

PREDICTION OF THE PHARMACOLOGICAL PROFILES OF PALMITOYL-TRIMETHYL CHITOSAN

Mădălina Mihaela FILIP

West University of Timisoara, Faculty of Chemistry, Biology, Geography, Department
of Biology-Chemistry, Pestalozzi 16, Timișoara

*Corresponding author e-mail: madalina.filip97@e-uvv.ro

Received 27 January 2020; accepted 23 December 2020

ABSTRACT

This study illustrates a computational prediction concerning the biological and / or adverse effects of palmitoyl trimethyl chitosan, an excipient used for drugs used for the treatment of liver cancer. The results obtained in the present study show that palmitoyl-trimethyl chitosan has a favorable pharmacokinetic profile: it does not affect the central nervous system, it does not produce hepatotoxicity, it does not have cancer and mutagenic potential, it does not inhibit the cytochromes involved in the metabolism of xenobiotics nor the transporters of organic cations. For this compound, a reduced potential for cardiotoxicity and endocrine disruption was identified, respectively the possibility of inhibiting the organic anion transporters OATP1B1 and OATP1B3 thus affecting their functioning.

KEYWORDS: *chitosan, palmytoil-trimethyl chitosan, pharmacokinetic profile, biological effects.*

INTRODUCERE

Generalități privind proprietățile chitosanului

Polizaharidele din carbohidrații naturali sunt utilizate în domeniul cercetării atât ca sisteme de eliberare medicamentelor, matrici pentru implanturi, cât și pentru potențialul lor de adjuvant în vaccinuri. Biomaterialele, datorită proprietăților lor favorabile precum o bună biodisponibilitate, non-toxicitate, biodegradabilitate, stabilitate, producția ieftină și capacitatea de imunostimulare, sunt considerate candidați dezirabili pentru dezvoltarea de adjuvanți. Chitosanul este un astfel de polimer natural, apreciat pentru proprietățile sale antibacteriene, antioxidante, antiacide, antiulcer și de vindecare a rănilor, având astfel utilizare în produse farmaceutice (Gordon et al., 2014). Chitosanul este cel mai important derivat al chitinei, produs din aceasta prin deacetilare chimică sau enzimatică, după cum se poate vedea în figura 1. Este un polizaharid natural, cationic, găsit în compoziția exoscheletului crustaceelor precum și în pereții celulari ai ciupercilor (Munawar et al., 2017).

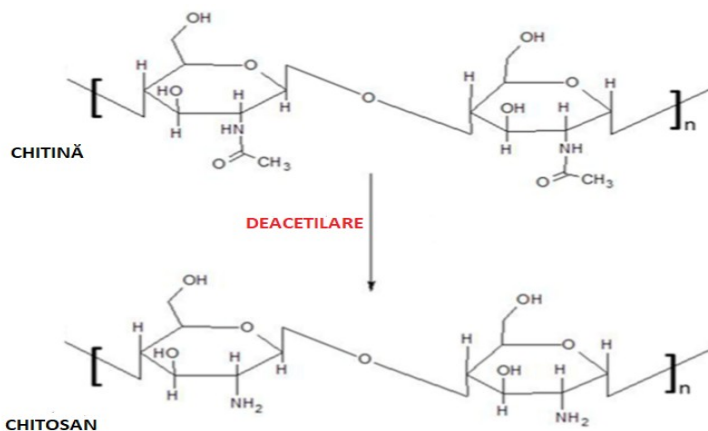


FIG. 1 Deacetilarea chitinei în chitosan (Interpretare după Munawar et all, 2017)

Biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, non-toxicitatea, densitatea mare de sarcina electrica, costurile reduse, mucoadezivitatea și capacitatea imunomodulatoare sunt proprietățile excelente ale chitosanului care fac ca spectrul aplicabilității sale să fie extrem de larg (Xia et all, 2015);(Sinha et all, 2004).

Generalități privind utilizarea chitosanului ca excipient pentru medicamente

A) Utilizarea chitosanului ca excipient pentru vaccinuri

Utilizarea vaccinurilor a transformat sănătatea publică prin prevenirea multor boli infecțioase. S-a estimat că peste 2,5 milioane de decese au fost evitate anual în boli precum difterie, rujeolă și tetanos, respectiv până la 5 milioane de decese anuale ar putea fi prevenite dacă s-ar utiliza vaccinuri pe scară mai largă în întreaga lume (WHO, 2012).

Vaccinurile pot fi administrate pe mai multe căi: calea orală, calea nazală și calea intravenoasă. Calea nazală este atractivă pentru administrarea de vaccinuri, nu numai că oferă o alternativă ușoară, neinvazivă, fără ac, dar creează, de asemenea, o oportunitate de a provoca răspunsuri imune care pot crește capacitatea de a controla agenții patogeni la locul de intrare. Răspunsurile imune la antigenii „goi” sunt adesea modeste și este acceptat pe scară largă faptul că încorporarea unui adjuvant este o condiție necesară pentru realizarea vaccinurilor nazale eficiente clinic. Chitosanul, în deosebi sărurile de chitosan au fost utilizate în diverse studii preclinice și clinice, prezentând o bună tolerabilitate, stimulare imunitară excelentă și rezultate clinice pozitive pentru o serie de infecții. Dovezi deosebit de importante care susțin utilizarea chitosanului ca adjuvant pentru vaccinuri aplicate pe cale nazală provin din investigațiile clinice asupra unui vaccin cu

norovirus, acest lucru a demonstrând capacitatea chitosanului de a evoca răspunsuri imunologice și de a conferi imunitate protectoare în urma provocării norovirusului (Alan et al, 2014). Deoarece chitosanul deține proprietăți mucoadezive, a fost frecvent explorat ca adjuvant pentru administrare pe căile mucoaselor. (Chang et al, 2010). Trimeții chitosanului (TMC) este unul dintre derivații extrem de dezirabili ai chitosanului și este preferat față de chitosan datorită proprietăților sale precum solubilitatea ridicată și stabilitatea pe o gamă largă de condiții ionice. TMC are o sarcină pozitivă la pH fiziologic, iar epiteliul nazal este încărcat negativ, ceea ce favorizează interacțiunea electrostatică a TMC cu epiteliul nazal (Mohanan et al, 2010). TMC le-a oferit cercetătorilor o direcție de a explora calea nazală de vaccinare cu ajutorul formulărilor de vaccin bazate pe TMC, datorită capacității sale de a traversa epiteliul nazal (Baunder et al, 2004). În prezent, există vaccinuri în curs de dezvoltare, create pentru tratarea bolilor la om, acestea folosind chitosanul ca adjuvant. CRM 197 reprezintă un antigen toxoid difteric, realizat ca un sistem de chitosan glutamat administrat intranasal, fiind testat pe oameni ca un imunostimulator. Trei grupuri de oameni au primit intranasale acest vaccin contra difteriei, rezultatele sugerând o bună tolerare a chitosanului de către organismul uman, având efecte adverse minore precum secreția nazală, o ușoară senzație de nas înfundat și implicit disconfort (Mills et al, 2003). Mecanismele de îmbunătățire a vaccinurilor prin adăugare de chitosan și administrate prin mucoase sunt datorate atât reținerii vaccinului în pasajele nazale prin mucoadezivitate cât și deschiderii joncțiunilor celulelor endoteliale pentru transportul paracelular al vaccinului [Illum et al, 2001].

Administrarea orală de medicamente este cu siguranță cea mai convenabilă datorită ușurinței administrării. Există însă mai multe provocări în realizarea administrării orale, cum ar fi variația pH-ului (mediul stomacului este extrem de acid), prezența enzimelor, efectul de prim-pas în ficat și bariera intestinală de absorbție a medicamentelor. Provocările de mai sus limitează intrarea medicamentului în circulația sistemică reducând astfel biodisponibilitatea orală (Bowman et al, 2006). Tehnologia nanoparticulelor este o tehnică de formulare din ce în ce mai exploatată pentru obținerea medicamentelor utilizată pentru a depăși limitele administrării orale (Shukla et al, 2013); (Wang et al, 2011). Nanoparticulele au mai multe avantaje, cum ar fi dimensiunea mică (care crește rata de dizolvare a medicamentelor), aria mare a suprafeței, mărirea stabilității medicamentelor în tractului gastro-intestinal. S-a demonstrat că chitosanul poate fi formulat sub formă de nanoparticule polimerice pentru diferite aplicații în administrarea orală a medicamentului (Munawar et al, 2017). Livrarea orală a vaccinurilor este esențială, deoarece antigenii se degradează în tractul gastrointestinal. Mai

mult decât atât, vaccinurile care conțin nanoparticule de chitosan pot fi preparate numai prin metode care evită solvenții organici, deoarece acestia pot modifica imunogenitatea antigenilor dacă structura secundară peptidică este perturbată (Van der Lubben et al, 2001). Nanoparticulele de chitosan și CMT NP s-au dovedit a fi adjuvanți excelenți pentru administrarea orală a vaccinului împotriva bacteriilor patogene *V.anguillarum*. Vaccinul preparat astfel a fost stabil în pH-ul gastric, a avut eliberare susținută și a protejat proteina antigenică de a intra în splină și rinichi, ceea ce este esențial pentru răspunsul imunitar (Munawar et al, 2017).

Din ceea ce cunosc, nu s-a utilizat chitosan ca adjuvant pentru vaccinuri administrate intravenos.

B) Utilizarea chitosanului ca excipient pentru medicamente

Printre numeroase aplicații farmaceutice, chitosanul a fost utilizat pe scară largă în prepararea comprimatelor directe ca un bun dezintegrant, agent de granulare și o bună matrice pentru eliberarea susținută a medicamentelor (Kumar et al, 2004). În preparate farmaceutice solide care necesită dizolvare, chitosanul a fost utilizat pentru îmbunătățirea vitezei de dizolvare și a biodisponibilității medicamentelor insolubile în apă. (Sinha et al, 2004). Datorită proprietății sale bune de absorbție a apei, chitosanul a fost recunoscut pe scară largă ca fiind un bun dezintegrant pentru tablete. O astfel de funcționalitate a fost observată în cazul tabletelor care dețin chitosan în concentrații de sub 70% (Kumar et al, 2002). Una dintre proprietățile esențiale ale chitosanului în cazul medicamentelor cu administrare orală este reprezentată de eliberarea controlată a medicamentelor (Fernandes & Bentley, 2009). Pe lângă acest aspect, chitosanul ajută la furnizarea medicamentului în mod special pe locul de acțiune. Acest lucru duce la dezvoltarea unor sisteme avansate de eliberare controlată de medicamente, agentul activ este încapsulat într-un astfel de sistem special proiectat, care îl transportă în mod specific către celula sau organul țintă (Fernandes & Bentley, 2009).

O altă utilizare a chitosanului este în tratarea infecțiilor de natură oftalmologică. Au fost realizate microsferă de chitosan cu medicament antiviral aciclovir. Aciclovirul este un medicament antivirus utilizat topic în infecția ochilor, chitosanul sporind activitatea antivirală a acestuia (Majekodunmi, 2016).

Scopul acestui studiu este de a obține predicții cu privire la efectele biologice și/sau adverse ale palmitoil-trimetil chitosanului, un excipient utilizat pentru medicamentele destinate tratării cancerului hepatic și care este un produs de degradare al acestor medicamente.

MATERIALE ȘI METODE

Compusul analizat în acest studiu poartă denumirea de "palmitoil-trimetil-chitosan", un derivat al chitosanului care are proprietăți benefice și este folosit în industria farmaceutică cu precădere ca excipient pentru medicamente folosite pentru tratarea cancerului hepatic (Bei et al, 2014). Formula moleculară a compusului este $C_{37}H_{71}N_3O_{14}$, iar structura 2D a acestuia, extrasă din baza de date PubChem (Kim et al, 2019) este reprezentată în figura 2.

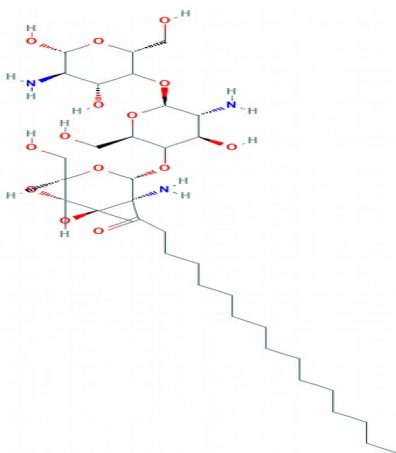


FIG. 2. Structura 2D a compusului palmitoil-trimetil-chitosan
(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/129864018>)

Baza de date PubChem (a cărei pagină de acces, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, este în figura 3) ne-a permis și obținerea proprietăților fizico-chimice ale palmitoil-trimetil-chitosanului.

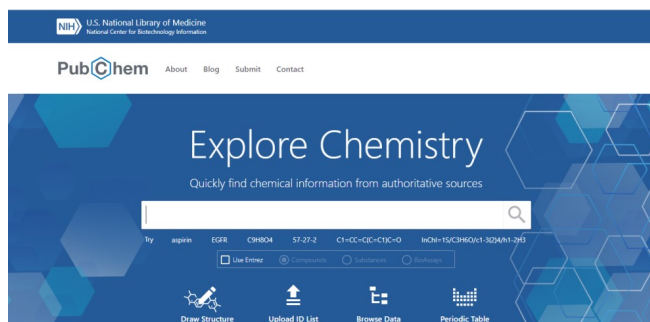


FIG. 3. Pagina de acces a bazei de date pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Palmitoil-trimetil-chitosanul are o masă moleculară de 781.494 g/mol, aria topologică polară de 303 Å², numărul atomilor donori de legături de hidrogen este 11, cel al atomilor acceptori de legături de hidrogen este 17, numărul de legături rotabile este 22, iar numărul atomilor grei este 54.

Pentru realizarea acestui studiu am utilizat baza de date AdmetSAR. Acest program permite predicția proprietăților de absorbție, distribuție, metabolizare, excreție și toxicitate (ADMET sau ADME-Tox) ale compușilor utilizați în industria farmaceutică care joacă un rol esențial în descoperirea de medicamente și evaluarea pericolului pentru mediu. Platforma de cercetare intitulată admetSAR reprezintă un instrument amplu pentru a prezice proprietățile ADMET ale compușilor analizați. Platforma se bazează pe circa 200.000 de proprietăți cunoscute pentru aproximativ 96000 de compuși unici care au fost obținute manual din numeroase studii științifice. Platforma de cercetare admetSAR oferă o interfață prietenoasă pentru a căuta cu ușurință profiluri chimice, denumiri și similarități (Yang et al, 2018). Interfața bazei de date AdmetSAR este prezentată în figura 4.

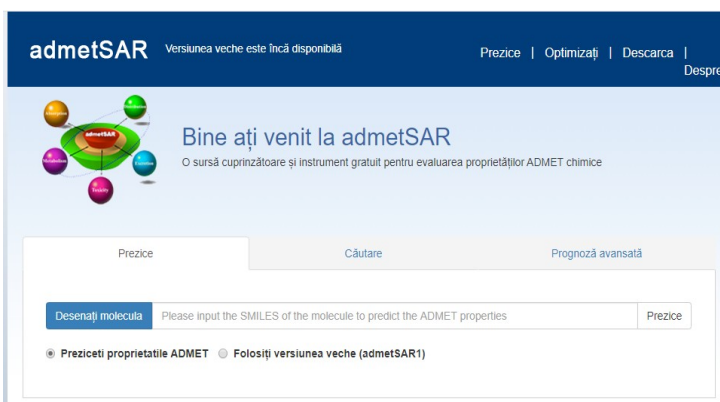


FIG. 4 Pagina de acces a PROGRAMULUI admetSAR (Yang et al, 2018, <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>)

Noua versiune a programului admetSAR (versiunea 2.0) se concentrează în principal pe predicții ADMET bazate pe proprietăților fizico-chimice. Peste 40 de modele predictive au fost implementate în noua versiune a programului AdmetSAR. În admetSAR2.0, sunt utilizate șase proprietăți fizico-chimice sau topologice pentru a defini domeniul de aplicabilitate, acestea sunt reprezentate de către masa moleculară, coeficientul de partiție (logP), numărul de atomi, numărul de inele, numărul de atomi acceptori și respectiv donori de legături de hidrogen (Yang et al, 2018).

Predicțiile efectuate cu ajutorul programului admetSAR2.0 pot fi grupate în următoarele categorii: absorbție (absorbția intestinală la om, biodisponibilitatea orală), distribuție (legarea la proteinele plasmatice, penetrarea barierei hematoencefalice, interacțiunea cu glicoproteina P), metabolism (interacțiunea cu citocromii umani implicați în metabolizarea xenobioticelor, interacțiunea cu transportorii de anioni și cationi organici), excreție (timpul de înjumătățire, degajarea renală), toxicitate asupra organelor umane (ochi, ficat, inimă), toxicitate genomică (mutagenitate, carcinogenitate), eco-toxicitate (toxicitate asupra *Tetrahymena pyriformis*, asupra organismelor prezente în fitoplancton, asupra albinelor și gradul de biodegradabilitate) (Yang et al., 2018).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Predicțiile cu privire la proprietățile ADMET obținute cu ajutorul programului AdmetSAR pentru compusul palmitoil-trimetil chitosan sunt prezentate în cele ce urmează. Tabelul 1 prezintă proprietățile de absorbție ale palmitoil-trimetil chitosanului, Tabelul 2 ilustrează posibilele efecte toxice pe care le manifestă acest compus asupra organelor umane, iar tabelul 3 relevă predicții cu privire la toxicitatea acestuia asupra mediului.

Datele prezentate în tabelul 1 relevă lipsa biodisponibilității orale a palmitoil-trimetil chitosanului, valorile probabilităților pentru absorbția intestinală și biodisponibilitate orală fiind negative. Compusul investigat nu este considerat ca fiind capabil să penetreze bariera hematoencefalică și în consecință nu afectează sistemul nervos central. De asemenea, compusul investigat nu este considerat substrat al glicoproteinei P, dar poate fi un inhibitor al acesteia ceea ce poate afecta expunerea sistemică a altor compuși prezenți în organismul uman.

Rezultatele prezentate în tabelul 2 arată că palmitoil-trimetil chitosanul nu are efect carcinogen, mutagen, nu afectează ochii și nu produce hepatotoxicitate. Acest compus poate manifesta efecte endocrine deoarece este posibil inhibitor pentru mai mulți receptori nucleari. De asemenea palmitoil-trimetil chitosanul ar putea avea potențial redus de cardiotoxicitate.

TABELUL 1. Predicții cu privire la absorbția și distribuția palmitoil-trimetil chitosanului în organismul uman

Efect biologic prezis	Probabilitatea predicției
Absorbția intestinală	0.9357-
Bariera hematoencefalică	0.7772-
Biodisponibilitate orală	0.7714-
Inhibitor al glicoproteinei P	0.7108
Substrat al glicoproteinei P	0.5302-

FILIP: : Prediction of the pharmacological profiles of palmitoyl-trimethyl chitosan

TABELUL 2. Predicții cu privire toxicitatea palmitoil-trimetil chitosanului asupra organismul uman

Efecte toxice prezise	Probabilitatea predicției
Efect carcinogen	0.9714-
Coroziunea ochilor	0.9880-
Iritarea ochilor	0.9116-
Efecte mutagen (testul Ames)	0.8300-
Cardiotoxicitate	0.4593-
Hepatotoxicitate	0.6750-
Inhibarea receptorului estrogen	0.7639+
Inhibarea redeptorului androgen	0.7272+
Inhibarea receptorului tiroidian	0.5658-
Inhibarea receptorului glucocorticoid	0.6125+
Inhibarea receptorului PPAR gamma	0.7031+

TABELUL 3. Predicții cu privire toxicitatea palmitoil-trimetil chitosanului asupra mediului inconjurator

Efect asupra mediului	Probabilitatea predicției
Toxicitatea pentru albine	0.5183-
Biodegradabilitatea	0.5750-
Toxicitatea acvatică pentru crustacee	0.7480+
Toxicitatea acvatică pentru pești	0.6737+

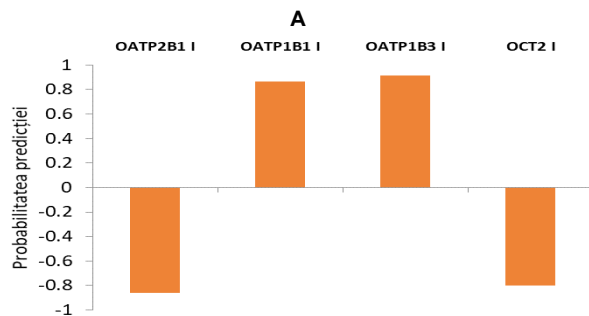
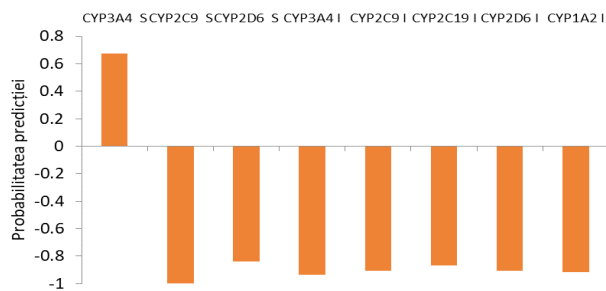


FIG. 5. (A) Probabilitățile ca palmitoil-trimetil chitosanul să fie substrat (S) sau inhibitor (I) al citocromilor (CYP) implicați în metabolizarea xenobioticelor; (B) probabilitățile ca palmitoil-trimetil chitosanul să influențeze activitatea transportorilor de anioni (OATP) și cationi (OCT) organici.

Figurile 5A și 5B ilustrează probabilitățile ca palmitoil-trimetil chitosanul să fie substrat sau inhibitor al citocromilor implicați în metabolizarea xenobioticelor, respectiv probabilitățile ca acest compus să influențeze activitatea transportorilor de anioni și cationi organici. Din figura 5 A rezultă că palmitoil-trimetil chitosanul este posibil substrat pentru citocromul CYP 3A4 și nu este substrat și nu inhibă alți citocromi, deci nu influențează metabolizarea altor xenobiotice care ar putea fi prezente în organismul uman. Figura 5 B ilustrează că palmitoil-trimetil chitosanul poate să inhibe transportorii de anioni organici OATP1B1 și OATP1B3. Acești transportatori se găsesc în ficat și au ca substraturi numeroși agenți terapeutici (Shitara, 2011). Acest lucru ne arată că palmitoil-trimetil chitosanul ar putea influența interacțiunea dintre agenții terapeutici și transportorii de anioni organici cu efecte negative asupra eficienței medicamentelor sau prin inducerea interacțiunilor dintre medicamentele care sunt administrate simultan.

Tabelul 3 ilustrează faptul că palmitoil-trimetil chitosanul are o biodegradabilitate scăzută și ar putea să manifeste efecte toxice asupra mediului apos.

CONCLUZII

Nu există date de literatură cu privire la efectele biologice și/sau adverse ale palmitoil-trimetil chitosanului, un excipient utilizat pentru medicamentele destinate tratării cancerului hepatic. Rezultatele obținute în cadrul prezentului studiu relevă că palmitoil-trimetil chitosanul are un profil farmacocinetic favorabil: nu afectează sistemul nervos central, nu produce hepatotoxicitate, nu are potențial cancerigen și mutagen, nu inhibă citocromii implicați în metabolizarea xenobioticelor și nici transportatorii de cationi organici. Pentru acest compus s-a identificat un potențial redus de cardiotoxicitate și disrupție endocrină, respectiv posibilitatea de a inhiba transportatorii de anioni organici OATP1B1 și OATP1B3 afectând astfel funcționarea acestora.

Mulțumiri

Prezentul studiu a fost realizat în cadrul proiectului PN3-P3-284 (ChitoWound). De asemenea mulțumesc Doamnei Prof. Dr. Habil. Adriana Isvoran pentru sfaturile utile oferite cu privire la conceperea și redactarea prezentului manuscris.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- Alan S., Michael P., Michael H. 2014. Chitosan, Human Vaccines & Immunotherapeutics Sci.10:3, 797-807.

FILIP: : Prediction of the pharmacological profiles of palmitoyl-trimethyl chitosan

- Bowman K., Leong K.W. 2006. Chitosan Nanoparticles for Oral Drug and Gene Delivery. *Int. J. Nanomed Sci.* 1:117–128.
- Baudner B.C., Morandi M., Giuliani M.M., et al. 2004. Modulation of immune response to group C meningococcal conjugate vaccine given intranasally to mice together with the LTK63 mucosal adjuvant and the trimethyl chitosan delivery system. *J Infect Dis Sci.*189(5):828–832.
- Chang H., Li X., Teng Y., et al. 2010. Comparison of adjuvant efficacy of chitosan and aluminum hydroxide for intraperitoneally administered inactivated influenza H5N1 vaccine. *DNA Cell Biol Sci.* 29(9): 563–568.
- Fernandes R., Bentley W.E. 2009. AI-2 biosynthesis module in a magnetic nanofactory alters bacterial response via localized synthesis and delivery. *Biotechnol Bioeng Sci.* 102:390–399.
- Gordon D., Kelley P., Heinzl S., Cooper P., Petrovsky N. 2014. Immunogenicity and safety of Advax™, a novel polysaccharide adjuvant based on delta inulin, when formulated with hepatitis B surface antigen: a randomized controlled Phase 1 study *Vaccine Sci.* 32(48): 6469–6477.
- Hongbin Y., Chaofeng L., Lixia S., Jie L., Yingchun C., Zhuang W., Weihua L., Guixia L., Yun T. 2018. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics.*
- Kumar M.N., Muzzarelli R.A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A. J. 2002. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev Sci.*104:6017–6084.
- Kumar V., Luz R. M.M., Yang D. 2002. Preparation, characterization, and tableting properties of a new cellulose-based pharmaceutical aid. *Int. J. Pharm Sci.* 235:129–140.
- Kim S., Chen J., Cheng T., Gindulyte A., He J., He S., Li Q., Shoemaker B.A., Thiessen P.A., Yu B., Zaslavsky L., Zhang J., Bolton E.E. 2019. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res Sci.* 47(D1):D1102-1109.
- Li I., Jabbal G.I., Hinchcliffe M., Fisher A.N., Davis S.S. 2002. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *AdvancedDrugDelivery Reviews Sci* 51:81–96.
- Munawar A.M., Jaweria T.M.S., Kishor M.W., Ellen K.W. 2017. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *College of Pharmacy and Nutrition, University of Saskatchewan, Saskatoon Sci:* 4(3):53.
- Mills K.H.G., Cosgrove C., McNeela E. A., Sexton A., Giemza R., Jabbal G.I., Church A., Lin W., Illum L., Podda A., et al. 2003. Protectivelevelsofdiphtheria-neutralizingantibodyinducedinhealthyvolunteers by unilateral priming-boosting intranasal immunization associated with restricted ipsilateral mucosal secretory immunoglobulin. *A Infect immun Sci.* 71:726–732.
- Majekodunmi S.O. 2016. Current development of extraction, characterization and evaluation of properties of chitosan and its use in medicine and pharmaceutical industry. *American Journal of Polymer Sci.* 6(3): 86-91.
- Snyman D., Hamman J.H., Kotze A.F. 2003. Evaluation of the mucoadhesive properties of N-trimethyl chitosan chloride. *Drug Dev Ind Pharm Sci.* 29(1):61–69.
- Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S. 2004. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *J. Pharm Sci.* 274:1–33.
- Vander L.I.M., Verhoef J.C., Borchard G., Junginger H.E. 2001. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv.Drug Deliv Sci.* 52:139–144.
- WHO. 2010. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, IVB Strategic plan 2010-15. Draft 24 March. Obtained from: www.who.int/entity/immunization/.../IVB_SP_2010-15_final_Ver.pdf [Accessed 23 July 2012].
- Wang J.J., Zeng Z.W., Xiao R.Z., Xie T., Zhou G.L., Zhan X.R., Wang S. L. 2011. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int. J. Nanomed Sci.* 6:765–774.

- Xia Y., Fan Q., Hao D., Wu J., Ma G., Su Z. 2015. Chitosan-based mucosal adjuvants: Sunrise on the ocean. *Vaccine Sci.* 33(44):5997–6010.