb/C مقدارml ۱ از واکسن فرموله شده و رقتهای ۱:۴-۱:۱۶-۱:۳۲-۱:۶۴و۱:۱۲۸ به طریق داخل صفاقی تزریق گردید. نتایج بر اساس GMT بیان شده است. برای واکسن با ادجوانت Alhydrogel رقت ۱:۱۲۸ مطالعه نشد.

بحث

در این پژوهش قدرت ایمنی‌زایی نمکهای آلومینیوم بعنوان آجوانت در فرمولاسیون واکسن هپاتیت ب نوترکیب در موش Balb/C مطالعه گردید. این ادجوانت‌ها می‌توانند سبب القاء سریع تولید آنتی‌بادی، افزایش تیتر آنتی‌بادی، طولانی شدن زمان تولید آنتی‌بادی[۴] و کاهش تعداد دوز تزریق واکسن و همچنین کاهش مقدار آنتی‌ژن پروتئینی لازم برای هر دوز واکسن[۵] شوند. برای مثال مطالعات نشان داده است که تزریق HBsAg فرموله شده با ادجوانت‌های آلومینیوم، تیتر آنتی‌بادی بیشتری را نسبت به واکسن حاوی HBsAg تنها، ایجاد می‌کند[۶و۷] نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که میزان جذب پروتئین HBs به ادجوانت آلومینیوم هیدروکساید (ژل Alhydrogel) نسبت به ادجوانت آلومینیوم فسفات (Adju-Phos)بیشتر است. این نتیجه با یافته‌های دیگران نیز همخوانی دارد[۴و۱۱و۱۴] که با توجه به دلایل زیر قابل پیش‌بینی و توجیه هستند:

۱- اندازه ذره‌ای ژل Alhydrogel، ۳/۰۷ میکرون است حال آنکه اندازه ذره‌ای ژل Adju-Phos، ۴/۲۶ میکرون است بنابراین ژل Alhydrgel سطح جذب بیشتر یا به عبارت دیگر ظرفیت جذبی بیشتر دارد.[۹] ۲-در مورد پروتئین‌هایی مانند HBsAg که دارای گروه‌های فسفات هستند جذب پروتئین به ادجوانت آلومینیوم با مکانیسم تعویض لیگاند (Ligand exchenge) بین فسفات آنتی‌ژن و گروههای هیدروکسیل ادجوانت صورت می‌گیرد و گروه فسفات قوی‌تر از گروه هیدروکسیل جذب Al^{3+} می‌شود و لذا در این ادجوانت‌ها گروه فسفات می‌تواند جایگزین گروه هیدروکساید شود. در ژل Alhydrogel به دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل بیشتر نسبت به Adju-Phos میزان برهم کنش «تعویض لیگاند» بیشتر بوده لذا میزان جذب بیشتر خواهد بود.[۴و۱۵]

۳- عامل دیگر وجود نیروهای جاذبه الکتروستاتیک بین ادجوانت Alhydrogel (iep=۱۱) و HBsAg (iep= ۴/۵) درpH=۶/۷ و نیروهای دافعه الکتروستاتیک بین Adju-phos با (iep=۵) و HBsAg درpH=۶/۷ است.[۸و۱۵]

البته باید توجه داشت باز هم درصد بالایی از جذب HBsAg به ادجوانت فسفات را داریم. این نتیجه در یافته های دیگران نیز مشهود است[۶] که این درصد بالا به مکانیسم جذب HBsAg به ادجوانت‌های آلومینیوم مرتبط است که قبلا شرح آن آمد. نتایج تغیرات سرمی و GMT در موش‌ها بعد از تزریق واکسنهای فرموله شده نشان می‌دهد که تمام آنها ایمونوژنیک هستند و موش‌های تزریق شده نسبت به واکسن‌های فرموله شده با ادجوانت‌های آلومینیوم تحمل خوبی نشان دادند. در شدت پاسخ‌های ایمنی (تیتر آنتی‌بادی تولید شده) حاصل

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

ازهر یک از واکسن‌های فرموله شده تفاوت و اختلاف آشکاری دیده می‌شود. واکسن فرموله شده با ادجوانت Adju-Phos تیتر آنتی‌بادی بیشتری را سبب شده است و موارد عدم پاسخ در مورد این ادجوانت نسبت به ادجوانت دیگر به طور قابل ملاحظه‌ای در تمام رقت‌ها کمتر می‌باشد. از سوی دیگر واکسن با ادجوانت Adju-Phos در مقایسه با واکسن‌های استاندارد Engrix نیز پاسخ آنتی‌بادی بیشتر و درصد تغییرات سرمی بهتری را در رقت‌های مختلف نشان داده است (جدول شماره ۱ و نمودارشماره ۱). Su Wang و همکارانش نشان داده‌اند زمانی که IL-2 به آلومینیوم فسفات باند شده و این مجموعه با HBsAg فرموله شود نسبت به زمانی که HBsAg با مجموعهٔ IL-2-Al(OH)3 فرموله شود GMT بالاتری بدست می‌آید.[۶] در مطالعه دیگری نشان داده شده است در حالتی که DNA کد کننده پروتئین HBs همراه با آلومینیوم فسفات فرموله شود تیتر آنتی‌بادی را در مقایسه با واکسن حاوی DNA حدود ۱۰ تا ۱۰۰ برابر افزایش می‌دهد.[۱۶] لذا نتایج دیگران با نتایج بدست آمده در این پژوهش همخوانی دارد. اما در مورد ادجوانت Alhydrogel با کاهش غلظت آنتی‌ژن کاهش پاسخ آنتی‌بادی مشاهده می‌گردد و به طور قابل ملاحظه ای با کاهش غلظت آنتی ژن تعداد موارد عدم پاسخ افزایش می یابد. نکتهٔ قابل توجه دیگر آن است که با وجود جذب بیشتر HBsAg به نمک آلومینیوم هیدروکساید (Alhydrogel) نسبت به نمک آلومینیوم فسفات (Adju-Phos) ایمنی‌زایی آلومینیوم فسفات خیلی بیشتر است. این موضوع حاکی از آن است که جذب کامل HBsAg به ادجوانت در بروز پاسخ آنتی بادی الزامی نبوده و از طرف دیگر احتمالا برای بروز پاسخ ایمنی بالا مقداری HBsAg آزاد لازم است. ادجوانت‌های آلومینیوم پاسخ ایمنی را تا بیش از ۹۰٪ به سمت Th2 سوق می‌دهند که پاسخ‌های Th2 منجر به افزایش میزان آنتی‌بادی‌های در گردش خون و آنتی‌بادی‌های ترشحی از جمله IgE و اینترلوکین‌های ۴ و ۵ و۶ می‌شود.[۲۰-۱۷] IL-4 خود سبب افزایش تولید آنتی‌بادی های IgE و IgG1 شده و عامل رشد و تمایز سلول‌های T به ویژه زیر رده Th2 می‌باشد. این سایتوکاین تمایز سلول‌های T تحریک شده بوسیله آنتی‌ژن را به سلولهای Th2 شدت می‌بخشد.[۱] آزمایشات in vitro نشان داده است که ادجوانت آلومینیوم هیدروکساید در ابتدا با فعال‌سازی منوسیت‌ها سبب تولید سایتوکاین‌هایی مثل IL– 4 می‌شود که اینها به نوبه خود ظهور برخی مولکولها نظیر MHC II، کواستیمولاتورها و ملکولهای چسبنده را در سطح منوسیت، سبب می‌شود. مرفولوژی منوسیت‌ها را به سلولهای دندریتیک تخصص یافته برای عرضه آنتی‌ژن تغییر می‌دهد.[۲۱]

نتیجه‌گیری: جذب پروتئین HBs به آلومینیوم هیدروکساید نسبت به آلومینیوم فسفات کمی بیشتر است. در عین حال GMT برای واکسن با ادجوانت آلومینیوم فسفات نسبت به ادجوانت آلومینیوم هیدروکساید (در تمام رقت‌ها) خیلی بیشتر است لذا جذب کامل HBs به ادجوانت در شدت پاسخ ایمنی اهمیت کمتری دارد.

سه عامل اساسی بر ماهیت و شدت پاسخهای ایمنی اختصاصی موثرند شامل : نوع آنتی ژن، مقدار و راه ورود آن، تعداد و انواع سلولهای کمکی سیستم ایمنی که درقدم اول با آنتی‌ژن وارد واکنش می‌شوند و فعال سازی لنفوسیت‌ها را القا می‌کند و بالاخره ماهیت لنفوسیت‌های پاسخ دهنده[۱]

در مطالعه ما نوع، مقدار و راه ورود آنتی ژن برای تمام موش‌ها یکسان بوده و به نظر می‌رسد نوع ادجوانت، سلولهای کمکی مختلف را به میزان متفاوتی تحریک می‌کنند و نوع سایتوکاین ترشح شده متعاقب این فعال‌سازی، در نوعی از زیر گروه سلولهای T یاریگر اجرایی که نهایتاً در پاسخ به مجموعه ادجوانت– HBsAg تکثیر و تمایز می‌یابند موثر است.

سپاسگزاری: نویسندگان مقاله مراتب تشکر خود را از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و معاونت محترم واحد بیوتکنولوژی شرکت داروپخش و همکاران محترم آن واحد بدلیل حمایتهای همه جانبه و ارزشمند اعلام می‌نمایند.

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

References

۱. لیکتمن پوبر، ایمونولوژی سلولی ملکولی. ترجمه غفوریان کامبیز، خردورز آرش، فروهرالنا. زیر نظر فریدحسینی رضا. ویرایش سوم. تهران: نشر طیب، ۱۳۷۸، صفحات ۲۷۰ تا ۲۹۰.

۲. الی بنیامین، سیدنی سکویتس. چکیده ایمونولوژی. ترجمه دکتر عبدالحسین کیهانی و چاپ دوم. تهران: مؤسسه فرهنگی انتشارات راستان؛ ۱۳۷۸ صفحه ۵۶.

3. Suzanne V. Emerson. Viral Hepatitis. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 2002.
4. Lindblad EB. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol* 2004; 82: 497-505.
5. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. *Vaccine* 1995; 13: 1263-76.
6. Wang S, Liu X, Caulfield MJ. Adjuvant synergy in the response to hepatitis B vaccines. *Vaccine* 2003; 21: 4297-306.
7. Schirmbeck R, Melber K, Mertens T, Reimann J. Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. *J Virol* 1994; 68: 1418-25.
8. Gupta RK. Aluminium compounds as a adjuvants. *Adv Drug Delivery Rew* 1998; 32: 155-72.
9. Michael F Powell and Mark J Newman. A compedium of vaccine adjuvants excipients. In: Vaccine Design. New York: Plenum Press: 1995; p. 135-248.
10. Baylor NW, Egan W, Richman P. Aluminum salts in vaccines-US perspective. *Vaccine* 2002; 20: 18-23.
11. Exposito Raya N, Garcia Diaz A, Carrazana Lopez Y, Quintana Vazquez D, Pichardo Diaz D, Martinez de la Puente N, et al. Preformulation study of the vaccine candidate TAB9 against HIV-1. *Biotechnol Appl Biochem* 2002; 36: 149-53.
12. Rinella JV Jr, White JL, Hem SL. Treatment of aluminium hydroxide adjuvant to optimize the adsorption of basic proteins. *Vaccine* 1996; 14: 298-300.
13. Deml L, Schirmbeck R, Reimann J, Wolf H, Wagner R. Purification and characterization of hepatitis B virus surface antigen particles produced in Drosophila Schneider-2 cells. *J Virol Methods* 1999; 79: 205-17.
14. al-Shakhshir RH, Regnier FE, White JL, Hem SL. Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaceine* 1995; 13; 41-4.
15. Iyer S, Robinett RS, HogenEsch H, Hem SL. Mechanism of adsorption of hepatitis B surface antigen by alumimum hydroxide adjauvant. *Vaccine* 2004; 22: 1475-9.
16. Su Wang et al. Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with calcium-or-Aluminium phosphatete. *Vaceine* 2000; 18: 1227-35.
17. Rimaniol AC, Gras G, Verdier F, Capel F, Grigoriev VB, Porcheray F, et al. Aluminum hydroxide adjuvant induces macrophage differentiation towards a specialized antigen-presenting cell type. *Vaccine* 2004; 22: 3127-35.

۱۸. تفقدی محسن، جعفری محمود رضا، سجادی سید ابوالقاسم (مولفین). آدجونت ها. انتشارات رازی، ۱۳۸۳.

19. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4 or IL-13 mediated signaling. *J Immunol* 1999; 163: 6448-54.
20. Grun JL, Maurer PH. Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous interleukin 1 in proliferative responses. *Cell Immunol* 1989; 121: 134-45.
21. Del Giudice G, Podda A, Rappuoli R. What are the limits of adjuvanticity? *Vaccine* 2001; 20: 38-41.

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

Tehran University Medical Journal; Vol. 64, No.12, Mar 2007: 31-37

Comparison of Immunogenicity of aluminum salts as adjuvant for recombinant hepatitis B vaccine

Fazeli MR[1]
Abbaspour M[1]
Ghahremani MH[2]
Alimian M[3]
Ilka H[3]
Jamalifar H[1]
Azadi S[3]
Azizi E[*2]

1-Department of Food and Drug Control
2-Dept of Pharmacology and Toxicology

Tehran University of Medical Sciences.

3-Biotechnology unit of Darupakhsh Pharmaceutical Company

*Corresponded author, School of Pharmacy, Poursina Ave. Tehran.
Tel/Fax: +98-21-66959100
Email: aziziebr@tums.ac.ir

Abstract

***Background*:** Aluminum salts are common adjuvants in human and animal vaccine preparations. The two adjuvants aluminum phosphate and aluminum hydroxide show acceptable immunoadjuvant properties with many antigens. These two salts have different physicochemical characteristics that make each one suitable for certain antigens. The surface antigen of Hepatitis B (HBsAg) has several antigenic epitopes that bind to aluminum adjuvants by a ligand exchange mechanism. Although HBV vaccines using an aluminum hydroxide adjuvant are available, higher antigenicity is needed for the subgroup of people who do not respond sufficiently to the currently available vaccines.

***Methods*:** A solution of recombinant HBsAg for making different formulations of vaccines with aluminum phosphate (Adju-Phos®) and aluminum hydroxide (Alhydrogel®) adjuvants was obtained from Darupakhsh Pharmaceutical Company. The total protein content, antigenicity, and purity of HBsAg solution were determined using BCA, ELISA, and SDS-PAGE methods, respectively. The different formulations were prepared in the lab and administered i.p. to two test groups of Balb/C mice and a third test group received the Engerix vaccine, which is currently available on the market and uses an aluminum hydroxide adjuvant. The control group of animals received the solution without antigen. After 28 days, heart blood samples were collected and serum was separated to determine the antibody titer against HBsAg using an ELISA kit.

***Results*:** This study shows that the vaccine formulated with aluminum phosphate exerted more immunogenicity than both the aluminum hydroxide laboratory formulation and the Engerix vaccines.

***Conclusion*:** Although the results of our study indicate higher immunogenic properties of the vaccine formulated with the aluminum phosphate adjuvant, complementary experiments are needed to further evaluate the biological properties with respect to effectiveness, adverse effects, product stability and finally possibility for manufacturing and distribution of this new formulation as a Hepatitis B vaccine.

Keywords: Hepatitis B vaccine, Aluminum adjuvants, Immunogenicity, Formulation

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