

تهیه و ارزیابی نانوذرات آلزینات سدیم حاوی پروتئین CRM₁₉₇ به روش ژلی شدن یونی

سمیرا آقامیری^۱، مجتبی نوفلی^{۲*}، حمید رضا گودرزی^۲، پروانه صفاریان^۱، زهرا صالحی نجف آبادی^۳

۱ گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲ گروه تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان آموزش و ترویج تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران

۳ گروه واکسن‌های باکتریایی انسانی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان آموزش و ترویج تحقیقات کشاورزی، کرج، ایران

چکیده: توسعه واکسن‌های نو ترکیب بر علیه بیماری‌های عفونی وابسته به شناسایی آنتی‌ژن‌های ایمنی‌زا و سیستم‌های انتقال واکسن مانند نانوذرات پلیمری است که قادر به تحریک پاسخ‌های ایمنی مشابه یا بیشتر از واکسن‌های معمولی و کاهش عوارض مرتبط با واکسن سنتی هستند. در پژوهش حاضر به ارزیابی سنتز و بررسی خصوصیات نانوذرات آلزینات سدیم حامل پروتئین CRM₁₉₇ به‌عنوان سیستم انتقال آنتی‌ژن پرداخته شد. سنتز نانوذرات بلانک بهینه شده بدون بارگذاری پروتئین و نانوذرات حاوی پروتئین به روش ژلی شدن یونی انجام شد. پس از طراحی آزمایش و تعیین فاکتورهای فیزیکی شیمیایی موثر در سنتز نانوذرات بهینه، اندازه، پتانسیل زتا، مورفولوژی، بازده کپسوله‌سازی، الگوی ره‌ایش و طیف‌سنجی FT-IR بررسی شدند. نانوذرات بهینه شده در غلظت آلزینات سدیم ۰.۲٪ w/v، کلرید کلسیم ۱٪ w/v و پلی‌ال- لایزین ۰.۴٪ w/v طی ۴۵ دقیقه هم‌زدن با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه و pH ۶/۵ تهیه شدند. متوسط اندازه نانوذرات و پتانسیل زتا برای نانوذرات بلانک و بارگذاری شده با CRM₁₉₇ به ترتیب ۸۸ و ۲۴۵ نانومتر و پتانسیل زتا ۲۱- و ۲۴/۲- میلی‌ولت بود. LE و LC به ترتیب بیش از ۸۰٪ و ۲۰٪ و ره‌ایش پروتئین از نانوذرات پایدار و طولانی مدت بود. عدم ایجاد علائم موضعی و سیستمیک و همچنین افزایش وزن در گروه موشی مورد مطالعه، نشان‌دهنده بی‌ضرر بودن ترکیب نانوذره و پروتئین بود. بر اساس نتایج فوق می‌توان از نانوذرات آلزینات به‌عنوان سیستم انتقال آنتی‌ژن جهت انتقال هدفمند همراه با آزادسازی کنترل شده، آهسته و بهبود پایداری آنتی‌ژن نو ترکیب دیفتری (CRM₁₉₇) جهت ایمن‌سازی در برابر بیماری دیفتری استفاده کرد.

واژگان کلیدی: CRM₁₉₇، سیستم انتقال آنتی‌ژن، نانوذرات آلزینات سدیم، ژلی شدن یونی.

* noofeli1234@yahoo.com

اگزوتوکسین آغاز می‌شود [۱]. میزان مرگ و میر مرتبط با این بیماری بین ۵ تا ۱۰ درصد و در کودکان زیر ۵ سال تا ۲۰٪ گزارش شده است [۲]. تنها راه پیشگیری از این بیماری مایه‌کوبی با واکسن حاوی توکسوئید دیفتری است که غیرسمی اما آنتی‌ژنیک و ایمنی‌زا است [۳]. جهت تولید متعارف توکسوئید دیفتری، از روش تیمار

۱- مقدمه

بیماری دیفتری^۱ یک بیماری حاد باکتریایی دستگاه تنفسی فوقانی است که با استقرار باکتری کورینه‌باکتریوم دیفتری^۲ در گلو و ترشح

² Corynebacterium diphtheria

¹ Diphtheria

شیمیایی با اضافه کردن فرمالدئید به توکسین سمی سوپه PW8 و آلومینیوم فسفات به عنوان یاور استفاده می‌شود [۴]. سم‌زدایی با فرمالدئید منجر به تخریب یا تغییر برخی از اپی‌توپ‌های B-cell و T-cell پروتئین می‌شود که باعث کاهش خاصیت آنتی‌ژنیسیته و ایمنی‌زایی آن می‌شود [۵]. یک روش جایگزین، استفاده از جهش-یافته غیر سمی توکسین دیفتری مانند CRM₁₉₇ است که نیاز به روش‌های شیمیایی غیرسمی کردن ندارد [۶، ۷]. یاورهای مبتنی بر آلومینیوم مانند آلومینیوم هیدروکساید یا آلومینیوم فسفات، غیر سمی و غیرآنتی‌ژنیک هستند اما دارای معایبی هستند از جمله عدم توانایی ایجاد ایمنی سلولی، ایجاد واکنش‌های موضعی مانند قرمزی، تورم و درد در محل تزریق، واکنش‌های عمومی مانند تب، لرز و درد بدن، القاء پاسخ‌های آنتی‌بادی IgE، عدم دفع مناسب آلومینیوم در کودکان مبتلا به بیماری مزمن کلیوی، عدم ایجاد پاسخ ایمنی کافی و مناسب در افراد مسن و افراد دارای نقص سیستم ایمنی که در آنها کاهش پاسخ آنتی‌بادی به آنتی‌ژن‌های وابسته به سلول T وجود دارد [۸، ۹]. بنابراین توسعه یاورهای کارا تر و نیز سیستم‌های کنترل شده برای دستیابی به پاسخ ایمنی بهتر و طولانی مدت در درجه نخست اهمیت قرار دارد. از سوی دیگر یکی از چالش‌های مهم در فرآیند درمان، رساندن دارو به محل هدف مورد نظر و حفظ دوز لازم و کافی در مدت زمان معین برای دستیابی به نتیجه بالینی مطلوب است [۱۰]. نانوذرات به عنوان سیستم‌های تحویل دارو و داشتن تأثیر محافظتی بر دارو یا آنتی‌ژن در برابر تخریب در شرایط فیزیولوژیکی سخت، رهایش کنترل شده و آزادسازی آهسته دارو، بهبود پایداری آنتی‌ژن، تحویل آنتی‌ژن به سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (APCs) و به عنوان یاور برای بهبود پاسخ‌های ایمنی از ارجحیت بسزایی برخوردار هستند [۱۱-۱۳]. نانوذرات مورد استفاده برای انتقال واکسن معمولاً دارای سه بخش مختلف هستند: ۱) مواد (هایی) که نانوذرات از آن تشکیل شده‌اند، از جمله پلیمرهای طبیعی، پلیمرهای مصنوعی، مواد معدنی، چربی‌ها و غیره (۲) بخش ایمنی‌زا یا عوامل تعدیل‌کننده ایمنی مانند آنتی‌ژن‌ها، واکسن‌های DNA، siRNA، سیتوکین‌ها و غیره (۳) لیگاندهای هدف‌گیری و تحریک‌کننده ایمنی که به سطح ذرات اضافه می‌شوند، مانند لیگاندهای اختصاصی ایمنی،

لیگاندهای خاص بافت، الگوهای مولکولی مرتبط با بیماری‌زایی (PAMPs) و غیره [۱۴، ۱۵]. انواع پلیمرهای طبیعی و مصنوعی در ساخت نانوذرات به عنوان سامانه‌های دارو یا آنتی‌ژن‌رسانی و به عنوان نسل جدید یاور به کار برده می‌شوند [۱۶]. به طور کلی برای انتخاب یک پلیمر مناسب می‌بایست به چندین خصوصیت توجه کرد، از جمله: میزان سمیت، حساسیت‌زایی، تأثیر پلیمر بر پاسخ ایمنی، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری [۱۷]. در میان نانوذرات پلیمری طبیعی، نمک آلزینات به دلیل پایداری بالا در دستگاه گوارش، سنتز آسان، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و عدم تجمع در هیچ یک از اندام‌های اصلی به طور فزاینده‌ای توجه را برای سیستم تحویل دارو و آنتی‌ژن به خود جلب کرده است [۱۸، ۱۹]. آلزینات (ALG) پلی‌ساکارید آنیونی است که از دیواره سلولی برخی از گونه‌های جلبک قهوه‌ای [۲۰] و همچنین چندین گونه باکتری استخراج می‌شود [۲۱]. آلزینات یک پلی‌مر خطی است که از مونومرهای D-β مانورونیک اسید (M) و L-α گلوکورونیک-اسید (G) تشکیل شده است که با پیوند ۴-۱ به هم متصل شده-اند [۲۲]. ترکیبات بلوک زنجیره‌های آلزینات می‌تواند تکرار ۴ آرایش GG، MM، GM و MG باشد و میزان سختی زنجیره با تعداد واحدهای M و G تغییر می‌کند [۲۳]. نانوذرات آلزینات را می‌توان با روش ژلی شدن یونی^۴ از طریق یون‌های کلسیم سنتز کرد. این روش دارای مزایایی از جمله تولید ذرات با اندازه کمتر از ۱۰۰۰ نانومتر که برای تزریق مناسب هستند، هزینه کم و عدم استفاده از حلال آلی در پروسه تولید، روش ساده بدون نیاز به تجهیزات تخصصی، توزیع محدود اندازه ذرات و بهینه‌سازی قابل تکرار جهت بهبود بازده و کارایی کپسوله کردن آنتی‌ژن است [۲۴]. در این روش یون‌های کلسیم و اتم‌های اکسیژن از گروه‌های کربوکسیل مونومرهای گلوکورونیک اسید پلیمر آلزینات منجر به تشکیل ساختار جعبه تخم‌مرغ^۵ می‌شوند. در نتیجه، شبکه‌ای از زنجیره‌های پلیمری متقاطع در قطره‌های مختلف تولید می‌گردند که می‌توانند مقادیر مختلفی از داروها و مولکول‌های زیستی را به دام بیندازند [۲۵]. علاوه بر این، خواص ژل‌های به دست آمده به شرایط فیزیکی، ترکیب آلزینات به ویژه تعداد بلوک‌های G، غلظت پلیمر آلزینات و عامل ایجادکننده اتصالات عرضی بستگی دارد [۲۶، ۲۷].

⁴ Ionic gelation method

⁵ Egg- box

¹ Adjuvant

² Antigen presenting cells

³ Pathogen- associated molecular patterns

نانوذرات آلژینات سدیم به عنوان حامل در حفظ و پایداری آنتی ژن در حین به دام افتادن داخل نانوذرات و نیز آزادسازی کنترل شده موفقیت آمیز و ایمنی زایی طولانی مدت واکسن ها نقش دارد [۲۸]. هدف از مطالعه حاضر، بهینه سازی ساخت نانوذرات آلژینات سدیم بارگذاری شده با پروتئین CRM197 به عنوان سیستم انتقال آنتی ژن و ارزیابی عوامل فیزیکی شیمیایی بر روی خواص نانوذرات سنتز شده بود.

۲- بخش تجربی

۲-۱- تست شناسایی پروتئین CRM197 به روش وسترن بلات

پروتئین تجاری CRM197 (D2189-250UG) از شرکت سیگما آلد ریچ تهیه شد. تست شناسایی، خلوص و وزن مولکولی پروتئین به روش SDS-PAGE و وسترن بلات انجام شد. ابتدا ۲۰ میکرولیتر از استوک CRM197 (رقیق شده و آماده استفاده) در چاهک های ژل SDS-PAGE ۱۰٪ همراه با نشانگر وزن مولکولی (آرمان بایوتک PM1500) بارگذاری شد. ژل به مدت ۲۰ دقیقه در ولتاژ ۱۲۰ ولت ران شد. در ادامه پروتئین از ژل به غشاء نیتروسولوز ۰/۴۵ mμ (آمرشام GE10600002) منتقل شد. سپس انکوباسیون غشاء با آنتی بادی پلی کلونال اولیه (آنتی بادی IgG موشی بر علیه DT) که در این مطالعه از موش ایمن شده با پروتئین CRM197 تهیه شده بود) و نیز آنتی بادی پلی کلونال تجاری بر علیه توکسوئید دیفتری (NIBSC ۱۸/۱۸۰) رقیق شده به نسبت ۱:۱۰۰۰ به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر انجام شد. در ادامه غشاء با آنتی بادی مونوکلونال ثانویه کونژوگه با Horseradish peroxidase (HRP) (بیوتک Cat. No: HAF007) (IgG مونوکلونال برضد IgG موشی یا خرگوشی کونژوگه شده با HRP) که به میزان ۱:۱۰۰۰۰ با بافر مسدود کننده رقیق شده بود، انکوبه و غشاء به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. در نهایت باندها با سوبسترا ۳،۳- دی آمینو بنزیدین (DAB) مشاهده شد.

۲-۲- تهیه نانوذرات بلانک (اصلاح نشده)

برای تهیه نانوذرات آلژینات از روش ژل سازی یونی که توسط Rajaonarivony و همکاران توصیف شده است [۲۹]، استفاده شد. ساختار و خواص نانوذرات با ایجاد تغییرات جزئی در غلظت پلیمر و عامل اتصال دهنده و شرایط فیزیکی تغییر می کند. بنابراین، تاثیر عوامل مختلف از جمله غلظت آلژینات سدیم، نمک کلسیم و محلول پلی-ال لایزین، pH و همچنین مدت زمان و سرعت هم زدن بررسی شدند. جهت تعیین اثرگذاری هر یک از عوامل مؤثر بر فرآیند بر مشخصه های خروجی از روش طراحی آزمایش استفاده شد. در ابتدا در هر آزمایش، فقط یک عامل متغیر و عوامل دیگر ثابت بودند (روش یک فاکتور در یک زمان) و در ادامه طراحی فاکتوریل انجام گردید. در طراحی فاکتوریل با ۵ فاکتور و ۳ سطح، تعداد کل آزمایشات مشتمل بر ۲۴۳ (۳^۵) مورد بود. بر اساس تحقیق فعلی و منابع موجود مبنی بر سطوح استفاده شده در هر فاکتور، تعداد سطوح مورد ارزیابی و تعامل و تاثیر هر یک از این سطوح در هر فاکتور بر دیگر سطوح و خروجی نهایی (اندازه، پتانسیل زتا و توزیع ذره)، طراحی نهایی با ۵ فاکتور (عامل) و ۲ سطح بر اساس طراحی فاکتوریل کسری انجام و نتایج با هم مقایسه شد که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. به منظور مطالعه یکی از پارامترهای فوق الذکر، سایر پارامترها ثابت نگه داشته شدند. غلظت های مختلف محلول کلسیم کلرید (۰/۳، ۰/۲، ۰/۱ W/V) به غلظت های مختلف محلول آلژینات سدیم (۰/۳، ۰/۲، ۰/۱ W/V) به صورت قطره قطره اضافه شد. در مرحله بعد، به منظور تغلیظ و تکمیل چگالش نمونه های پرژل، غلظت های مختلف PLL (۰/۱، ۰/۰۸، ۰/۰۴، ۰/۰۲ W/V) به محلول های پرژل اضافه شد. پس از تعیین غلظت مناسب پلیمر و اتصال دهنده، در نهایت اثر سرعت های مختلف همگن سازی (۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۸۰۰ rpm) و زمان های متفاوت همگن سازی (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه) و نیز pH های ۴، ۵/۶ و ۹ در دمای اتاق بر ویژگی ذرات مورد بررسی قرار گرفتند. شرایط بهینه شده ساخت نانوذرات بلانک از بین حالت های فوق الذکر ادامه پیدا کرد. سپس سوسپانسیون حاصل در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی-گراد سانتریفیوژ (5417R اپندورف، آلمان) شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب بدست آمده انجماد خشک (لیوفیلیزه) شد.

² Fractional factorial design

¹ Factorial design

جدول ۱. فاکتورهای متغیر فیزیکی شیمیایی مورد استفاده برای تشکیل نانوذرات مبتنی بر طراحی فاکتوریل

ردیف	غلظت آلژینات سدیم (% w/v)	غلظت کلسیم کلرید (% w/v)	زمان (دقیقه)	سرعت (rpm)	pH
۱	۰/۲	۰/۲	۴۵	۱۵۰۰	۶/۵
۲	۰/۱	۰/۲	۴۵	۲۰۰۰	۶/۵
۳	۰/۲	۰/۱	۴۵	۱۵۰۰	۹/۰
۴	۰/۲	۰/۲	۳۰	۲۰۰۰	۶/۵
۵	۰/۲	۰/۲	۴۵	۲۰۰۰	۹/۰
۶	۰/۱	۰/۱	۳۰	۱۵۰۰	۹/۰
۷	۰/۲	۰/۱	۴۵	۲۰۰۰	۶/۵
۸	۰/۱	۰/۲	۳۰	۲۰۰۰	۹/۰
۹	۰/۱	۰/۱	۴۵	۱۵۰۰	۶/۵
۱۰	۰/۱	۰/۱	۴۵	۲۰۰۰	۹/۰
۱۱	۰/۱	۰/۲	۴۵	۱۵۰۰	۹/۰
۱۲	۰/۲	۰/۲	۳۰	۱۵۰۰	۹/۰
۱۳	۰/۲	۰/۱	۳۰	۲۰۰۰	۹/۰
۱۴	۰/۱	۰/۲	۳۰	۱۵۰۰	۶/۵
۱۵	۰/۲	۰/۱	۳۰	۱۵۰۰	۶/۵
۱۶	۰/۱	۰/۱	۳۰	۲۰۰۰	۶/۵

۲-۳- بارگذاری پروتئین CRM197 در نانوذرات آلژینات سدیم

محلول آبی کلسیم کلرید (۱/۰٪) به صورت قطره قطره به محلول آلژینات سدیم (۲/۰٪) حاوی غلظت های مختلف CRM197 (۲، ۴، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر) تحت سرعت همگن سازی ۲۰۰۰ rpm اضافه شد. سپس پلی-ال-لازین با غلظت ۰/۰۴ w/v به سوسپانسیون اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق همگن شد.

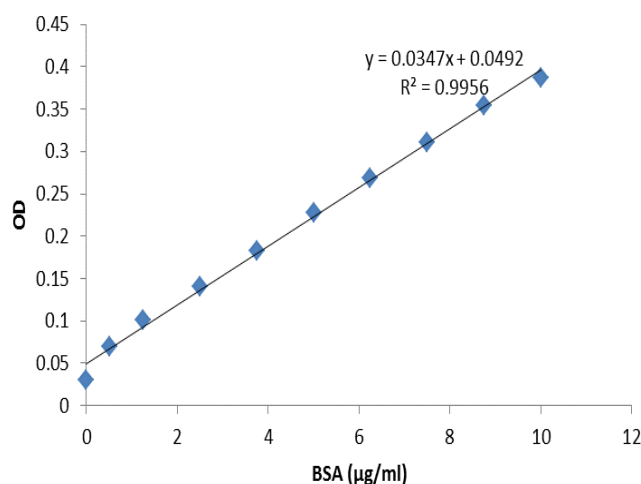
۲-۴- تعیین خصوصیات نانوذرات

مورفولوژی و خصوصیات ظاهری نانوذرات و بررسی وقوع تجمع در ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (لئو ۴۴۰i-) مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این توزیع اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات بلانک و بارگذاری شده با پروتئین توسط دستگاه زتاسایزر (ملورن، Zetasizer Nano ZS) با استفاده از تکنیک پراکندگی نور پویا در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد (DLS)

ارزیابی شدند. تکرارپذیری نتایج هم حداقل سه بار در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انجام شد.

۲-۵- بررسی کارایی احتباس^۱ و ظرفیت احتباس^۲

ظرفیت احتباس و کارایی احتباس برای ارزیابی توانایی نانوذرات جهت محصور کردن پروتئین CRM197 در غلظت های مختلف CRM197، به طور غیرمستقیم، با تعیین CRM197 آزاد در محلول رویی اندازه گیری شد. برای تعیین کارایی احتباس و ظرفیت احتباس نانوذرات ساخته شده، از روش سنجش مقدار پروتئین آزاد موجود در محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ نانوذرات به روش سنجش برادفورد استفاده شد. منحنی استاندارد با استفاده از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) تهیه شد (نمودار ۱).



نمودار ۱. منحنی استاندارد تست برادفورد با آلبومین سرم گاوی (BSA)

در ادامه سوسپانسیون نانوذرات با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ و سپس محلول رویی جداسازی شد. نانوذرات ته نشین شده به مدت یک شب در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد خشک و پس از آن توزین شدند. در ادامه مقدار پروتئین CRM197 در محلول رویی با روش پروتئین سنجی برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر برآورد شد. در این روش، غلظت CRM197 با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد. مقدار پروتئین باقی مانده در نانوذرات با کم کردن مقدار پروتئین آزاد از کل پروتئین مورد استفاده برای تهیه نانوذرات محاسبه گردید. در نهایت ظرفیت احتباس و کارایی احتباس با استفاده از معادلات

² Loading capacity

¹ Loading efficiency

زیر محاسبه شدند:

$$\text{Loading efficiency} = \frac{\text{Total amount of protein} - \text{Free protein}}{\text{Total amount of protein}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Loading Capacity} = \frac{\text{Total amount of protein} - \text{Free protein}}{\text{Dried nanoparticles weight}} \times 100 \quad (2)$$

۲-۶- آزادسازی پروتئین CRM197 در شرایط برون تن^۱

میزان رهایش پروتئین از نانوذرات در فسفات بافر سالین (PBS) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید. آزادسازی پروتئین از نانوذرات در شرایط برون تن با حل کردن ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه نانوذرات خشک شده در PBS، به طور جداگانه (۰/۰۱ مولار، ۷/۴ pH) بررسی شد. هر سوسپانسیون نانوذرات حاوی پروتئین به طور مساوی به ده میکروتیوب تقسیم شد و در انکوباتور شیکر (۱۰۰ سیکل در دقیقه) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در فواصل زمانی از پیش تعیین شده (۰، ۲، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت)، یک میکروتیوب از هر نمونه برداشته شد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مقدار پروتئین آزاد شده در مایع رویی به روش برادفورد با توجه به مقدار کل پروتئین بارگذاری شده محاسبه گردید.

۲-۷- مشخصه یابی نانوذرات حاوی پروتئین CRM197 به روش طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه^۲

جهت بررسی و آنالیز واکنش متقابل بین پلیمر، کلسیم کلرید و پروتئین در نانوذرات بلانک و نانوذرات حاوی پروتئین، از دستگاه طیف‌سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (بروکر، ALPHA II) جهت بررسی نمونه‌های تهیه شده استفاده شد. برای این منظور، سوسپانسیون نانوذره تهیه شده، لیوفیلیزه و سپس به آرامی با ۳۰۰ میلی‌گرم پودر KBr مخلوط شد. در ادامه با پرس‌کننده دستی به مدت ۲ دقیقه با نیروی ۱۰ کیلونیوتن فشرده شدند. برای هر طیف،

یک اینترفروگرام اسکن ۲۵۶ با وضوح 4 cm^{-1} در منطقه IR میانه در دمای اتاق جمع‌آوری شد.

۲-۸- بررسی ضایعات احتمالی آسیب‌شناسی در بافت‌های هدف در گروه موشی ایمن شده به منظور بررسی بی‌ضرری ترکیبات نانوذره

در راستای ارزیابی بی‌ضرری^۳ ترکیبات ساخته شده، منطبق بر دستورالعمل‌های بین‌المللی، ارزیابی Safety pharmacology در قالب بررسی بافت‌های حیاتی و نیز اثرات موضعی^۴ و عمومی انجام گردید. گروه‌های ده‌تایی موش BALB/c ماده با سن ۸-۶ هفته و وزن ۱۸-۲۲ گرم که در شرایط GLP^۵ نگهداری می‌شدند، شامل یک گروه شاهد دریافت‌کننده PBS، یک گروه دریافت‌کننده نانوذرات آلژینات به تنهایی و یک گروه دریافت‌کننده نانوذرات بارگذاری شده با CRM197 معادل واکسن دوگانه خردسال انتخاب گردیدند. گروه‌ها سه دوز زیرجلدی از ترکیبات فوق‌الذکر را در فواصل دو هفته‌ای دریافت کردند. در طی ارزیابی پاسخ ایمنی پس از دوزهای اول، دوم و سوم در گروه‌های فوق، وزن‌گیری و علائم بالینی نیز در طی روزهای اول، سوم و هفتم پس از هر تزریق، ثبت و مورد مطالعه قرار گرفتند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج

۳-۱-۱- شناسایی پروتئین CRM197

پس از تهیه پروتئین CRM197 به صورت تجاری، تست وسترن بلات جهت شناسایی و تایید پروتئین و تعیین وزن مولکولی انجام شد. SDS-PAGE و وسترن بلات پروتئین CRM197 (شکل ۱)، وزن مولکولی محدوده مورد نظر را بر اساس کالیبراسیون مارکر پروتئینی نشان می‌دهد که با وزن مولکولی پروتئین و وزن مولکولی مشخص شده در بروشور پروتئین همخوانی داشت. محاسبه وزن مولکولی پروتئین بر اساس کالیبراسیون مبتنی بر Rf value طبق فرمول ذیل انجام گردید:

⁴ Local reaction

⁵ Good Laboratory Practice

¹ In vitro

² Fourier- transform infrared spectroscopy

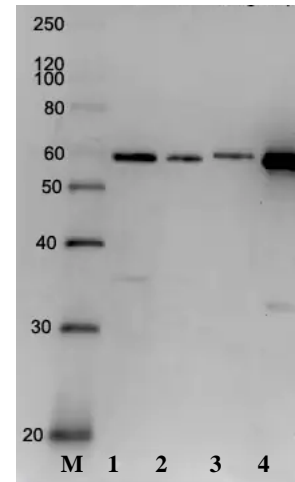
³ Safety

۳-۱-۲- تاثیر فاکتورهای فیزیکی شیمیایی بر روی سنتز نانوذرات

پارامترهای مهم برای تهیه نانوذرات بهینه با توجه به اندازه ذرات، PDI و پتانسیل زتا به دست آمده توسط دستگاه DLS انتخاب شدند. با توجه به تاثیر غلظت های مختلف آلژینات سدیم و کلسیم کلرید بر خواص نانوذرات، غلظت های بیشتر از ۰.۲ w/v از آلژینات سدیم منجر به افزایش قابل توجه اندازه نانوذرات بلانک و حاوی پروتئین می شود (شکل ۲ الف). PDI نانوذرات در غلظت کمتر و بیشتر از ۰.۲ w/v آلژینات از محدوده مطلوب دور شد (شکل ۲ ب). در حالیکه در غلظت های کمتر و بیشتر از ۰.۲ w/v آلژینات سدیم، مقادیر پتانسیل زتا کاهش یافت (شکل ۲ ج).

تغییر غلظت کلسیم کلرید نشان داد که با افزایش غلظت کلسیم کلرید از ۰.۱ w/v تا ۰.۳ w/v، اندازه نانوذرات کاهش یافته (شکل ۳ الف) مناسب ترین سطح PDI که مقدار ۰.۵ است، در غلظت ۰.۱ w/v کلسیم کلرید حاصل شد و در غلظت های بیشتر یا کمتر مقدار PDI از محدوده ۰.۵ فاصله گرفت (شکل ۳ ب) و پتانسیل زتا نانوذرات بلانک و حاوی پروتئین به صفر نزدیک تر شد (شکل ۳ ج).

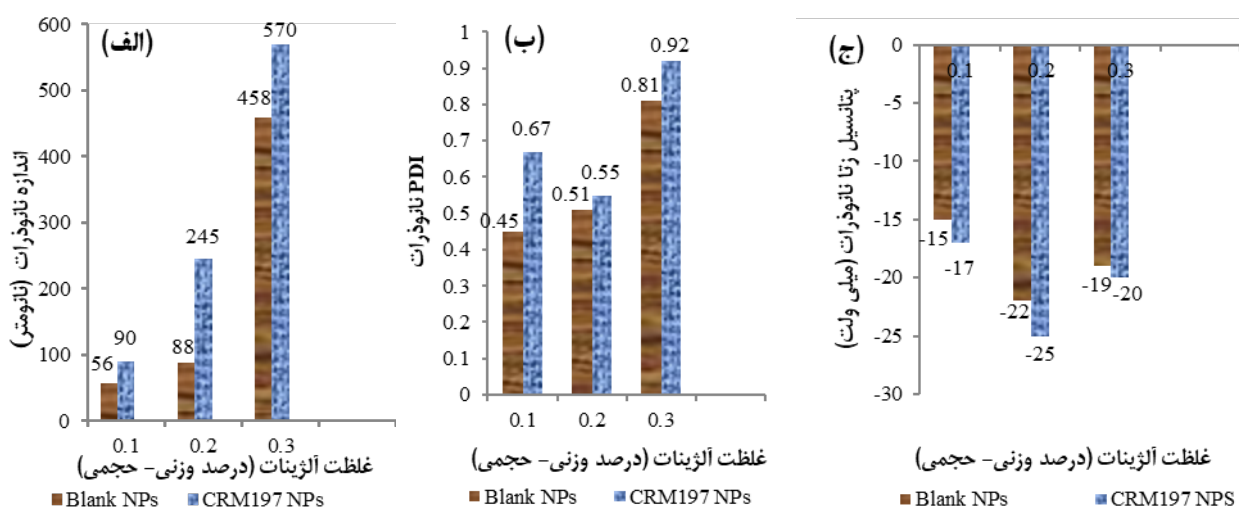
نتایج نشان داد با افزایش غلظت PLL، اندازه نانوذرات افزایش می یابد (شکل ۴ الف). در غلظت بیشتر و یا کمتر از ۰.۴ w/v مقادیر PDI نانوذرات بیشتر از ۰.۵ شده است که با حد مطلوب PDI فاصله دارد (شکل ۴ ب). بر اساس نتایج DLS، مطلوبترین



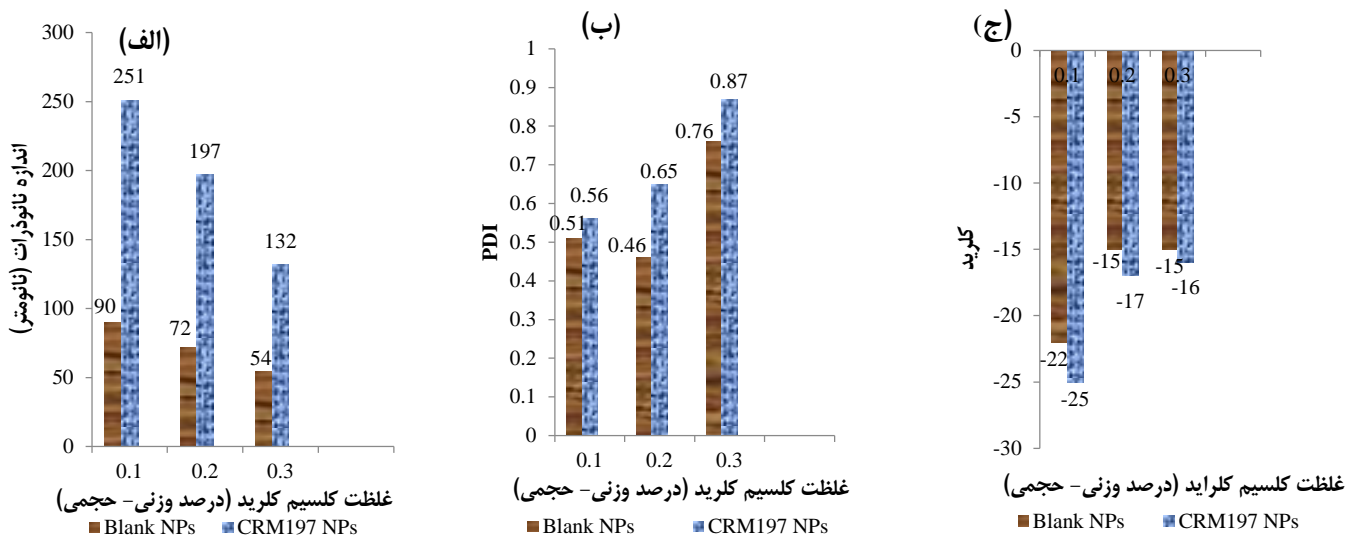
شکل ۱. الگوی وسترن بلاتینگ نمونه های توکسوئید دیفتری و CRM197 با استفاده از آنتی بادی استاندارد بر علیه آنتی ژن دیفتری. M: مارکر پروتئین، ۱: توکسوئید دیفتری تخلیص شده (بعد از دیافیلتراسیون)؛ ۲: توکسوئید استاندارد؛ ۳: CRM197 تجاری؛ ۴: توکسوئید دیفتری تغلیظ شده

$$Rf = d1/d2 \quad (۳)$$

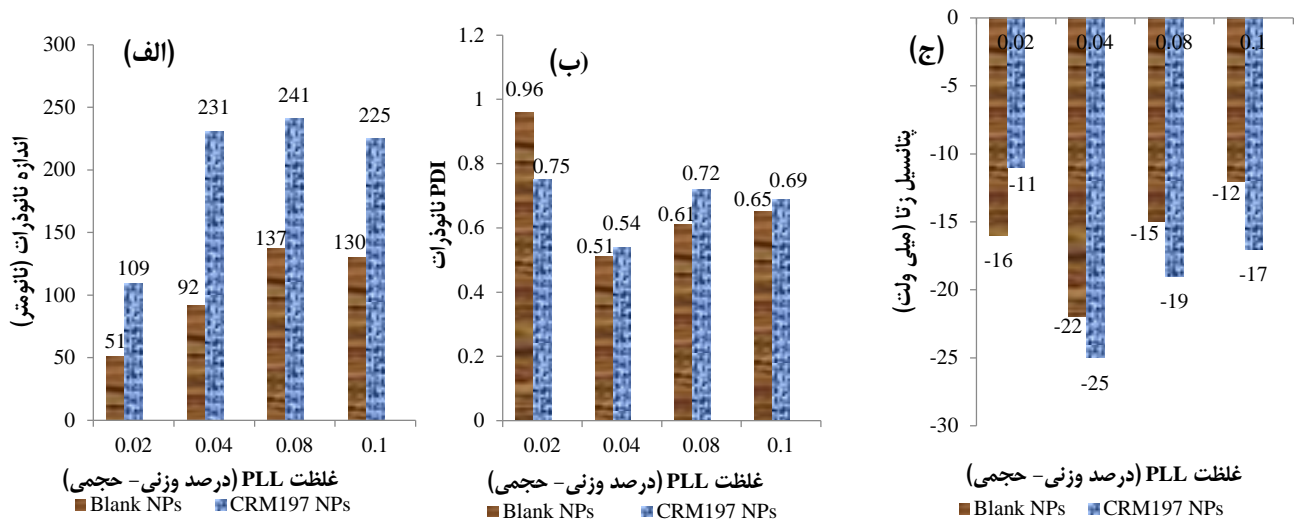
که در آن خطوط مرجع در بالا و پائین ژل کشیده می شود و فاصله از خط مرجع فوقانی تا وسط باند پروتئین مارکر با نام d1 و فاصله از خط مرجع فوقانی تا خط مرجع تحتانی را d2 نامگذاری گردید. با تعیین نقاط و اتصال آنها به هم، کالیبراسیون پروتئین مارکر مربوطه کشیده شد که با توجه به آن اندازه پروتئین CRM197 محدود به ۵۸/۴ کیلودالتون محاسبه گردید. نتایج وسترن بلاتینگ موید واکنش متقابل آنتی ژن نو ترکیب CRM197 با آنتی بادی استاندارد (بر علیه توکسوئید دیفتری) و نیز آنتی بادی تهیه شده در این مطالعه بر علیه CRM197 بود.



شکل ۲. تاثیر غلظت های مختلف آلژینات سدیم بر روی نتایج DLS (الف) اندازه نانوذرات (ب) PDI (ج) پتانسیل زتا



شکل ۳. تاثیر غلظت های مختلف کلسیم کلرید بر روی نتایج DLS (الف) اندازه (ب) PDI (ج) پتانسیل زتا



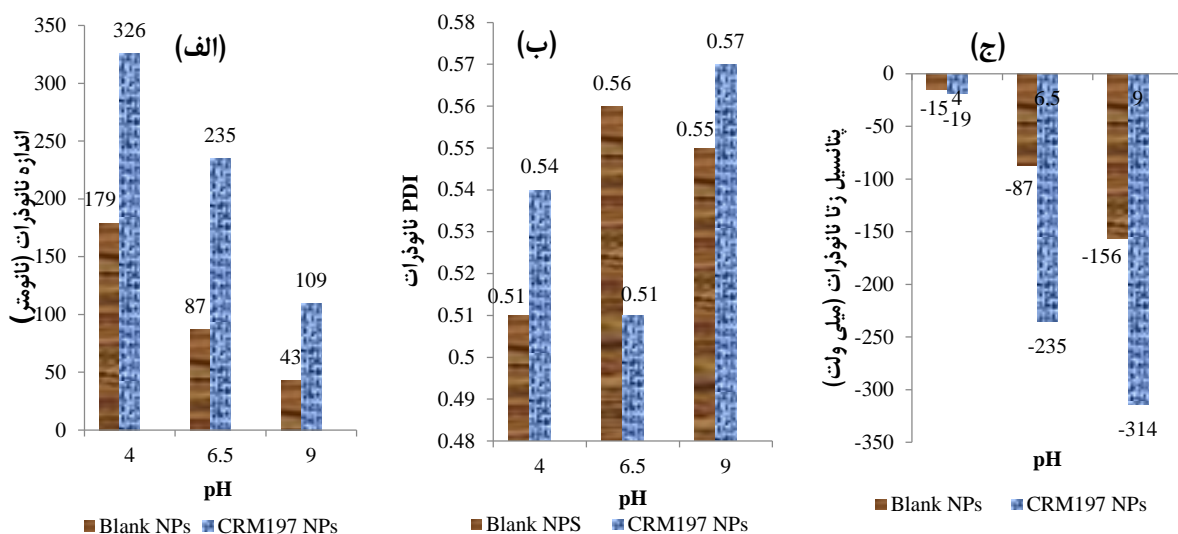
شکل ۴. تاثیر غلظت های مختلف PLL بر روی نتایج DLS (الف) اندازه (ب) PDI (ج) پتانسیل زتا

آلژینات یونیزه می شوند و با افزایش pH به سمت قلیایی شدن میزان بار منفی و پتانسیل زتا افزایش می یابند (شکل ۵ج).

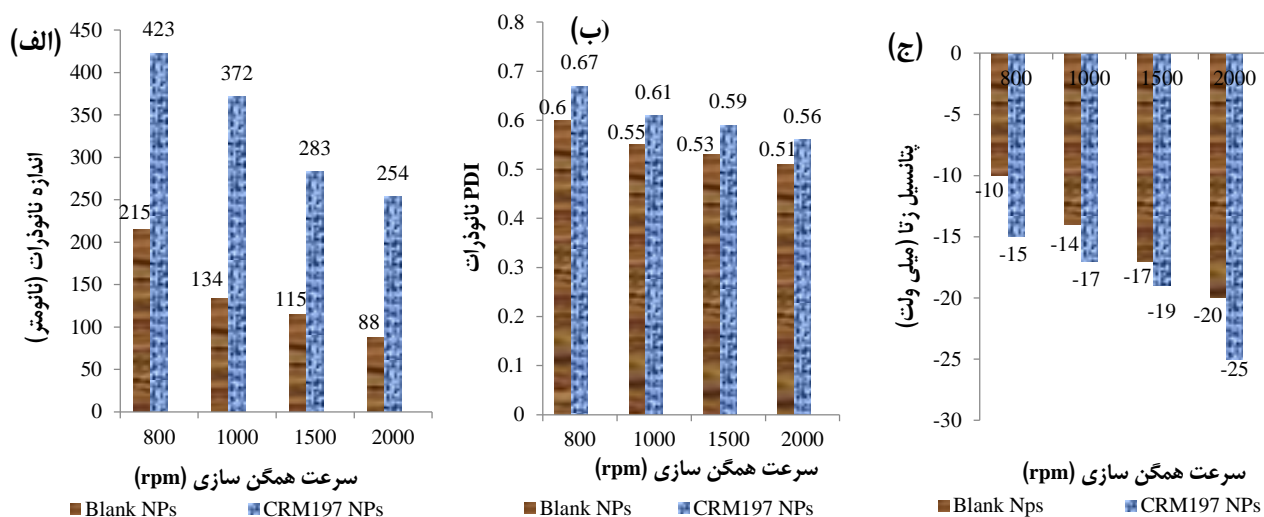
اثر سرعت های مختلف هم زدن که اغلب در کنترل اندازه ذرات موثر است در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج این بررسی نشان داد که افزایش سرعت هم زدن از ۸۰۰ دور در دقیقه تا ۲۰۰۰ دور در دقیقه منجر به کاهش اندازه نانوذرات می شود. اندازه مطلوب و بهینه برای نانوذرات شاهد و بارگذاری شده با پروتئین، در سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه حاصل شد (شکل ۶الف). سرعت هم زدن تأثیرات کمی بر روی PDI نانوذرات داشت و تفاوت زیادی با مقدار بهینه از خود نشان نداد (شکل ۶ب). در سرعت های کمتر از ۲۰۰۰ دور در دقیقه، مقادیر پتانسیل زتا از ۲۰ میلی ولت کمتر شد (شکل ۶

غلظت PLL معادل ۰.۴ w/v / ۰٪ ارزیابی شد. علاوه بر این، در غلظت های PLL انحراف یافته از غلظت ۰.۴ w/v / ۰٪، مقادیر پتانسیل زتا به کمتر از ۲۰ میلی ولت می رسد که از حالت پایدار مشاهده شده برای ۰.۴ w/v / ۰٪ فاصله دارد (شکل ۴ج).

بررسی تاثیر pH های اسیدی، خنثی و قلیایی بر روی خصوصیات فیزیکی نانوذرات نشان داد با کاهش pH، میانگین اندازه نانوذرات به دلیل رسوب و تجمع بخش قابل توجهی از آلژینات، افزایش می یابد و با افزایش pH به سمت قلیایی شدن، اندازه نانوذرات کاهش یافت (شکل ۵الف). معهذ با تغییر pH، مقادیر PDI تغییر معناداری نداشت (شکل ۵ب). با توجه به اینکه pKa آلژینات بسته به منبع آن ۳/۴-۴/۴ می باشد، در pH > pKa گروه های کربوکسیلات



شکل ۵. تاثیر pH های مختلف بر روی نتایج DLS (الف) اندازه (ب) PDI (ج) پتانسیل زتا



شکل ۶. تاثیر سرعت های مختلف همگن سازی بر روی نتایج DLS (الف) اندازه نانوذرات (ب) PDI (ج) پتانسیل زتا

آلژینات سدیم، غلظت ۱ w/v / ۰٪ کلسیم کلرید، غلظت ۱ w/v / ۰٪ پلی ال-لایزین با سرعت همگن سازی ۲۰۰۰ rpm به مدت ۴۵ دقیقه و pH معادل ۶/۵ به عنوان شرایط بهینه و مطلوب برای تولید نانوذرات آلژینات سدیم بلانک و بارگذاری شده با پروتئین بر اساس مطالعه و طراحی یک فاکتور در یک زمان^۱ و فاکتوریل شناسایی شدند.

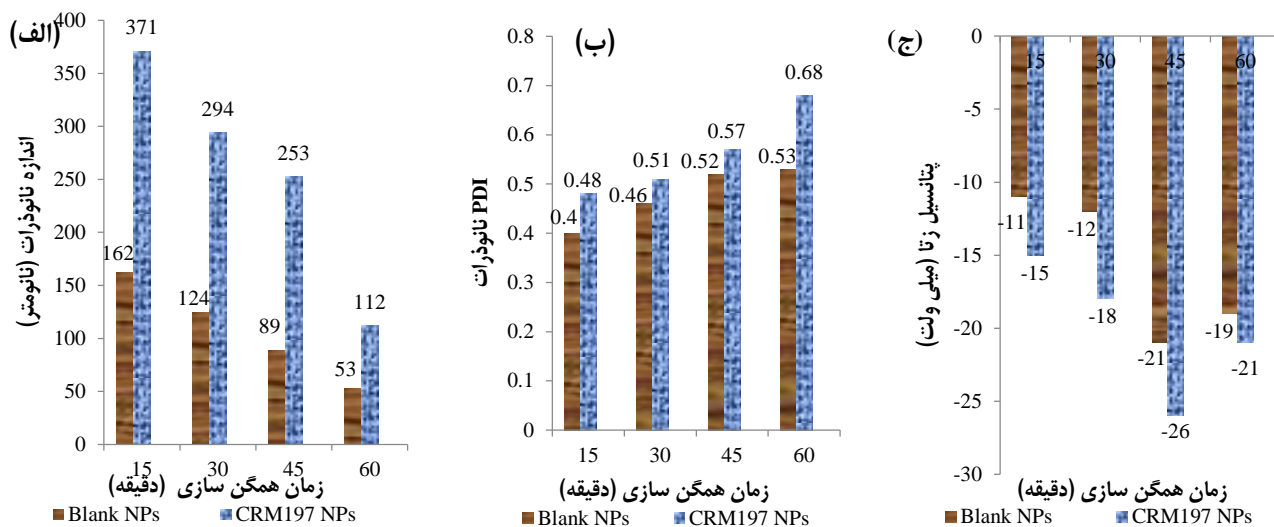
۳-۱-۳- تعیین مشخصات نانوذرات

همان طور که در شکل ۸ مشاهده می شود، ویژگی های مورفولوژیکی نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی

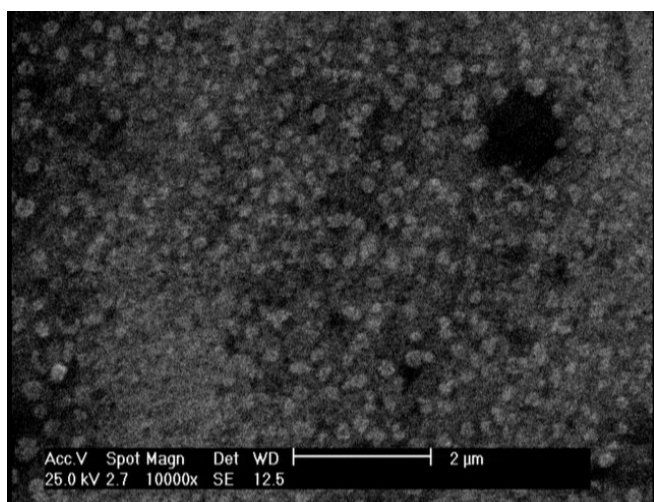
(ج). همچنین مشاهده گردید که مطابق شکل ۷ اثرات زمان هم زدن بر روی اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانوذرات تقریباً مشابه سرعت هم زدن بود. بر اساس نتایج به دست آمده، مدت زمان هم زدن مناسب برای به دست آوردن نانوذرات بهینه، ۴۵ دقیقه در نظر گرفته شد. با افزایش مدت زمان هم زدن، اندازه نانوذرات کاهش یافت (شکل ۷ الف). PDI نانوذرات بلانک و بارگذاری شده با پروتئین در مدت زمان هم زدن ۴۵ دقیقه، در محدوده ۰/۵ بوده که محدوده مناسب برای PDI نانوذرات است. در زمان های کمتر و بیشتر از ۴۵ دقیقه، محدوده PDI از محدوده ۰/۵ فاصله گرفت (شکل ۷ ب). و همچنین با افزایش مدت زمان هم زدن، پتانسیل زتا افزایش یافت (شکل ۷ ج). بر اساس جدول ۱، ردیف ۷، غلظت ۲ w/v / ۰٪

² Scanning electron microscopy

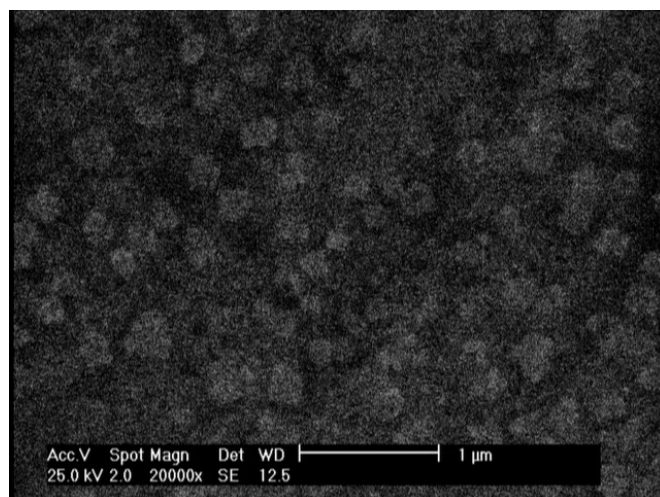
¹ One factor at a time



شکل ۷. تاثیر زمان های مختلف همگن سازی بر روی نتایج DLS (الف) اندازه نانوذرات (ب) PDI (ج) پتانسیل زتا



(الف)



(ب)

شکل ۱۰. تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM (الف) نانوذرات بلنک (ب) نانوذرات حاوی پروتئین

ترتیب به بیش از ۲۰٪ و ۸۰٪ افزایش یافت (نمودار ۲). کپسوله شدن پروتئین داخل نانوذرات به دلیل تعامل پروتئین با گروه های هیدروکسیل زنجیره های آلزینات از طریق تشکیل پیوندهای هیدروژنی و الکترواستاتیک می باشد.

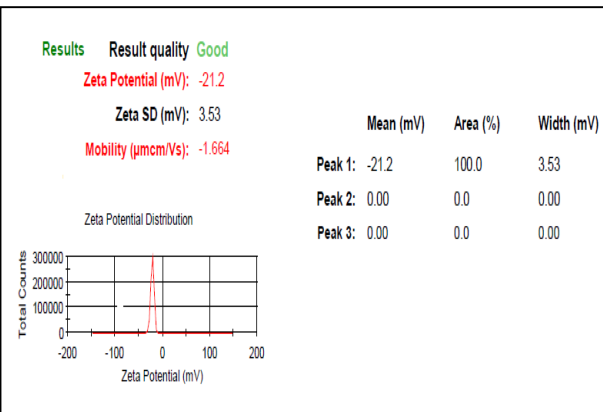
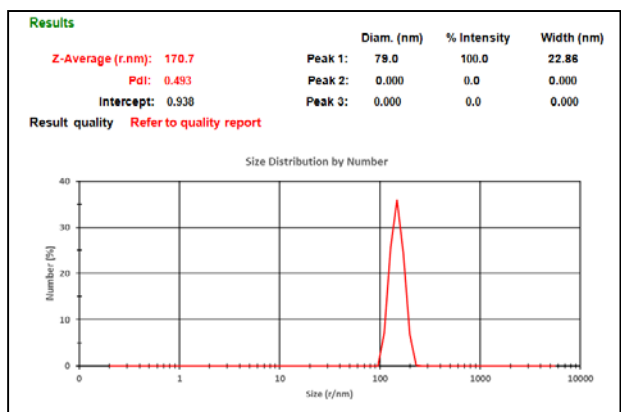
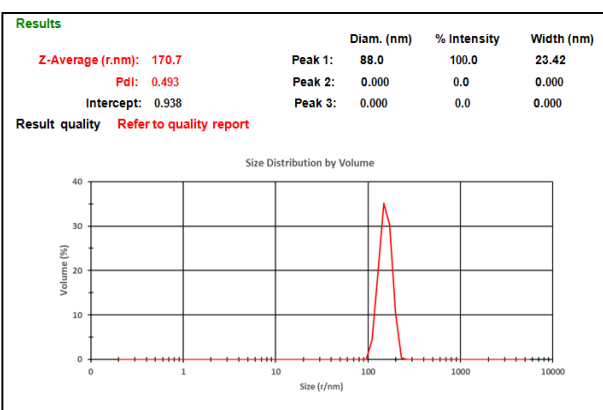
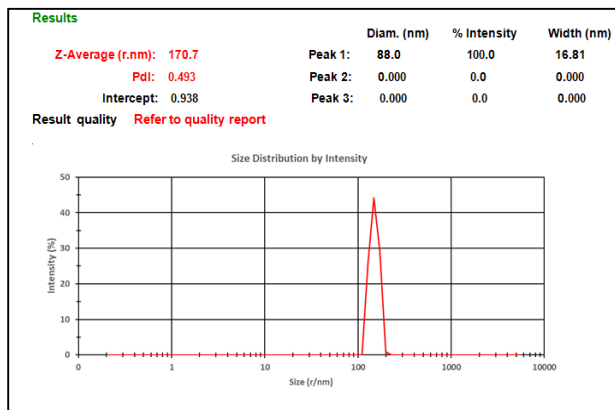
۳-۱-۵- رهایش پروتئین از نانوذرات در شرایط برون تن

آزادسازی پروتئین از نانوذرات با استفاده از بافر فسفات (pH ۷/۴) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۹۰ ساعت انجام شد. نتایج رهایش و آزادسازی پروتئین بیانگر آزادسازی پایدار و ثابت پروتئین

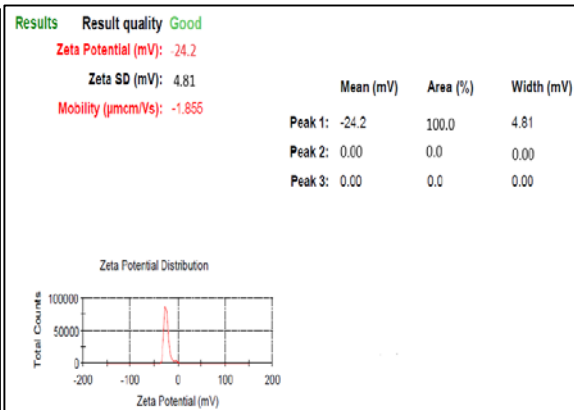
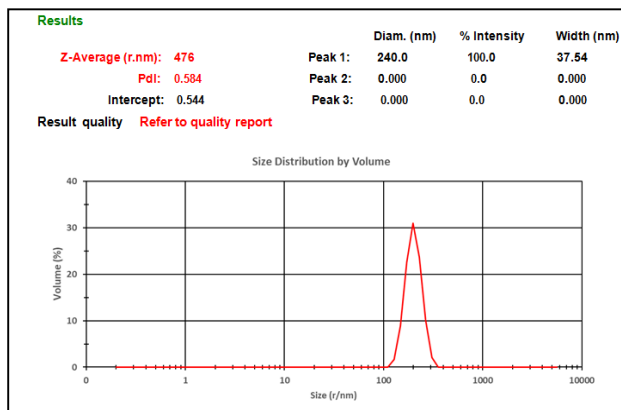
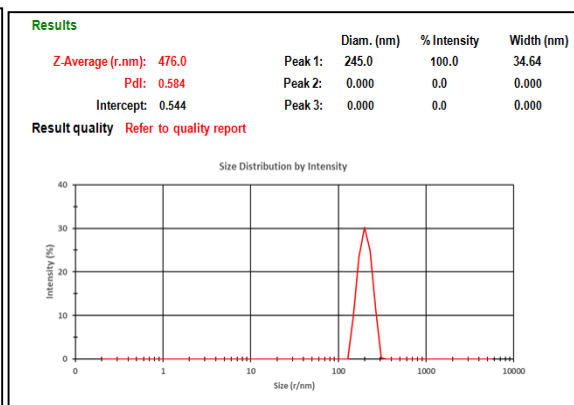
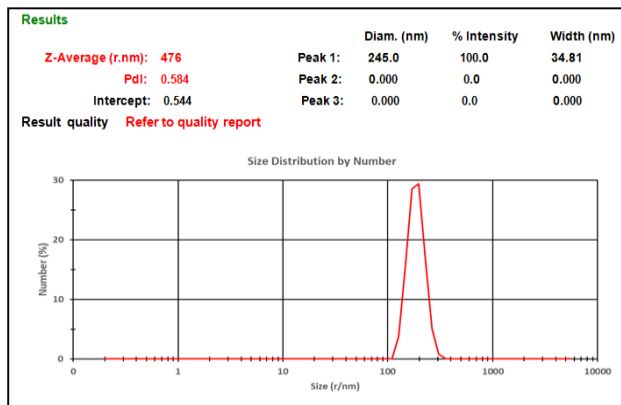
شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی بیانگر کروی و یکنواخت بودن سطح نانوذرات تولید شده در شرایط بهینه بدون اثر تجمعی بود. نتایج DLS نشان داد که نانوذرات بلنک بهینه شده دارای اندازه متوسط ۸۸ نانومتر با PDI معادل ۰/۴۹۳ و پتانسیل زتا ۲۱- میلی ولت بودند (شکل ۹). اندازه متوسط، PDI و پتانسیل زتا نانوذرات پس از انکپسوله شدن پروتئین به ترتیب ۲۴۵ نانومتر، ۰/۵۸۴ و ۲۴/۲- میلی ولت تغییر کرد (شکل ۱۰).

۳-۱-۴- ظرفیت احتباس و کارایی احتباس

با افزایش غلظت پروتئین، ظرفیت احتباس و کارایی احتباس به

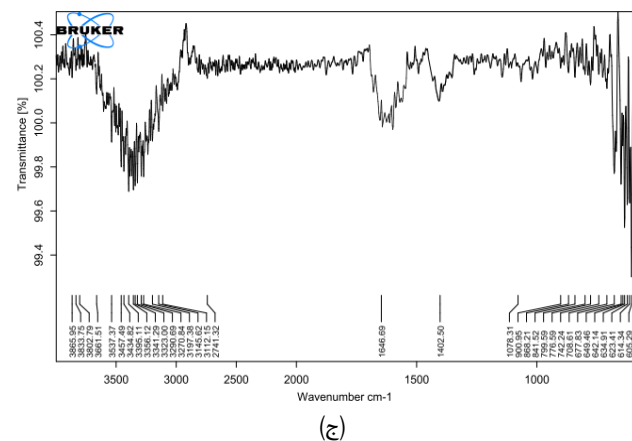
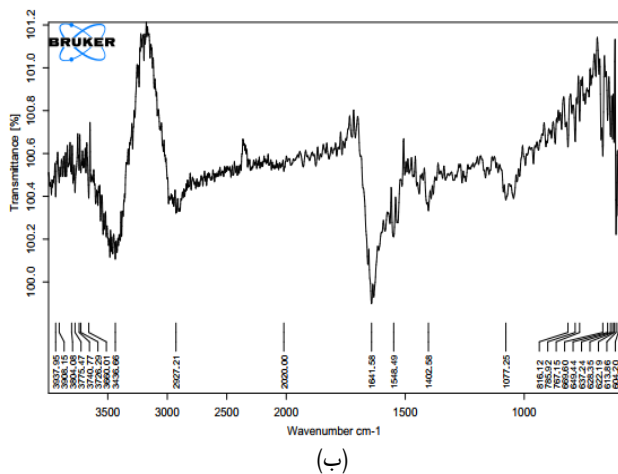
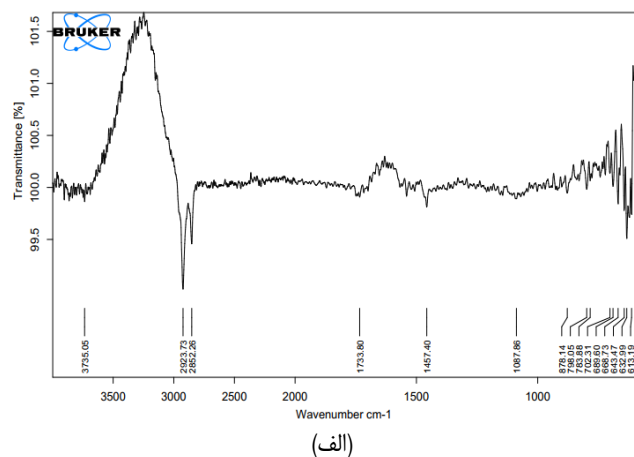


شکل ۹. توزیع اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات آلزینات فاقد پروتئین در شرایط بهینه

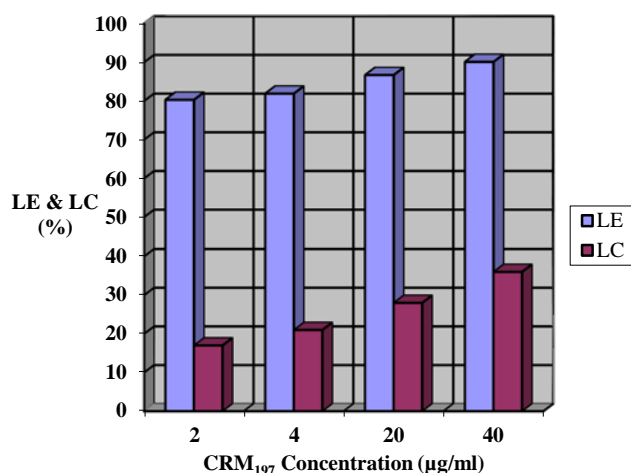


شکل ۱۰. توزیع اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات آلزینات حاوی پروتئین CRM₁₉₇ در شرایط بهینه

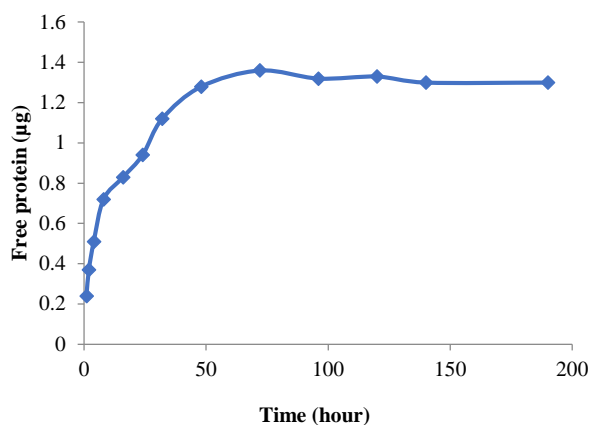
پروتئین تغییراتی را در گروه آمین، کربوکسیل و امید نشان دهنده برهم کنش یونی بین گروه کربونیل آلزینات و گروه آمین پروتئین است. بدین ترتیب، نتایج بدست آمده از FTIR، انکپسوله شدن پروتئین را داخل نانوذرات را تایید می کند. طیف FTIR نانوذرات فاقد پروتئین، پروتئین CRM₁₉₇ و نانوذرات بارگذاری شده با پروتئین در شکل ۱۱ نشان داده شده است.



شکل ۱۱. طیف FTIR نانوذرات بلانک و نانوذرات بارگذاری شده با پروتئین (الف) نانوذرات بلانک (ب) پروتئین CRM₁₉₇ (ج) نانوذرات بارگذاری شده با CRM₁₉₇



نمودار ۲. اثر غلظت های متفاوت CRM₁₉₇ بر روی کارایی احتباس و ظرفیت احتباس نانوذرات بارگذاری شده با پروتئین



نمودار ۳. نمودار رهایش پروتئین CRM₁₉₇ در شرایط برون تن

بود. بر طبق نمودار ۳، فرایند رهایش آنتی ژن در ۴۸ ساعت نخست، آهسته و پیوسته بود و تا ساعت ۹۶ با شیب ثابت و ملایم پیش رفت. تقریباً ۹۵٪ از آنتی ژن تا ۱۲۰ ساعت نخست آزاد شد. از ساعت ۱۲۰ میزان رهایش کاهش یافت و در ساعت ۱۴۰ عملاً رهایش به صفر رسید. نمایش پایدار و ثابت رهاسازی پروتئین می تواند به دلیل پیوندها و اتصالات بین نانوذره و پروتئین و از خواص نانوذرات آلزینات باشد. همچنین وجود لایه پلی ال-لیزین می تواند پایداری نانوذرات را افزایش داده و منجر به انتشار آهسته پروتئین از نانوذرات شود.

۳-۱-۶- مشخصه یابی نانوذرات حاوی پروتئین CRM₁₉₇ با استفاده از طیف سنج مادون قرمز تبدیل

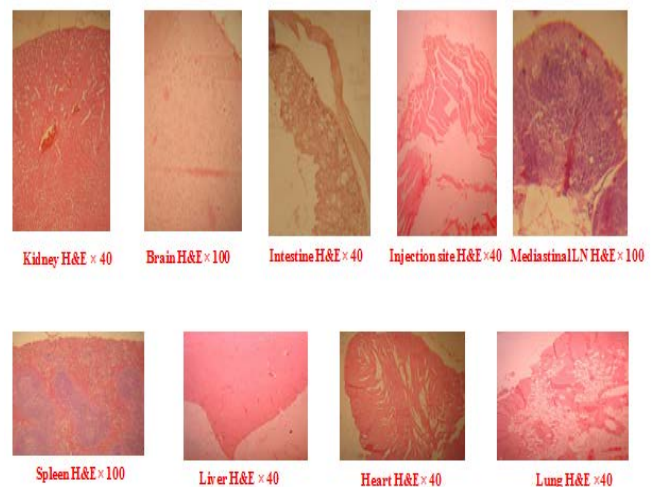
فوریه

بررسی طیف نانوذرات فاقد پروتئین و نانوذرات بارگذاری شده با

۳-۱-۷- نتایج بی‌ضرری نانوذرات حاوی پروتئین

۳-۲- بحث

نتایج ثبت وزن‌گیری در گروه موشی مورد مطالعه نشان‌دهنده افزایش وزن بالای ۹۵ درصد (بعضا ۹۸ درصد) درمقایسه با گروه شاهد (صد در صد افزایش وزن) پس از روزهای اول، سوم و به خصوص هفتم پس از هر بار تزریق بود. در طی تزریقات سه گانه و در فواصل یک، سه و هفت روز پس از هر تزریق در گروه مورد بررسی هیچ‌گونه علائم کلینیکی مبنی بر واکنش موضعی احتمالی (تورم یا قرمزی) یا عمومی (تب) که با ترمومتر دیجیتال اندازه‌گیری شد، مشاهده نگردید. یک هفته پس از تزریق دوز سوم، ارگان‌های حیاتی مثل قلب، کبد، کلیه، طحال و... در تمامی گروه‌ها (در فرمالین ۱۰٪) به منظور تاثیر توکسیک احتمالی ترکیبات ساخته شده بر هر یک از بافت‌های فوق‌الذکر، مورد ارزیابی بافتی (هیستولوژی) قرار گرفتند. به جز ارتشاح (اینفیلتراسیون) لنفوسیت‌ها در غدد لنفاوی و کمتر در کبد و طحال، تغییر پاتولوژیک دیگری رخ نداده بود که حاکی از فعالیت فیزیولوژیک سلول‌های ایمنی در ارگان‌های ایمنی در پاسخ به آنتی‌ژن می‌باشد. عدم تغییر پاتولوژیک بافتی در محل تزریق در ارزیابی اثر سمیت احتمالی ترکیبات ساخته شده در موضع تزریق (Local tolerance & reaction) نیز نشانگر بی‌ضرری این مواد بود. شکل ۱۲ تصاویر میکروسکوپی تهیه شده از بافت‌های مختلف است مربوط به گروه نانوذره حاوی آنتی‌ژن CRM₁₉₇ معادل دوز واکسن توام خردسال تجاری می‌باشد.



شکل ۱۲. ارزیابی بافتی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (میکروسکوپ نوری) ارگان‌های حیاتی در موش با تزریق نانوذره حاوی آنتی‌ژن معادل دوز واکسن تجاری توام خردسال

نانوذرات زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر به دلیل ایمنی و محافظت از آنتی‌ژن‌ها یا داروها در برابر تغییرات فیزیولوژیکی و محیطی، توجه زیادی را به عنوان سیستم انتقال آنتی‌ژن یا دارو به خود معطوف کرده‌اند [۳۰، ۳۱]. آلژینات یک پلیمر آبدوست است که آزادسازی آنتی‌ژن را طولانی‌تر کرده و به دلیل خاصیت یابوری ایمنی‌زایی را بیشتر از واکسن‌های مرسوم افزایش می‌دهد [۲۲، ۳۲]. در همین راستا به طور گسترده‌ای برای انتقال آنتی‌ژن، دارو، پروتئین و یا آنزیم مورد استفاده قرار می‌گیرد که مورد تایید FDA نیز می‌باشد. مطالعات انجام شده قبلی نشان داده است که غلظت محلول آلژینات و همچنین عامل ایجاد کننده اتصالات عرضی مانند کلسیم کلرید تاثیر چشمگیری بر روی خواص فیزیکی شیمیایی نانوذرات دارد [۲۷، ۲۸، ۳۲-۳۴]. به همین منظور اثر غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید (۰/۳، ۰/۲، ۰/۱ w/v) و آلژینات سدیم (۰/۳، ۰/۲، ۰/۱ w/v) با استفاده از روش طراحی آزمون بررسی شدند. نانوذرات بهینه بر اساس برخی فاکتورها مانند مورفولوژی مناسب، اندازه ذرات، شاخص پراکندگی، ظرفیت کپسوله‌سازی پروتئین و رهایش پایدار انتخاب شدند. در تحقیق حاضر، غلظت ۰/۲ w/v آلژینات سدیم و ۰/۱ w/v از کلسیم کلرید غلظت‌های مناسبی برای تهیه نانوذرات بهینه از نظر فاکتورهای ذکر شده در بالا بودند. از آنجا که جهت گیری گروه‌های عاملی زنجیره‌های آلژینات مانند گروه‌های کربوکسیلات برای ایجاد پیوندهایی با کلسیم مهم است، با افزایش غلظت آلژینات، گروه‌های عاملی کربوکسیلات بیشتر و زنجیره‌های بیشتری از آلژینات با کلسیم واکنش داده و اندازه نانوذره افزایش می‌یابد (شکل ۲ الف) [۳۰].

افزایش غلظت کلسیم منجر به تشکیل شبکه سه بعدی پایدار ناشی از تعامل گروه‌های کربوکسیل آلژینات با یون‌های کلسیم می‌شود که با افزایش بیشتر غلظت یون‌های کلسیم، زنجیره کوتاه‌تر پلیمر با شبکه متراکم‌تر و نهایتاً اندازه و توزیع ذره کوچک‌تر با رهاسازی طولانی‌تر آنتی‌ژن همراه خواهد شد. بنابراین تعداد پیوند کمتری بین بلوک‌های G موجود در زنجیره پلیمری و یون کلسیم برقرار می‌شود [۲۶] (شکل ۳ الف). شایان ذکر است که نتایج تحقیق حاضر مطابق با مطالعات انجام شده قبلی بوده که افزایش غلظت آلژینات سدیم و کلسیم کلرید به ترتیب منجر به افزایش و کاهش

اندازه نانوذرات آلژینات می‌شود [۲۸، ۳۱-۳۴]. مقادیر پتانسیل زتا امکان تعیین کمیت بار ذرات کلوتیدی و تحرک الکتروفوریتیک آنها در سوسپانسیون مایع را فراهم می‌کند و نقش مهمی در تعامل بین دارو یا آنتی ژن با نانوذرات و مورفولوژی سطح ذرات دارد [۳۵]، که بر اساس آن پتانسیل زتا ± 30 میلی‌ولت اغلب از تجمع ذرات جلوگیری کرده و منجر به تثبیت ذرات در سوسپانسیون می‌شود [۳۶]. در غلظت $0.2\% w/v$ از آلژینات، به دلیل افزایش غلظت آنیون، بار منفی نیز افزایش یافته و پتانسیل زتا نسبت به غلظت $0.1\% w/v$ منفی تر شده است. اما در غلظت $0.3\% w/v$ به دلیل افزایش غلظت آنیون، توسعه ساختارهای خوشه‌ای و توده شدن و عدم ثبات مناسب نانوذرات، پتانسیل زتا مثبت تر شده است (شکل ۲ج). در حالیکه با انحراف غلظت کلریدکلسیم از $0.1\% w/v$ پتانسیل زتا نانوذرات شاهد و حاوی CRM197 مثبت تر شده است. زمانیکه غلظت یون کلسیم بیشتر از آلژینات باشد، به دلیل مثبت بودن بار کلسیم مقدار بار منفی کاهش می‌یابد (شکل ۲ج). در مطالعه حاضر برخی پارامترهای پردازش مانند زمان و سرعت همگن سازی نیز بر روی خصوصیات نانوذره مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش زمان همگن سازی از ۱۵ به ۶۰ دقیقه منجر به کاهش میانگین اندازه ذرات می‌شود (شکل ۶الف). از سوی دیگر مدت زمان کوتاه هم زدن نیز ممکن است برای ایجاد فعل و انفعالات بین زنجیره‌های پلیمر و یون کلسیم کافی نباشد. در نتیجه ذرات بزرگ با منافذ باز ایجاد می‌شود که منجر به از دست رفتن ماده انکپسوله می‌شود. در نتیجه مدت زمان هم زدن مناسب برای ماده انکپسوله نانوذرات بهینه، ۴۵ دقیقه در نظر گرفته شد. سایر مطالعات مشابه به همین ترتیب نشان داده بودند که افزایش زمان همگن سازی در نهایت منجر به کاهش اندازه ذرات شده است [۳۱-۳۳]. با افزایش مدت زمان هم زدن، پتانسیل زتا منفی تر شد (شکل ۲ج). هرچه اندازه نانوذره با افزایش مدت زمان هم زدن کوچکتر شود، نسبت سطح به حجم افزایش یافته و مقدار بار منفی موجود در سطح نانوذره نیز افزایش می‌یابد. از سوی دیگر با افزایش سرعت همگن سازی نیز از ۸۰۰ به ۲۰۰۰ دور در دقیقه، اندازه نانوذرات کاهش یافت (شکل ۶الف). بر اساس نتایج فوق می‌توان نتیجه گرفت که سرعت همگن سازی ۲۰۰۰ دور در دقیقه و مدت زمان ۴۵ دقیقه می‌تواند یک شرایط بهینه برای سنتز نانوذرات آلژینات

باشد. امامی و همکاران در سال ۲۰۱۴ به اثر معکوس افزایش سرعت بر اندازه ذره و انکپسوله شدن داروی گلی‌پیزاید (از دسته سولفونیل‌اوره برای تحریک آزادسازی انسولین از پانکراس در درمان دیابت) و اثر مستقیم بر طولانی شدن رهایش دارو دست یافتند [۳۷]. در مطالعه دیگری توسط گوپتا و همکاران در سال ۲۰۱۱ و سمپرازیت و همکاران در سال ۲۰۱۸ به نتایج مشابهی از رابطه معکوس سرعت همگن سازی و اندازه ذره دست یافتند [۳۸، ۳۹]. محمد و لارابا دجبری در روش ژلی شدن یونی، با ثابت نگه داشتن غلظت‌های سدیم آلژینات، کلریدکلسیم و زمان همگن سازی و تنها با افزایش سرعت همگن سازی به اندازه ذرات بسیار کوچکتر دست یافتند [۴۰]. پدیده تاثیر سرعت بر اندازه ذره می‌تواند ناشی از انتقال انرژی مکانیکی حاصل از سرعت‌های مختلف باشد که در آن انرژی شکست افزایش می‌یابد و منجر به اندازه ذره کوچکتر می‌گردد [۴۱، ۴۲]. گرچه که تنوع در پروفایل رهایش دارو می‌تواند ناشی از واریانس در اندازه ذرات باشد [۴۳، ۴۴]. همچنین ذرات با اندازه کوچکتر به واسطه بزرگ بودن اندازه سطح به حجم، تمایل به رهایش سریع تر دارو دارند [۴۵].

نتایج به دست آمده از DLS نشان داد که توزیع اندازه نانوذرات قبل و بعد از بارگذاری پروتئین در محدوده باریکی به دست آمد و تنها یک پیک مشاهده شد. اندازه نانوذرات در محدوده ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر، اندازه مناسب جهت انتقال آنتی ژن یا دارو است [۴۶]. از سوی دیگر، اتصال ذرات به غشای سلولی و جذب توسط سلول‌های ایمنی به بار سطحی آنها بستگی دارد [۴۷]. کاهش در مقدار پتانسیل زتا بعد از بارگذاری پروتئین به دلیل برهمکنش بین گروه‌های کربوکسیل منفی ($-COO$) بر روی نانوذرات بود که توسط گروه‌های آمین مثبت (NH_2^+) CRM197 خنثی شد [۴۸]. در ادامه غلظت‌های متفاوت از پروتئین داخل نانوذرات بارگذاری شد تا توانایی نانوذرات برای محصور کردن پروتئین و تاثیر غلظت پروتئین بر روی ظرفیت احتباس و کارایی احتباس بررسی شود. راندمان بالای کپسوله کردن پروتئین توسط نانوذرات به دلیل برهمکنش پروتئین با گروه‌های هیدروکسیل زنجیره‌های آلژینات از طریق تشکیل پیوندهای هیدروژنی و الکترواستاتیکی می‌باشد [۴۹]. در پاسخ به غلظت‌های مختلف پروتئین بارگذاری شده، میزان کپسوله شدن پروتئین به شدت تحت تاثیر اندازه و ساختار ذرات و

² Breaking energy

¹ Glipizide

آنتی ژن ها، حفظ ویژگی های آن ها مانند ثبات و فعالیت آنتی ژنی است. نتایج نشان داد که نانوذرات آلژینات سدیم می توانند به عنوان حامل مناسب بدون داشتن عوارض جانبی موضعی و سیستمیک جهت انتقال آنتی ژن با دوز مشخص و رهاسازی آهسته و کنترل شده همراه با حفظ ویژگی های آنتی ژن استفاده شود. بنابراین از ترکیب نانوذرات آلژینات سدیم و پروتئین CRM₁₉₇ می توان به عنوان یک کاندید تهیه واکسن تک ظرفیتی یا چند ظرفیتی علیه بیماری دیفتتری و همچنین در ایمونوتراپی سرطان به صورت کونژوگه با ضد CD ها در مطالعات آینده مورد بررسی بیشتر جهت کاربرد قرار گیرد.

مراجع

1. P. Murray, K. Rosenthal, M. Pfaller, Health Sci. 9, 426 (2020).
2. K.E. Clarke, A. MacNeil, S. Hadler, C. Scott, T.S. Tiwari, T. Cherian, Emerg. Infect. Dis. 25, 1834 (2019).
3. K. Stratton, A. Ford, E. Rusch, E.W. Clayton, Vaccines CtRAEo. Diphtheria Toxoid-, Tetanus Toxoid-, and Acellular Pertussis-Containing Vaccines. Adverse Effects of Vaccines: Evidence and Causality, (National Academies Press, 2011) pp 105-120.
4. T. Lampidis, L. Barksdale, J. Bacteriol. 105, 77 (1971).
5. E. Montomoli, S. Piccirella, B. Khadang, E. Mennitto, R. Camerini, A. De Rosa, Expert Rev. Vacc. 10, 1053 (2011).
6. T. UCHIDA, D.M. Gill, A. Pappenheimer, Nat. New Bio. 233, 8 (1971).
7. G. Giannini, R. Rappuoli, G. Ratti, Nucleic Acids Res. 12, 4063 (1984).
8. L. Tomljenovic, C.A. Shaw, Lupus. 21, 223 (2012).

تعداد مکان های غیراشباع برای تشکیل پیوندهای هیدروژنی و الکترواستاتیکی می باشد که در تمام ذرات یکسان نیست و در نتیجه تفاوت های اندکی در مقادیر LE و LC در غلظت های مختلف پروتئین بارگذاری شده مشاهده می گردد. بنابراین، با افزایش غلظت پروتئین و با در نظر گرفتن ظرفیت اشباع نانوذره، مقادیر بیشتری از پروتئین را می توان در نانوذرات بارگذاری کرد که منجر به افزایش LC می شود. مکانیسم اصلی آزادسازی پروتئین از نانوذرات، فرآیند انتشار پروتئین از منافذ ایجاد شده ناشی از تخریب شبکه پلیمری است. در این مطالعه انتشار پروتئین از نانوذرات در شرایط آزمایشگاهی به صورت یک الگوی پایدار و ثابت با زمان انتشار طولانی بود (نمودار ۳). انتشار آهسته و مداوم بدون رهایش انفجاری احتمالاً به دلیل فعل و انفعالات قوی بین ماکرومولکول های پروتئین و نانوذرات است. مطالعه رهایش پروتئین از نانوذرات، یک رهایش پایدار و آهسته را نشان داد. در نتیجه می توان از نانوذرات به عنوان حامل برای انتقال آنتی ژن استفاده کرد. آنالیز طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) بر روی نانوذرات آلژینات سدیم، CRM₁₉₇ و نانوذرات بارگذاری شده با پروتئین یک تفاوت کم را در عرض و فرکانس پیک ها نشان داد که در آن عریض ترین پیک به دست آمده در 3400 cm^{-1} که مربوط به کشش O-H و پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی است. عدد موجی $1640-1402\text{ cm}^{-1}$ با کشش C=O (گروه آمید) مطابقت دارد. اگرچه ارتعاش کششی C-H آلیفاتیک در $2920-2850\text{ cm}^{-1}$ مشاهده شد، قله های کربوکسیل در مجاورت 1646 cm^{-1} (ارتعاش کششی متقارن -COO-) و 1415 cm^{-1} (ارتعاش کششی نامتقارن -COO-) دیده شدند که پس از برهمکنش با CRM₁₉₇ گسترش یافتند. مقایسه طیف نانوذرات بلانک و نانوذرات بارگذاری شده با پروتئین یک برهمکنش یونی بین گروه کربوکسیل آلژینات و گروه آمین CRM₁₉₇ را نشان داد. در نتیجه، نتایج FTIR تعامل موفق نانوذرات آلژینات و پروتئین CRM₁₉₇ را نشان می دهد.

۴- نتیجه گیری

در مطالعه حاضر نانوذرات آلژینات سدیم بلانک و کپسوله شده با پروتئین CRM₁₉₇ به روش ژلی شدن یونی تهیه شدند و با توجه به اثر فاکتورهای فیزیکی شیمیایی مختلف بر روی خصوصیات آنها، نانوذره بهینه تهیه شد. مساله مهم در تهیه یک سیستم حامل برای

24. C. Vauthier, K. Bouchemal, *Pharm. Res.* 26, 1025 (2009).
25. Y. Fang, S. Al-Assaf, G.O. Phillips, K. Nishinari, T. Funami, P.A. Williams, *J. Phys. Chem. B.* 111, 2456 (2007).
26. C. Ouwerx, N. Velings, M. Mestdagh, M.A. Axelos, *Polym. Gels Nnetw.* 6, 393 (1998).
27. S. Moradi Bidhendi, H. Zolfagharian, N. Mohamadpour Dounighi, F. Saraei, P. Khaki, F. Inanlou, *Arch. Razi Inst.* 68, 139 (2013).
28. H. Daemi, M. Barikani, *Sci. Irani.* 19, 2023 (2012).
29. M. Rajaonarivony, C. Vauthier, G. Couarraze, F. Puisieux, P. Couvreur, *J. Pharmac. Sci.* 82, 912 (1993).
30. P. Malyala, M. Singh, *Vacc. Adju. Meth. Proto.* 5, 91 (2010).
31. F. Sarei, N.M. Dounighi, H. Zolfagharian, P. Khaki, S.M. Bidhendi, *Ind. J. Pharm. Sci.* 75, 442 (2013).
32. G.S. Sonavane, P.V. Devarajan, *J. Biomed. Nanotechnol.* 3, 160 (2007).
33. M.G. Ferreira, L. Tillman, G. Hardee, R. Bodmeier, *Int. J. Pharmac.* 239, 47 (2002).
34. H.R. Goudarzi, A. Mokarram, M. Noofeli, A. Shirvan, M. Saadati. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* 7, 558 (2016).
35. S. Kriegseis, A.Y. Vogl, L. Aretz, T. Tonnesen, R. Telle, *Open Ceram.* 4, 100037 (2020).
36. W. Huo, X. Zhang, K. Gan, Y. Chen, J. Xu, J. Yang, *J. Euro. Ceramic Soci.* 39, 574 (2019).
9. N. Principi, S. Esposito, *Vacc.* 36, 5825 (2018).
10. J.A. Tonkin, S. Shamsudeen, M.R. Brown, R.E. Serda, P. Rees, H.D. Summers, *IET Optoelec.* 8, 113 (2014).
11. T. Akagi, M. Baba, M. Akashi, *Polymers Nanomed.* 2, 31 (2012).
12. K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski, *J. Control. Release.* 70, 1 (2001).
13. M.L. Hans, A.M. Lowman, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 6, 319 (2002).
14. A. Hajizade, F. Ebrahimi, A.H. Salmanian, A. Arpanaei, J. Amani. *JABR.* 1, 125 (2014).
15. R. Keikha, K. Daliri, A. Jebali, *Vacci.* 9, 74 (2021).
16. V. Wagner, B. Hüsing, S. Gaisser, A.K. Bock, *JRC-IPTS, EUR.* 23494 (2008).
17. J. Han, D. Zhao, D. Li, X. Wang, Z. Jin, K. Zhao. *Polymers.* 10, 31 (2018).
18. A. Bibi, S. Rehman, A. Yaseen, *Mater. Res. Express.* 6, 092001 (2019).
19. S. Pachiyappan, D. Shanmuganatham Selvanantham, S.S. Kuppa, S. Chandrasekaran, A.V. Samrot, *IET Nanobiotechnol.* 13, 416 (2019).
20. N.K. Sachan, S. Pushkar, A. Jha, A. Bhattacharya, *J. Pharm. Res.* 2, 1191 (2009).
21. U. Remminghorst, B.H. Rehm, *Discov. Nano.* 28, 1701 (2006).
22. M. Szekalska, A. Puciłowska, E. Szymańska, P. Ciosek, K. Winnicka, *Int. J. Poly. Sci.* 2, 20 (2016).
23. C.K. Kuo, P.X. Ma, *Biomat.* 22, 511 (2001).

37. J. Emami, M.S. Boushehri, J. Varshosaz, Res. Pharmac. Sci. 9, 301 (2014).
38. V.K. Gupta, P. Karar, Int. J. Pharm. Sci. 3, 78 (2011).
39. W. Samprasit, P. Akkaramongkolporn, S. Jaewjira, P. Opanasopit, J. Drug Del. Scie. Tech. 46, 312 (2018).
40. F.A. Mohamed, F. Laraba-Djebari, Vacci. 34, 2692 (2016).
41. T. Mateovi, B. Kriznar, M. Bogataj, A. Mrhar, J. Microenca. 19, 29 (2002).
42. P. Sansdrap, A.J. Moës. Int. J. Pharmac. 98, 157 (1993).
43. E.B. Denkbaş, E. Kilicay, C. Birlikseven, E. Öztürk, Rea. Func. Poly. 50, 225 (2002).
44. E.B. Denkbaş, M. Odabaşı, J. Appl. Poly. Sci. 76, 1637 (2000).
45. F. Baghbani, F. Moztarzadeh, J.A. Mohandesi, F. Yazdian, M. Mokhtari-Dizaji, S. Hamed, Int. J. Biol. Macromol. 89, 550 (2016).
46. C. Ravi, K. Zaved Ahmed, M. Abul Kalam Azad. IET Nanobiotechnol. 13, 742 (2019).
47. M.O. Oyewumi, A. Kumar, Z. Cui, Expert Rev. Vacci. 9, 1095 (2010).
48. I. Nurdin, The effect of pH and time on the stability of superparamagnetic maghemite nanoparticle suspensions, (MATEC Web of Conferences, 2016), p. 752.
49. D. Peng, K. Huang, Y. Liu, S. Liu, Int. J. Pharmac. 342, 82 (2007).

Preparation and evaluation of sodium alginate nanoparticles containing CRM₁₉₇ protein by ionic gelation method

S. Aghamiri¹, M. Noofeli*², H.R. Goudarzi², P. Saffarian¹, Z. Salehi Najafabadi³

¹ Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

³ Department of Human Bacterial Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Abstract: Development of the recombinant vaccines against infectious diseases is dependent on the identification of immunogenic antigens and vaccine delivery systems such as polymeric nanoparticles that are able to stimulate immune responses similar to or better than conventional vaccines and reduce complications associated with traditional vaccines. At the present study, synthesis and properties of the sodium alginate nanoparticles carrying CRM₁₉₇ protein as an antigen delivery system were evaluated. Synthesis of the blank optimized without protein loading and protein-containing nanoparticles was performed by ionic gelation method. After designing of the experiment (DoE) and determining the influential physicochemical factors in ideal nanoparticles synthesis; size, zeta potential, morphology, encapsulation efficiency, release pattern and FT-IR spectroscopy were investigated. The optimized nanoparticles were prepared at a concentration of 0.2% w/v sodium alginate, 0.1% w/v calcium chloride, 0.04% w/v poly-L-lysine during 45 minutes of stirring at 2000 rpm and in pH 6.5. The average nanoparticle size for blank and CRM₁₉₇ loaded nanoparticles were 88 and 245 nm also zeta potential -21 and -24.2 mV, respectively. LE and LC were >80% and >20%, respectively, associated with a stable and long-term encapsulated protein release pattern from nanoparticles. Absence of local and systemic signs, as well as weight gain in the mice group studied, indicated the safety of the nanoparticles and CRM₁₉₇ protein combination. Based upon the above achievements, alginate nanoparticles can be used as an antigen delivery system for targeted delivery with controlled, slow release and improved stability of recombinant diphtheria antigen (CRM₁₉₇) for immunization against diphtheria disease.

Keywords: CRM₁₉₇, Antigen delivery system, Sodium alginate nanoparticles, Ionic- gelation method