Production of protein nanoparticles as drug delivery vehicle and up to down optimization

M. Rahimnejad* GH. Najafpour** M. Jahanshahi***

*Assistant Professor of Biochemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Babol Noshirvani University of Technology, Babol, Iran
**Professor of Biochemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Babol Noshirvani University of Technology, Babol, Iran
***Associate Professor of Biochemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Babol Noshirvani University of Technology, Babol, Iran

Abstract

Background: Application of biodegradable particle systems is an interesting subject for using polymers in drug delivery purposes. These systems are suitable for delivery of many drugs.

Objective: The aim of this study was to produce and optimize protein nanoparticles as drug delivery vehicle.

Methods: This experimental study was performed in Babol Noshirvani University during 2011. A simple coacervation technique was applied for production of nanoparticles (NPs). NPs were purified by high speed centrifuge (48,800 g) followed by dialysis, microfiltration and ultrafiltration. Size of the fabricated NPs was measured by laser light scattering and NPs structure was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM).

Findings: The most important factors affecting on the size of produced NPs were agitation speed, temperature, protein concentration and ethanol to bovine serum albumin (BSA) ratio. The produced NPs were in the range of 101.4 to 503 nm and were semi-spherical. Temperature was the most important factor. Brownian motion of molecule increased with increasing temperature that was effective for produced NPs size.

Conclusion: With regards to the results, Nanoparticles of about 100 nm with high purity can be produced from BSA and can be used for drug delivery purposes.

Keywords: Nanoparticles, Serum Albumin, Drug Delivery Systems

Corresponding Address: Mostafa Rahimnejad, Biotechnology Department, Faculty of Chemical Engineering, Babol Noshirvani University, Babol, Iran
Email: rahimnejad_mostafa@yahoo.com
Tel: +98-111-3234204
Received: 15 Apr 2012
Accepted: 23 Sep 2012

تولید نانوساختار پروتئینی به عنوان حامل دارو و بهینه سازی از بالا به پایین

دکتر مصطفی رحیم نژاد* دکتر قاسم نجف‌پور** دکتر محسن جهانشاهی***

* استادیار مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل
** استاد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل
*** دانشیار مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل

آدرس نویسنده مسؤول: بابل، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، تلفن ۳۲۳۴۲۰۴-۰۱۱۱
Email: rahimnejad_mostafa@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۲

چکیده

زمینه: استفاده از سامانه‌های ذره‌ای زیست تخریب‌پذیر موضوع بسیار جالبی در زمینه استفاده از پلیمرها در دارورسانی است. این سامانه‌ها برای انتقال بسیاری از داروها مناسب هستند.

هدف: مطالعه به منظور تولید نانوساختار پروتئینی به عنوان حامل دارو و بهینه‌سازی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۰ در دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل انجام شد. ابتدا از روش توده‌ای شدن ساده و سپس برای خالص‌سازی به ترتیب از سانتریفیوژ با دور بسیار بالا (۴۸۸۰۰ g)، دیالیز، میکرو و الترافیلتراسیون استفاده شد. اندازه ذرات به وسیله دستگاه پراکنش نور لیزر و ساختار آن توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی و میکروسکوپ نیروی اتمی بررسی شد.

یافته‌ها: مهم‌ترین عوامل مؤثر در اندازه نانو ذره تولیدی عبارت بودند از: سرعت هم زدن، دما، غلظت پروتئین و نسبت حجمی اتانول به سرم آلبومین گاوی. اندازه ذرات تولید شده در محدوده ۱۰۱/۴ تا ۵۰۳ نانومتر و شکل آن شبه کروی بود. دما مؤثرترین عامل بود. با افزایش دما، حرکت براونی مولکول افزایش می‌یافت که خود در اندازه مولکول تشکیل شده مؤثر بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، نانوذراتی در حدود ۱۰۰ نانومتر و با خلوص بالا از سرم آلبومین گاوی قابل تولید است؛ بنابراین می‌توان از آن برای انتقال دارو استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات، سرم آلبومین، سیستم‌های انتقال دارو

مقدمه:

در پنجاه سال اخیر، دانش پزشکی در زمینه بررسی بیماری‌ها در ابعاد مولکولی پیشرفت کرده است. داروهای هوشمند می‌توانند خود را با بدن سازگار کنند و تنها هنگام رسیدن به مقصد نهایی، عمل اختصاصی خود را انجام دهند. آن‌ها می‌توانند قبل از فعال شدن دارو، از آزاد شدن بیش از حد آن جلوگیری کنند و مانع بروز مسمومیت شوند.[۱و۲]

دارورسانی مؤثر، عوارض جانبی را کاهش می‌دهد و دوز دارویی کم‌تری را مصرف می‌کند. سیستم‌های دارورسانی برای این‌که قادر به رساندن دوز مورد نیاز دارو در زمان معین به سطح هدف باشند از سیستم‌های طراحی شده نانومتری فعال یا غیرفعال استفاده می‌کنند.[۳]

نانوذرات پلیمری برای به‌کارگیری در سامانه‌های کلوئیدی حامل دارو، توانایی بالایی دارند. خواص فیزیک و شیمیایی حامل‌ها مانند اندازه و خصوصیت‌های سطحی در توزیع آن‌ها در بدن بسیار مؤثر است. ذرات بزرگ‌تر بسیار سریع‌تر از ذرات کوچک توسط کبد و طحال جذب می‌شوند. با کاهش اندازه حامل‌های کلوئیدی به محدوده ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر احتمال عبور از منافذ رگ‌ها بالاتر می‌رود.[۴] در سامانه‌های جدید از نانو ذرات به عنوان

حامل استفاده می‌شود. آن‌ها می‌توانند دارو را به هدف مورد نظر برسانند و در نتیجه باعث افزایش خواص درمانی و کاهش میزان اثرات نامطلوب دارو شوند.[۵] از نانوذرات جهت انتقال واکسن‌ها، ژن‌ها و حمل DNA استفاده شده است.[۲و۴و۶]

سیستم‌های نانوذره‌ای این قابلیت را دارند که تحولی عظیم در دارورسانی ایجاد کنند.[۷] نانو زیست فناوری با سامانه‌هایی با مقیاس نانو سروکار دارد که با استفاده از روش‌های از پایین به بالا یا از بالا به پایین تولید می‌شوند.[۸و۹] نانو ذرات پلیمری به دو گروه عمده ذرات زیست تخریب‌پذیر و نانوذرات زیست سازگار تقسیم‌بندی می‌شوند.[۱۰و۱۱]

نانو ذرات زیستی اولین بار در سال ۱۹۷۰ به دست آمد.[۱۲] این ذرات نخستین بار به عنوان حامل‌هایی برای داروهای ضد سرطان و مناسب برای ساخت واکسن‌ها معرفی شدند.[۱۳] یکی از روش‌های نوین تولید نانوذرات پروتئینی روش جداسازی مرحله‌ای است که به وسیله دانشمندان آلمانی کشف شد.[۱۴] این اصطلاح از کلمه توده‌ای شدن مشتق شده و به معنای فرایند تجمع ماکروملکول‌ها یا جدایی فازی است. توده‌ای شدن سامانه‌های آبی ممکن است ساده یا پیچیده باشد. در توده‌ای شدن ساده یک نوع پلیمر در محیط وجود دارد که با افزودن عامل نامحلول کننده، نانو ذرات را تشکیل می‌دهد.[۱۵و۱۶]

نانو ذرات زیست تخریب‌پذیر علاوه بر داشتن سازگاری با بدن، بعد از عمل درمان خود به خود یا توسط آنزیم‌های خاص تخریب و از بدن خارج می‌شوند. نانو ذرات پلی‌لاکتید، پلی گلیکوآمید و پروتئین‌هایی مانند آلبومین، کلاژن و ژلاتین نمونه‌هایی از این نوع هستند.[۱۷و۱۸] آلبومین به علت زیست تخریب پذیر بودن در محصول‌های طبیعی، عدم سمیت، در دسترس و ارزان بودن، بیش‌تر از سایرین استفاده می‌شود. همچنین به علت خصوصیات فیزیکی و بار سطحی، به عنوان حامل مناسبی برای داروهای آب‌گریز در آمده است.[۱۹]

مطالعه حاضر با هدف تولید نانوساختار پروتئینی به‌عنوان حامل دارو و بررسی عوامل مؤثر بر اندازه نانوذرات انجام شد.

❋ مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۰ در دانشگاه صنعتی بابل انجام و برای تشکیل نانوذرات از روش توده‌ای شدن ساده استفاده شد. افزودن اتانول به عنوان عامل نامحلول‌کننده تا کدر شدن محلول پروتئینی ادامه یافت.[۲۰] این مرحله در دمای محیط و pH=۷/۵ انجام شد. پس از تشکیل نانوذرات با افزودن گلوتارآلدهید (عامل اتصال‌دهنده عرضی دوتائی همگن) با غلظت ۵۰ میکرولیتر ذرات تثبیت شدند. عمل اختلاط نیز پس از افزودن آن به مدت نیم ساعت انجام شد. تمام مواد شیمیایی و آلی مورد نیاز برای انجام آزمایش از شرکت سیگما خریداری شدند.

برای خالص‌سازی، از سانتریفیوژ با دور بسیار بالا (۴۸۸۰۰ g) و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.[۲۱]

دومین مرحله دیالیز بود که در این مرحله الکل، بافر تریس، سدیم آزید و توین ۲۰، با انجام۲۰ ساعت دیالیز از محلول سوسپانسیون خارج شدند. بعد از دیالیز، محلول از میکروفیلتر با اندازه ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد. مرحله آخر اولترافیلتراسیون بود که طی آن پروتئین‌های آزاد از محلول نانوذرات خارج شدند. غشای اولترافیلتر مورد استفاده از نوع پلی سولفون با اندازه ۳۰۰ کیلو دالتون بود.[۲۱]

برای تعیین اندازه نانوذرات پروتئینی از دستگاه PCS مرکز پلیمر و پتروشیمی ایران استفاده شد. مورفولوژی و اندازه ذرات با میکروسکوپ‌های الکترونی روبشی (هلند، XL30) و اتمی (هلند، CLASS 11) بررسی گردید.

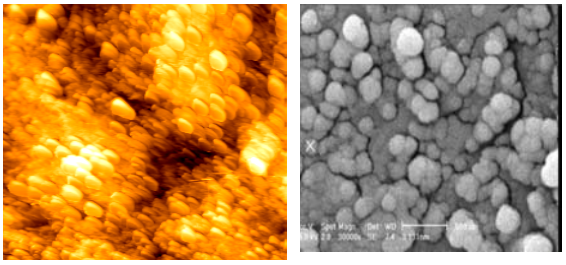
برای کاهش اندازه ذره‌های تولیدی از روش یک عامل در زمان (تک عاملی) استفاده شد. در این روش یکی از عوامل تغییر داده می‌شد، در حالی که سایر عوامل ثابت بودند. سپس برای هر عامل بهترین مقدار (پاسخ

بهینه) تعیین شد. این کار برای عوامل دیگر نیز تکرار شد. اولین عامل مورد مطالعه غلظت اولیه محلول پروتئینی بود که این تأثیر در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌لیتر مطالعه شد. عامل مؤثر دیگر در اندازه ذره، دور همزن بود. در هنگام اضافه کردن اتانول به محلول پروتئین دور هم زن‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۷۰۰ دور بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت.

در این تحقیق نسبت‌های حجمی ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴ جهت بهینه‌سازی آزمایش شد و همچنین تأثیر pH اولیه محلول پروتئینی بر اندازه نانو ذره تولیه شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

❋ یافته‌ها:

نانوذرات تولید شده دارای شکل‌های تقریباً کروی و همسان بودند (شکل شماره ۱).



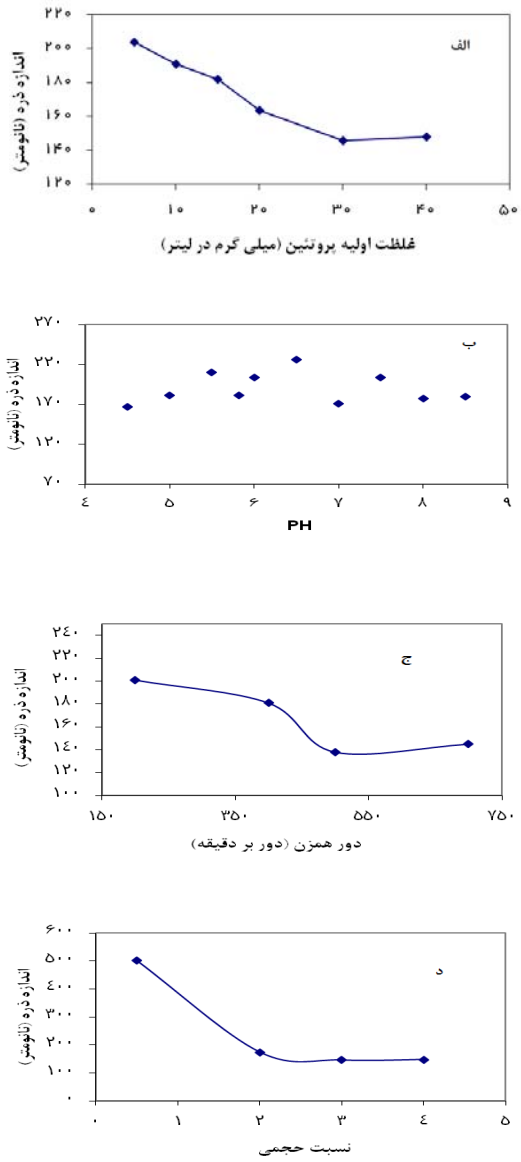
الف ب

شکل۱- (الف) تصویر الکترونی روبشی و (ب) تصویر الکترونی اتمی از اولین نانو ذره تولیدی شده در شرایط آزمایشگاه

غلظت اولیه محلول بر اندازه ذره تولیدی مؤثر بود، ولی افزایش غلظت اولیه محلول پروتئینی بیش از مقدار معین (۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تأثیری بر اندازه ذره نداشت (نمودار ۱-الف). pH اولیه تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر تشکیل اندازه ذره نشان نداد (نمودار ۱-ب). در دور ۵۰۰ دور بر دقیقه، حداقل اندازه ذره به دست آمده برابر با ۱۳۸ نانومتر بود (نمودار ۱-ج). نسبت حجمی پروتئین به اتانول یکی از عوامل بسیار تأثیرگذار بر اندازه ذره بود و بیش‌ترین گسترده نانو ذره تولیدی در این قسمت مشاهده شد. ذرات تولید شده بین ۱۴۵/۸ تا ۵۰۳ نانومتر گسترده بودند (نمودار ۱-د). غلظت گلوتار آلدئید و افزایش دبی حجمی اتانول بر اندازه ذره تولیدی تأثیری نداشت.

با افزایش دما، اندازه ذرات تولید شده نیز بیش‌تر می‌شد (جدول شماره ۱).

نمودار۱- تأثیر عوامل مختلف بر اندازه ذره تولیدی الف) غلظت اولیه پروتئین، ب) pH، ج) سرعت هم زدن و د) تأثیر نسبت حجمی اتانول/ سرم آلبومین گاوی



جدول۱- تأثیر دما بر اندازه ذرات تولید شده

دما (درجه سانتی‌گراد)	اندازه ذره (نانومتر)
۴	۱۰۱/۴
۱۴	۱۱۲
۲۴	۱۸۰
۳۴	۲۰۲

❋ بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد که نانو ذراتی در حدود ۱۰۰ نانومتر و با خلوص بالا از سرم آلبومین گاوی قابل تولید هستند و عواملی چون نسبت حجمی، غلظت اولیه پروتئین و دور همزن بر اندازه نانو ذرات تأثیر دارند. نانو ذرات تولیدی در این مطالعه تقریباً کروی شکل بودند. شکل و اندازه ذرات در ماهیت و مرغوبیت نانو ذرات پروتئینی که برای انتقال دارو به کار می‌روند تأثیر بسیار مهمی دارد.[۷] کروی بودن به بارگذاری دارو کمک خواهد کرد.[۱۲و۲۲] پانما و همکارش نیز نانو ذره زیست تخریب پذیر کروی از پلی‌لاکتیک گلایکولیک اسید تولید نمودند و از آن برای انتقال مولکول‌های با وزن مولکولی پایین استفاده کردند.[۲۳]

در مطالعه حاضر متوسط اندازه ذرات با تغییر سرعت افزودن حلال و غلظت عامل اتصال‌دهنده عرضی تغییر نکرد، در حالی که بسیار متأثر از نسبت حجمی سرم آلبومین گاوی به اتانول، غلظت سرم آلبومین گاوی و سرعت هم زدن بود. وبر و همکاران نیز برای تولید نانو ذرات از سرم آلبومین انسانی نتایج مشابهی را به دست آوردند.[۲۱] دور همزن و دما عامل اصلی تعیین اندازه ذره در روش امولسیون‌سازی هستند. هم زدن نقش انتقال جرم (نفوذ اتانول به مولکول پروتئین) را ایفا می‌کند. در دور بالا، پراکنش اتانول به محلول پروتئین موجب کاهش ذره تولیدی می‌شود و در دور پایین به دلیل کاهش نفوذ مولکولی الکل، ذرات تشکیل شده بزرگ هستند.[۲۰] نقش دما در اندازه ذره، به انرژی ذخیره شده درون مولکول بستگی دارد. با افزایش دما حرکت براونی مولکول افزایش می‌یابد که بر اندازه مولکول تشکیل شده مؤثر است. از طرف دیگر کاهش دما تأثیر قابل ملاحظه‌ای در اندازه و ساختار سه بُعدی پروتئین دارد.[۱۲]

در این تحقیق غلظت گلوتارآلدئید ثابت در نظر گرفته شد؛ زیرا نتایج نشان داده است که این عامل تأثیری بر اندازه ذره تولیدی نخواهد داشت.[۲۱] در این مطالعه ذرات پلیمری با حدود ۱۰۰ نانومتر با خلوص بالا تهیه شدند که برای انتقال دارو مناسب هستند.

❋ سپاس‌گزاری:

از حمایت مالی دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل جهت انجام این تحقیق تشکر می‌شود.

❋ مراجع:

1. Kumar PV, Jain NK. Suppression of agglomeration of ciprofloxacin-loaded human serum albumin nanoparticles. AAPS Pharm Sci Tech 2007 Mar 2; 8 (1): 17

2. Jung KO, Drumright R, Siegwart DJ, et al. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. Prog Polym Sci 2008; 33: 448- 77

3. Jahanshahi M, Najafpour G, Rahimnejad M. Applying the Taguchi method for optimized fabrication of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles as drug delivery vehicles. Afr J Biotechnol 2008 Feb 19; 7 (4): 362-7

4. Vandervoort J, Ludwig A. Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use. Eur J Pharm Biopharm 2004 Mar; 57 (2): 251-61

5. Arnedo A, Espuelas S, Irache JM. Albumin nanoparticle as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. Int J Pharm 2002 Sep 5; 244 (1-2): 59-72

6. Kim S, Park KM, Ko JY, et al. Minimalism in fabrication of self-organized nanogels holding both anti-cancer drug and targeting moiety. Colloids Surf B Biointerfaces 2008 May 1; 63 (1): 55-63

7. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devise. J Control Release 2001 Jan 29; 70 (1-2): 1-20
8. Islam N, Miyazaki K, An empirical analysis of nanotechnology research domains. Technovation 2010 April: 30 (4): 229-37
9. Lowe CR. Nanobiotechnology: The fabrication and applications of chemical and biological nanostructures. Curr Opin Struct Biol 2000 Aug; 10 (4): 428-34
10. Jahanshahi M, Pacek AW, Nienow AW, et al. Fabrication by three-phase emulsification of pellicular adsorbent customized for liquid fluidized bed adsorption products. J Chem Technol Biotechnol 2003; 78: 1111-20
11. Rahimnejad M, Jahanshahi M, Najafpour GD. Production of biological nanoparticles from bovine serum albumin for drug delivery. Afr J Biotechnol 2006 Oct 16; 5 (20): 1918-23
12. Hughes GA. Nanostructure-mediated drug delivery. Nanomed Nanotech Biol Medicine 2005 Mar; 1 (1): 22-30
13. Singh R, lillard JW Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. Exp Mol Pathol 2009 Jun; 86 (3): 215-23
14. Elber DL. Liquid-liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review. Acta Biomater 2011 Jan; 7 (1): 31-56
15. Lazko J, Popineau Y, Legrand J. Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method. Colloids Surf B Biointerfaces 2004 Aug 15; 37 (1-2): 1-8
16. Mu L, Seow P. Application of TPGS in polymeric nanoparticulate drug delivery system, Colloids Surf B Biointerfaces. 2006 Jan 15; 47 (1): 90-7
17. Liu Z, Jiao Y, Wang Y, et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. Adv Drug Deliv Rev 2008 Dec 14; 60 (15): 1650-62
18. Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. Curr Opin Solid State Mater Sci 2002 Aug; 6 (4): 319-27
19. Leong KW, Mao HQ, Truong-Le VL, et al. DNA-Polycation nanospheres as non-viral gene delivery systems. J Control Release 1998 Apr 30; 53 (1-3): 183-93
20. Zhang Z, Burton S, Williams S, et al. Design and assembly of solid-phases for the effective recovery of nanopartoculate bioproducts in fludised bed contactors. Bioseparation 2001; 10 (1-3): 113-32
21. Weber C, Coester C, Kreuter J, Langer K. Desolvation process and surface characterization of protein nanoparticles. Int J Pharm 2000 Jan 20; 194 (1): 91-102
22. Langer K, Balthasar S, Vogel V, et al. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticle. Int J Parrm 2003 May 12; 257 (1-2): 169-80
23. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. Adv Drug Deliv Rev 2003 Feb 24; 55 (3): 329-47