نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۴۲، بهـار ۱۴۰۱
ص‌ص: ۶۳~۷۰

تهیه نانوبادی برعلیه کرونا ویروس جدید(nCov-2019)

● **سعید زیبائی[۱]، اکبر خراسانی*[۲]، محسن فتحی نجفی[۳]،حمید رضا فرزین[۳]، زهرا مشکات[۴]**

۱-دانشیار موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق ، بخش تحقیق و توسعه فرآورده های بیولوژیک ، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی ، مشهد ،ایران

۲-متخصص میکربولوژی ، موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی ، بخش تحقیق و تولید واکسن تب برفکی ، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی ، ایران

۳-استادیار موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه شمال شرق ، بخش تحقیق و توسعه فرآورده های بیولوژیک ، سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی ، مشهد ،ایران

۴- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی پژوهشکده علوم پایه،مشهد ایران

تاریخ دریافت : فروردین ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش : خرداد ۱۴۰۱
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۲۶۰۲۸۱۳
Email: A.khorasani@rvsri.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ aasrj.2022.126943

چکیده:

ایمنی هومورال در شتربا واسطه نانوبادی انجام می گیرد که منحصر به فرد است تولید نانوبادی بر علیه ویروس و بر علیه گیرنده ویروس می تواند از تکثیر ویروس جلوگیری نماید. ویروس جدید کروناولین باردر شهر ووهان چین پیدا شد که باعث همه گیری درجهان(پاندمی) شده است. ویروس کرونا از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه گردید.برای تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه ویروس کرونا در شترازیک نفر شتر نر بین دوساله استفاده شد .جهت ایمن سازی شتر از۸۰۰ نانوگرم بر ای هر کیلو گرم وزن شتر ویروس کروناهراه با ادجوانت کیتوزان مخلوط و به روش زیر جلدی در چهار نقطه از زیر پوست ناحیه گردن، تزریق گردید. تزریق دوم ۲۱ روز پس از اولین تزریق ، خونگیری و جدا کردن سرم۱۴ روز پس از دومین تزریق (مرحله اول آزمایش)،زمان تزریق سوم ۳۴ روز پس از دومین تزریق تزریق چهارم ۴۰ روز پس از سومین تزریق انجام شد. قبل از تزریق اول و قبل از هر تزریق خونگیری انجام ،سرم جدا و تا انجام آزمایش در فریزر ۷۰- نگهداری شد. تایید تولیدنانوبادی با آزمایش الیزا غیر مستقیم انجام گردید. آزمایش SDS PAGE همراه با رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آماید با نیترات نقره وجود باند در حدود۶۷کیلودالتون را نشان داد که تایید کننده وجود ویروس می باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که در روز ۳۵ پس از تزریق(۱۴ روز پس از تزریق دوم) آنتی بادی اختصاصی برعلیه ویروس کرونا ایجاد.

وبیشترین میزان نانوبادی پس از تزریق دوم وقبل از تزریق سوم (۶۹ روز پس از تزریق اول)حاصل شده است. بطور کلی، بهینه سازی تولید نانوبادی درمانی برای ویروس کرونا را در نظر داریم.

Applied Animal Science Research Journal No 42 pp: 63-70

Production of Nanobodies against new corona virus (nCov-2019)

By: Saeed Zibaei[1] .Akbar Khorasani[2*]. Mohsen Fathi Najafi[3].Hamidreza Farin[3]. Zahra Meshkat[4]
1- Associate professor Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran
2- Microbiologist, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3- Assistant Professor Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran
4- Associate Professor Mashhad University of Medical Sciences,Department of Microbiology and Virology, School of Medicine. Mashhad, Iran
Corresponding Author: Akbar Khorasani Tel: 09122602813 Email:khorasani@rvsri.ac.ir

Received: April 2022 **Accepted: June 2022**

Humeral immunity in camels is mediated by nanobodies, which is unique. The production of nanobodies against the virus and against the virus receptor can prevent the virus from replicating. A new coronavirus has been found in Wuhan, China, causing a pandemic. Corona virus was prepared from Razi Vaccine and Serum Research Institute. To produce specific antibodies against corona virus in camel, a two-year-old male camel was used. The mixture was injected subcutaneously at four points under the skin of the neck. The second injection was performed 21 days after the first injection, blood sampling and isolation of serum 14 days after the second injection (first stage of the experiment), the time of the third injection 34 days after the second injection and the fourth injection 40 days after the third injection. Before the first injection and before each blood draw, the serum was separated and stored in a -70 freezer until the test was performed. Newborn production was confirmed by indirect ELISA test. SDS PAGE test with polyacrylamide gel staining with silver nitrate showed a band of about 67 kDa, which confirms the presence of virus. The results of this study showed that on day 35 after injection (14 days after the second injection) specific antibodies against coronavirus were produced.The highest amount of nanobody was obtained after the second injection and before the third injection (69 days after the first injection). In general, we consider optimizing the production of therapeutic nanobodies for the corona virus.

مقدمه

ایمنی هومورال در شتربا واسطه ایمونوگلوبولین هایی انجام می گیرد که منحصر به فرد است. IgG در شتر سه فرم دارد. فرم اول IgG1که بشکل ایمونوگلوبولین طبیعی است (حدودا ۲۰-۳۰ درصد) . فرم دوم و سوم IgG2واIgG3که فاقد زنجیره سبک بوده و یک دومن از زنجیره سنگین آن نیز حذف شده است بنا براین دارای وزن مولکولی کم می باشد و می تواند واکنشی اختصاصی تر نسبت به آنتی ژن نشان دهد همچنین این نانو بادبی ها آنتی بادی های مقاوم تری نسبت به حرارت وPH می باشند. ونیز بعلت خاصیت آب دوست بودن اسید های آمینه ناحیه CDR3 این ایمونوگلوبولین ، قدرت نفوذآنها بیشتر بوده و قادر هستند سایت های آنتی ژنیکی بیشتری را شناسائی نمایند که ایمونوگلوبولین های عادی قادر به شناسائی آنها نمی باشند بنا براین شتر قادر است ایمونوگلوبولین هایی تولید نمایدبه نام نانو یادی که کار آیی بسیار بالاتری دارد(۳).

کرونا ویروس ها خانواده بزرگی از ویروسها هستند که در انسان ودام ایجاد بیماری می نمایند. ویروس جدید این خانواده که اولین باردر شهر ووهان چین پیدا شد ، باعث همه گیری درجهان(پاندمی) شده است.اولین بار کرونا ویروس متعلق به خانواده کروناویریده در سال ۱۹۶۰ میلادی شناسائی شده است تا امروز ۷ ویروس این خانواده در انسان شناسائی شده است.ویروس کرونا ۸۰تا ۱۲۰ نانومتر قطر ،دارای غشاء متقارن،RNA تک رشته ای با سنس مثبت و ۸ تا ۱۰ منطقه ژنومی قابل ترجمه (Open-Reading Frames (ORFsمی باشد(۵).ژنوم کوید ۱۹ حدودا ۳۰هزار نوکلئوتید دارد که ۷۹/۵ درصد با ژنوم ویروس سارس SARS-CoV شباهت دارد.حدودا دو سوم ژنوم ویروس دو پلی پروتئین بنام های pp1aوpp1ab و ۱۶پروتئین غیر ساختمانی را کد دهی می کند.پروتئین های ساختمانی شامل پروتئین های غشائی(E)،نوکلئوکپسید(N) ، پروتئین های غشائی(M) ، و پروتئین های لیگاندی(S) می باشند.پروتئین های غالبی که ایجاد ایمنی می نماید S پروتئین است.S1 مسئول شناخت رسپتورهای سلولی و باند شدن به آن می باشد و S2 مسئول فیوژن غشاء ویروس با غشاء سلول میزبان است.منطقه اتصال به سلول میزبان Receptor-Binding Domains (RBDs) در ویروس ها متفاوت است. ویروس مرسMERS-CoV به DPP4 receptor اتصال یافته و سارس و کرونای جدید SARS-CoV and SARS-CoV-2 به ACE2 متصل می گردند(1).

این ویروس می تواند ۱۴ روز در بدن فردوجود داشته و علامتی ایجاد نکند و در طی این مدت به دیگران انتقال یابد.سندرم تنفسی حاد (SARS)، که با التهاب ریوی و نارسایی تنفسی مشخص می شود ، در انسان بسیار قابل انتقال بوده و نرخ مرگ و میر نزدیک به ده درصد دارد.بعد از آلوده شدن به ویروس آلوئول های ریوی شدیدا آسیب خواهند دیدکه ممکن است سبب مختل شدن عملکرد ریه ها گردد.در حال حاضر آسیب های وارده از این ویروس (آسیب های: اجتماعی ،بهداشتی،اقتصادی و..) بسیار زیاد است که نیاز به مقابله با این ویروس به اهداف بین المللی تبدیل شده است.یک از راه های جلوگیری از خسارات زیاد ویروس تولید آنتی بادی کارا بر علیه آن می باشد تا از راه مقابله با تکثیر ویروس بتواند با مرگ ناشی از آن مبارزه نمود.بعلت اینکه رسپتور ACE-2 گیرنده اختصاصی ویروس می باشد . تولید نانوبادی بر علیه ویروس(ویروس غیر فعال شده) و نیز بر علیه گیرنده ویروس ACE-2 می تواند از تکثیر ویروس جلوگیری نماید(۱۱).

۲- مواد و روش ها:

۲-۱-مواد: کلرور سدیم، تریپسین، سفادکس، سولفات آمونیوم، پراکسید هیدروژن ۳٪، تترامتیل بنزیدین، NaH2PO4 2H2Oو Na2HPO4 12H2O، Na2co3 ، NaHco3 ،Kcl ،استونیتریل ، تریس، استات سدیم، گلیسین، سدیم دودسیل سولفات، کوماسی بلو، نیترات نقره، کربنات سدیم، متانول از شرکت مرک (آلمان) تهیه گردید. آلبومین سرم گوساله (BSA)، آکریل‌آمید، بیس‌آکریل‌آمید از شرکت سیگما، کیت های الایزای غیر مستقیم SARS-CoV-2 برای اندازه گیری IGgانسان از شرکت پیشتاز طب، آنتی آنتی بادی شتر Rabbit Anti-Camel IgG Antibody(HRP) از شرکتAbbexa و Medium molecular weightکیتوزان از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شدند.

۲-۲-روش ها:

۲-۱-۲- آماده سازی ویروس :

ویروس از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه گردید(ویروس کشته شده با برآورد ۱۰۰نانوگرم بر میلی لیتر آماده شد). بطور خلاصه جدا سازی وتایید ویروس به قرار ذیل می باشد:. بدین منظورآزمایش های لازم براساس دستورالعمل وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی جمهوری اسلامی ایران انجام گرفت. کار با SARS-CoV-2 در آزمایشگاه BSL-3 توسط پرسنل واکسینه شده مجهز به ماسک های تصفیه کننده هوا انجام شد.جهت جدا سازی ویروس، نمونه های بیمار با محیط Eagle اصلاح‌شده Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) حاوی ۵ درصد سرم جنین گاوی غیرفعال شده با حرارت ، ۱۰HEPES میلی‌مولار ، پنی‌سیلین/استرپتومایسین ،

گلوتامین و آمفوتریسینB مخلوط شد. سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری فیلتر گردید. از محیط کشت بدون نمونه به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.بطور خلاصه بمنظور تکثیرویروس نمونه‌های فیلتر شده به فلاسک‌های کوچک ۵۰ میلی لیتری حاوی سلول‌های Vero تک‌لایه انتقال در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور CO2 5% نگهداری شدند. کشت‌ها روزانه به مدت ۸ روز برای تشخیص اثرات سیتوپاتیک (CPE) مورد بررسی قرار گرفت. کشت‌هایی که CPE را نشان می‌دادند دوباره فیلترشده ومجدد تلقیح گردیدند. پس از تکثیر ویروس و خالص سازی ، ویروس ها با پارافورمالدئید (۲درصددرغلظت نهایی) به مدت ۴۵ دقیقه در PBS غیر فعال شدند. برای تاییداز Real time PCR استفاده گردید.سپس برای بررسی ویروس از آزمایش SDS PAGE همراه با رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آماید با نیترات نقره وجهت تعیین غلظت ویروس از تعیین پروتئین به روش برافورد (و نیز استفاده ازدستگاه نانودراپ) استفاده گردید.

همچنین آزمایش تشخیص ویروس کرونا با سرم انسانی مثبت از نظر کرونا انجام (طبق دستورالعمل کیت Cov IgG)انجام گرفت .بدین منظورازالیزای غیر مستقیم (ویروس خالص و غیر فعال شده بعنوان آنتی ژن)استفاده گردید.

۲-۲-۲- تولید آنتی بادی اختصاصی بر علیه ویروس کرونا در شتر با استفاده از ادجوانت کیتوزان:

بدین منظور ازیک نفر شتر نر بین یک تا دوساله استفاده شد .جهت ایمن سازی شتر از۸۰۰ نانوگرم بر ای هر کیلو گرم وزن شتر ویروس کروناهراه با ادجوانت کیتوزان مخلوط و به روش زیر جلدی در چهار نقطه از زیر پوست ناحیه گردن، تزریق گردید.برای آماده سازی ادجوانت کیتوزان از روش میر تاج الدینی و همکاران ۲۰۰۹ استفاده شد(۹) واکسن ساخته شده با زمان های ذیل تزریق شد. تزریق دوم ۲۱ روز پس از اولین تزریق ، خونگیری و جدا کردن سرم۱۴ روز پس از دومین تزریق (مرحله اول آزمایش)،زمان تزریق سوم ۳۴ روز پس از دومین تزریق تزریق چهارم ۴۰ روز پس از سومین تزریق انجام شد. قبل از تزریق اول و قبل از هر تزریق خونگیری انجام ،سرم جدا و تا انجام آزمایش در فریزر ۷۰- نگهداری شد.

۳-۲-۲-تایید تولیدنانوبادی با آزمایش الیزا غیر مستقیم:

افزودن ویروس به چاهک ها ی پلیت الیزا با رقت های یک به ۵ ، یک به ۵۰، یک به ۱۰۰، یک به ۵۰۰، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر(برای هر رقت از دو تکرار استفاده شد) -افزودن سرم آلبومین گاوی ۱/۵ درصد به میزان ۱۲میکرولیتر به چاهک ها ی پلیت الیزا-افزودن آنتی بادی (سرم های جدا شده) با سه رقت یک به ۵ و یک به ۱۰۰و یک به۵۰۰ به میزان۱۰۰ میکرولیتر به چاهک ها ی پلیت الیزا-داشتن کنترل مثبت(استفاده ازکنترل مثبت و کنترل منفی کیت الایزای غیر مستقیم SARS-CoV-2 برای اندازه گیری IgGانسان). -افزودن آنتی آنتی بادی شتر-Rabbit Anti Camel IgG Antibody(HRP)که باHRP کونژوکه شده است.به میزان ۱۰۰میکرولیتربه چاهک ها ی پلیت الیزا-افزودن محلول TMB به میزان ۱۰۰میکرولیتر چاهک ها ی پلیت الیزا و گذاشتن در تاریکی -افزودن محلول متوقف کننده(اسید سولفوریک ۱۲درصد)به چاهک ها ی پلیت الیزا-قرائت جذب نوری پلیت توسط دستگاه الیزا ریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر

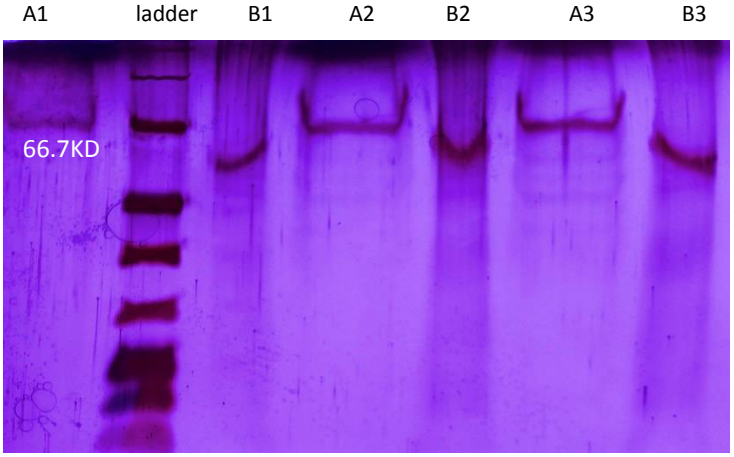
برای محاسبه نتایج ابتدا میانگین دو تکرار محاسبه، انحراف معیار و سپس Cut off بدست آمد، جهت محاسبه Cut Off از فرمول انحراف معیار ضربدر ۲ بعلاوه ODکنترل منفی (کنترل سرم) استفاده گردید. آنگاه Cut off بدست آمده از جذب نوری حاصل شده کم گردید.

۳-نتایج:

۱-۳-نتایج حاصل از بررسی و اندازه گیری غلظت ویروس کرونا

پس از تکثیر ویروس و خالص سازی آن غلظت ویروس ۹۰ نانوگرم بر میلی لیتر برآورد گردید.

آزمایش SDS PAGE همراه با رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آماید با نیترات نقره وجود باند در حدود۶۷کیلودالتون را نشان داد که تایید کننده وجود ویروس می باشد. . تایید شد که ویروس کرونا می باشد.



تصویر ۱- ۳-نتایج حاصل ازبررسی ویروس کرونا توسط SDS PAGE -A1

A1 : ویروس با غظت 5µg همراه با 2ME و با جوشاندن نمونه قبل از ریختن در چاهک

B1 : ویروس با غظت 5µg بدون 2ME بدون جوشاندن نمونه قبل از ریختن در چاهک

A2 : ویروس با غظت 10µg همراه با 2ME و با جوشاندن نمونه قبل از ریختن در چاهک

B2 : ویروس با غظت 10µg بدون 2ME بدون جوشاندن نمونه قبل از ریختن در چاهک

A3 : ویروس با غظت 15µg همراه با 2ME و با جوشاندن نمونه قبل از ریختن در چاهک

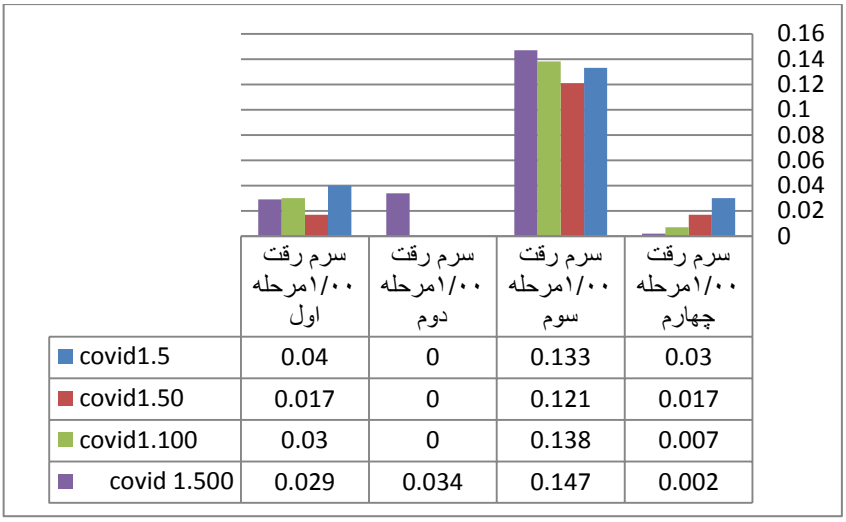
B3 : ویروس با غظت 15µg بدون 2ME بدون جوشاندن نمونه قبل از ریختن در چاهک

۲-۳-نتایج حاصل ازتایید تولیدنانوبادی با آزمایش الیزا غیر مستقیم:

نتایج حاصل از جذب نوری در دستگاه الیزا ریدر پس از محاسبه وکسر Cut off برای سرم های اخذ شده در چهار تاریخ خونگیری و جدا کردن سرم در جدول ۱-۲-۳-آمده است .همچنین مقایسه نتایج حاصل از جذب نوری در دستگاه الیزا ریدر پس از محاسبه وکسر Cut off برای سرم های اخذ شده در چهار تاریخ خونگیری و جدا کردن سرم تنها در رقت یک به ۱۰۰ سرم در نمودار ۱-۲-۳-آمده است.نتایج نشان می دهد که بیشترین میزان آنتی بادی اختصاصی بر علیه کرونا در شتر پس از تزریق دوم وقبل از تزریق سوم حاصل شده است .

جدول۱-۲-۳- نتایج الیزا پس از محاسبه وکسر Cut off برای سرم های اخذ شده در چهار تاریخ خونگیری و جدا کردن سرمDA1

سرم شتر / کرونا	سرم با رقت ۱/۵ DA1	سرم با رقت ۱/۱۰۰ DA1	سرم با رقت ۱/۵۰۰ DA1	سرم با رقت ۱/۵ DA2	سرم با رقت ۱/۱۰۰ DA2	سرم با رقت ۱/۵۰۰ DA2	سرم با رقت ۱/۵ DA3	سرم با رقت ۱/۱۰۰ DA3	سرم با رقت ۱/۵۰۰ DA3	سرم با رقت ۱/۵ DA4	سرم با رقت ۱/۱۰۰ DA4	سرم با رقت ۱/۵۰۰ DA4
ویروس با رقت ۱/۵	۰/۰۳۱	۰/۰٤	۰/۰٤٤	-۰/۰٦۹	-۰/۰۹۱	-۰/۱۰٦	۰/۱۱۷	۰/۱۳۳	۰/۰۹	۰/۰۲۵	۰/۰۳	۰/۰۲۹
ویروس با رقت ۱/۵۰	۰/۰۲۳	۰/۰۱۷	۰/۰۲۵	-۰/۰۰٤	-۰/۰۲۹	-۰/۰۳٦	۰/۰۹۸	۰/۱۲۱	۰/۰۸۷	۰/۰۲٦	۰/۰۱۷	۰/۰۲۵
ویروس با رقت ۱/۱۰۰	۰/۰۱٤	۰/۰۳	۰/۰۲٤	۰	-۰/۰۰۹	-۰/۰۱۳	۰/۱۲۸	۰/۱۳۸	۰/۰۸۲	۰/۰۱٤	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱
ویروس با رقت ۱/۵۰۰	۰/۰٤۳	۰/۰۲۹	۰/۰۱۸	۰/۰۱۲	۰/۰۳٤	۰/۰٤٦	/۰۹	۰/۱٤۷	۰/۱۳۸	۰/۰۱۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵



	سرم رقت ۱/۰۰ مرحله اول	سرم رقت ۱/۰۰ مرحله دوم	سرم رقت ۱/۰۰ مرحله سوم	سرم رقت ۱/۰۰ مرحله چهارم
covid1.5	0.04	0	0.133	0.03
covid1.50	0.017	0	0.121	0.017
covid1.100	0.03	0	0.138	0.007
covid 1.500	0.029	0.034	0.147	0.002

)

خونگیری اول)-DA2 (خونگیری دوم)-DA3 (خونگیری سوم)-DA4 (خونگیری چهارم)

نمودار ۱-۲-۳- نتایج الیزا پس از محاسبه وکسر Cut off برای سرم های اخذ شده با رقت یک به ۱۰۰ وغلظت های یک به۵، یک به ۵۰،یک به ۱۰۰ و یک به ۵۰۰ ویروس کرونا در چهار مرحله خونگیری و جدا کردن سرم

٤- بحث:

ویروس جدید کرونا (SARS-CoV-2) همچنان انسان ها را آلوده می کند وسبب مرگ و میر می گردد . هیچ درمان قطعی برای این بیماری پاندمیک پیدا نشده است. آنتی بادی درمانی یکی از راه های مهم درمان برای بیماریها و نیز کنترل عفونت ناشی از COVID-19 است. استفاده از آنتی بادی های کلاسیک مسائل پیچیده ای را ایجاد می نماید.شتر سانان دارای آنتی بادی های تک دومنی به نام نانوبادی می باشند که دارای ویژگی‌های جالبی مانند اندازه کوچک، تولید مقرون‌به‌صرفه و نفوذپذیری بافتی بهترمی باشد که باعث می‌شود نانوبادی به عنوان یک درمان ضد ویروسی در نظر گرفته شود. اندازه کوچک نانوبادی‌ها ممکن است منجر به میل کم اتصال به آنتی ژن و پاکسازی سریع از کلیه گردد.

در تحقیق حاضر جهت ایجاد نانوبادی برعلیه ویروس کرونا پس از تهیه ویروس و ساخت آنتی ژن تزریقی برای تولید بهتر نانوبادی از یاور کیتوزان با وزن مولکولی متوسط استفاده شد . استفاده از یاورها برای به حداکثر رساندن اثربخشی واکسن‌ها ضروری است. زیست تخریب پذیری، فعالیت ایمونولوژیکی و ویسکوزیته بالای کیتوزان، آن را به یک کاندید عالی به عنوان یک ادجوانت برای آنتی ژن های تزریقی تبدیل نموده است(۱۲). بنابراین، کیتوزان به عنوان یاور برای واکسیناسیون زیر جلدی شتر با ویروس کرونا انتخاب شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که در روز ۳۵ پس از تزریق(۱۴ روز پس از تزریق دوم) آنتی بادی اختصاصی برعلیه ویروس کرونا ایجاد شده است.

دانگ و همکاران سال ۲۰۲۰ آنتی بادی خنثی کننده ضد SARS-CoV-2 یک بیمار آلوده به ویروس جدا گردید(۴).

نتایج نشان می دهد که بیشترین میزان آنتی بادی اختصاصی بر علیه کرونا در شتر پس از تزریق دوم وقبل از تزریق سوم (۶۹ روز پس از تزریق اول)حاصل شده است.

به طور کلی، ترکیبی از آنتی بادی هایی که چندین اپی توپ را هدف قرار می دهند، توانایی خنثی سازی ویروسی بهتری نسبت به آنتی بادی های مونوکلونال دارند. با این حال، جداسازی ایمونوگلوبولین ازبیماران کرونایی به دلیل عدم دسترسی به پلاسما

محدود شده است.همچنین درمان ترکیبی با چندین آنتی بادی مونوکلونال نیز به دلیل هزینه بالا محدود می باشد. آنتی بادی های درمانی برای محافظت در برابرعفونت های ویروسی از طریق سه مکانیسم عمل می کنند،اول عملکردهای وابسته به Fc که گیرنده های ویروس/میزبان را مسدود می نمایند.دوم اینکه سبب تجمع ویروس ها می شوند و سوما سلول های ایمنی را فعال نموده و منجر به کشتن ویروس ها می گردند(۴).لذا رویکرد استفاده از نانوبادی برای مقابله با ویروس کرونا می تواند امید زیادی ایجاد نماید.

زاهاروف و همکاران در سال ۲۰۰۷ کیتوزان را به عنوان یک یاور برای واکسیناسیون زیر جلدی موش ها با یک آنتی ژن پروتئین مطالعه کردند. دریافتند که کیتوزان تیتر آنتی بادی اختصاصی آنتی ژن را بیش از پنج برابر و تکثیر +CD4 اختصاصی را بیش از شش برابر افزایش داد. افزایش شدید در تیتر آنتی‌بادی همراه با پاسخ‌های تأخیری قوی (DTH) نشان داد که کیتوزان می توتندپاسخ‌های ایمنی هومورال و ایمنی با واسطه سلولی را القا نماید. در مقایسه با ادجوانت های سنتی برای ساخت واکسن، کیتوزان نسبت به ادجوانت ناقص فروند (IFA) تاثیری برابر داشت و نسبت به هیدروکسید آلومینیوم برتر بود. تولید آنتی بادی بین ۱۴ تا ۲۱ روز پس از تزریق کیتوزان و آنتی ژن به اوج خود رسید و با تجزیه پلی ساکارید کاهش یافت. این مطالعات ، نشان می دهد که کیتوزان یک پلت فرم امیدوارکننده و مناسب برای تحویل واکسن تزریقی است(۱۲).

نتایج بررسی انجام شده با نتایج زاروف و همکاران ۲۰۰۷ در خصوص روند تولید وکاهش آنتی بادی ناشی ازاستفاده از ادجوانت کیتوزان، مطابقت دارد چراکه نانوبادی ایجاد ۶۹ روز پس از تزریق اول بیشترین میزان را نشان داد و پس از آن کاهش یافت

گندون و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که استفاده ازادجوانت کیتوزان به طور قابل توجهی باعث افزایش تیتر آنتی بادی در برابر سویه های ویروسی همولوگ و هترولوگ آنفلوآنزا شد. کیتوزان، با یک آنتی ژن، تکثیر لنفوسیت های T CD+4 اختصاصی آنتی ژن ، و تعداد لنفوسیت های Th-1 را در موش افزایش داد، عملکرد T-helper را تقویت کرد و عمل لنفوسیت های T سیتوتوکسیک را القا نمود(۶).

خلیلی و همکاران در سال ۲۰۱۵ بیان می دارند که ویروس آنفلوانزای بارگذاری شده در بر روی نانو ذرات کیتوزان، پس از ایمن‌سازی در مرغ، تیتر آنتی‌بادی مناسب را القا می‌نماید، همچنین جهت القای تولید آنتی بادی به دوز کم آنتی‌ژن نیاز دارد. همچنین روی نانو ذرات کیتوزان یک پلت فرم جدید جالب برای تحویل آنتی ژن و یک ادجوانت امیدوارکننده برای واکسن آنفلوانزای غیرفعال H9N2 می باشد(۷).

چائوچان وهمکاران در سال ۲۰۲۱ بیان می دارند که چندین اپی توپ در نانوبادی برای SARS-CoV-2وجود دارند که در انسان بسیار ایمنی زا هستند، از جمله اپی توپ خنثی کننده، و اپی توپ هایی که منحصراً توسط آنتی بادی های شتر هدف قرار می گیرند. استفاده از آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده متقاطع با SARS-CoV-2 شتر(نظیر آنتی بادی بر علیه MERS) به‌عنوان یک درمان بالقوه برای COVID-19 پیشنهاد نمی‌شوند. در عوض، حضور آن‌ها در شترهای غیر ایمن‌شده از توسعه شترهای هایپرایمن بر علیه SARS-CoV-2 پشتیبانی می‌کند ـنانو بادی در شتر های هایپر ایمن، منبع مهمی برای پیشگیری و درمان COVID-19 می باشد(۲).

بطور کلی، بهینه سازی تولید آنتی بادی درمانی برای ویروس کرونا را در نظر داریم.

با مهندسی آنتی‌بادی ، طراحی به کمک رایانه ومعلوم کردن سایت جهش‌زایی در ویروس ، استفاده از ادجوانت های مناسب می‌توان ویژگی‌های مختلف آنتی‌بادی‌های کاندید درمان (با هدف افزایش ایمنی، کارایی و توسعه‌پذیری آنها) را بهبود بخشید. این ویژگی ها شامل میل و ویژگی اتصال به آنتی ژن، اثربخشی بیولوژیکی، فارماکوکینتیکی و فارماکودینامیکی، ایمنی زایی و ویژگی های فیزیکوشیمیایی می باشد (۲).

منابع:

1-Abd Ellah, N. H., Gad, S. F., Muhammad, K., E Batiha, G., & Hetta, H. F. (2020). Nanomedicine as a promising approach for diagnosis, treatment and prophylaxis against COVID-19. *Nanomedicine*, *15*(21), 2085-2102.

2-Chouchane, L., Grivel, J. C., Abd Farag, E. A. B., Pavlovski, I., Maacha, S., Sathappan, A., ... & Shan, J. (2021). Dromedary camels as a natural source of neutralizing nanobodies against SARS-CoV-2. *JCI insight*, *6*(5).

3-Cui Li, Zhuoran Tang, *et al*. Natural Single-Domain Antibody-Nanobody: A Novel Concept in the Antibody Field [J]. J Biomed Nanotechnol. 2018. 14:1-19.

4-Dong, J., Huang, B., Jia, Z., Wang, B., Gallolu Kankanamalage, S., Titong, A., & Liu, Y. (2020). Development of multi-specific humanized llama antibodies blocking SARS-CoV-2/ACE2 interaction with high affinity and avidity. *Emerging microbes & infections*, *9*(1), 1034-1036.

5-Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. In: Coronaviruses: Methods in Molecular Biology.

6-Ghendon Y, Markushin S, Krivtsov G, Akopova I. Chitosan as an adjuvant for parenterally administered inactivated influenza vaccines. Arch Virol. 2008;153(5):831–7. doi: 10.1007/s00705-008-0047-4.

7-Khalili, I., Ghadimipour, R., Eteghad, S. S., Najafi, M. F., Ebrahimi, M. M., Godsian, N., ... & Khalili, M. T. (2015). Evaluation of immune response against inactivated avian influenza (H9N2) vaccine, by using chitosan nanoparticles. *Jundishapur Journal of microbiology*, *8*(12).

8-Maier HJ, Bickerton E, Britton P (Eds). Humana Press, NY, USA, 1–23 (2015). Chouchane, L., Grivel, J. C., Abd Farag, E. A. B., Pavlovski, I., Maacha, S., Sathappan, A., ... & Shan, J. (2021). Dromedary camels as a natural source of neutralizing nanobodies against SARS-CoV-2. *JCI insight*, *6*(5).

9-Mirtajaddini, S. A., Najafi, M. F., Yazdi, S. A. V., & Oskuee, R. K. (2021). Preparation of Chitosan Nanoparticles as a Capable Carrier for Antigen Delivery and Antibody Production. *Iranian Journal of Biotechnology*, *19*(4), e2871.

10-Moradi A. Jafari B. Omidi Y. Parvizpour S. Pourseif MM. (2020). Nanobody-based therapeutics against colorectal cancer: Precision therapies based on the personal mutanome profile and tumor neoantigens. Pharmacol Res. Apr 8:104790

11-Xintian Xu, Ping Chen, Jingfang, Wang, Jiannan Feng, Hui Zhou, Xuan Li, Wu Zhong, Pei Hao. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. Sci China Life Sci. March (2020) Vol.63 No.3

12-Zaharoff, D. A., Rogers, C. J., Hance, K. W., Schlom, J., & Greiner, J. W. (2007). Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine*, *25*(11), 2085-2094.