

## بررسی ایمنی‌زایی آنتی‌ژن PA63 به صورت آزاد و بارگذاری شده در نانوذره PLGA در موش سوری

حسین هنری<sup>۱\*</sup>، محمد ابراهیم مینایی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

\*نویسنده‌ی مسئول: دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران. ایمیل: honari.hosein@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۲۹ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۲

### چکیده

**مقدمه:** تائکون واکسن ایده‌آلی برای بیماری سیاه‌زخم تایید نشده است. آنتی‌ژن PA63 دارای خاصیت آنتی‌ژنیک بوده و برای تولید نسل‌های جدید واکسن از این آنتی‌ژن استفاده می‌کنند.

**اهداف:** هدف کلی این تحقیق، بررسی توان تولید آنتی‌بادی و ایمنی‌زایی آنتی‌ژن نو ترکیب PA63 بارگذاری شده در نانوذرات PLGA در موش سوری به عنوان کاندیدای واکسن احتمالی است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، وکتور حاوی ژن PA63 به درون باکتری DE3 BL21 *E.coli*، ترانسفورم و میزان بیان پروتئین آن به وسیله PAGE-SDS مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تخلیص پروتئین‌های نو ترکیب با ستون کروماتوگرافی، پروتئین‌های نو ترکیب در پلی مر PLGA بارگذاری شدند و جهت مطالعه ایمنی‌زایی در دو نوبت متوالی به موش‌ها تزریق شد. **نتایج:** اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات حاوی نانوذرات حاوی پروتئین PA63، ۲۶۱/۹ نانومتر و ۳۴/۴ میلی‌ولت اندازه‌گیری شد. عکس‌های الکترونی گرفته شده از نانوذرات، نشان دهنده کروی بودن نانوذرات و صحت اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات بود. میانگین تیتراژ آنتی‌بادی تولیدی علیه پروتئین نو ترکیب PA63 به صورت بارگذاری شده نسبت به آزاد، افزایش داشت.

**نتیجه‌گیری:** در این تحقیق با توجه به مزایای سیستم‌های نانوذرات در کاهش خطرات احتمالی پروتئینی و همچنین احتمال افزایش ایمنی‌زایی آن به عنوان سیستم‌های تحویل نوین واکسن‌های پروتئینی، از نانوذرات بر پایه پلیمرهای سنتزی حاوی پروتئین PA63 استفاده شد. نانوذره PLGA با خصوصیات مختلف از نظر خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوت، الگوی رهایش، نحوه سنتز و میزان بارگیری مورد مطالعه قرار گرفت تا بهترین شکل پلیمر برای بارگذاری پروتئین‌ها مشخص شود. **واژگان کلیدی:** سیاه‌زخم، نانوذرات، PLGA، پروتئین نو ترکیب، ایمنی‌زایی، واکسن

### ۱. مقدمه

تعیین کننده در بیماری‌زایی بوده و باکتری را در برابر هجوم ماکروفاژهای میزبان محافظت می‌کند. ژن‌های توکسیک پلاسمید pXO1 سه پروتئین یا فاکتور مولد ادم (EF)، آنتی‌ژن محافظت کننده (PA) و فاکتور مولد مرگ سلول (LF) را کد می‌کند (۴). فاکتور EF یا عامل تورم‌زا باعث ایجاد ادم و همچنین اختلال در سیستم ایمنی میزبان می‌شود. فاکتور LF یا عامل کشنده با از بین بردن ماکروفاژها به علت خاصیت پروتئازی آن باعث مرگ می‌شود. آنتی‌ژن PA یا عامل مصونیت‌زا عامل حمایت کننده است و دو فاکتور قبلی بدون اتصال به این فاکتور کارایی خود را از دست می‌دهند (۵). آنتی‌ژن PA پروتئینی با وزن مولکولی ۸۲۶۸۴ دالتون و متشکل از ۷۳۵ اسید آمینه است. همچنین ساختار کریستالی آن اندازه‌ای معادل نیم آنگستروم دارد. ژن PA در جایگاه pag A بر روی پلاسمید pXOI قرار داشته و دارای

سیاه‌زخم (Anthrax) یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که توسط باکتری *باسیلوس آنتراسیس* (*Bacillus anthracis*) ایجاد می‌شود. این باکتری جزو خانواده باسیلاسه است (۱). از جمله مهم‌ترین باسیل‌ها، *باسیلوس آنتراسیس* بوده که در انسان و دام باعث بروز بیماری مهلک سیاه‌زخم می‌گردد (۲). این باکتری به دلایل کشندگی بسیار بالا، تولید و انتشار بسیار آسان و استفاده از آن به صورت تنفسی، گوارشی و پوستی یکی از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین عوامل کشنده بیولوژیک به شمار رفته و پتانسیل استفاده در جنگ‌های بیولوژیک را دارا است (۱). باکتری *باسیلوس آنتراسیس*، علاوه بر یک DNA حلقوی به اندازه ۴/۵ مگاباز که به طور کامل تعیین ترادف شده است، دارای دو پلاسمید بزرگ pXO1 (شامل ژن‌های توکسیک) و pXO2 (شامل ژن‌های مولد کپسول) است (۳). کپسول عامل

۲۳۱۹ جفت‌باز است که ۲۲۰۵ جفت‌باز آن کد شده و غنی از AT و عاری از اسید آمینه سیستئین و متشکل از ۷۳۵ اسید آمینه است (۶). بعد از انتشار اگزوتوکسین‌های سیاه‌زخم در بدن میزبان، ابتدا PA طی فرآیندهای پروتئازی بخشی از ساختمان خود را که حدود ۲۰ کیلودالتون وزن دارد از دست می‌دهد. با این فرآیند بخش ۶۳ کیلودالتونی باقی‌مانده، فعال شده و خود را به گیرنده‌های سطح سلول می‌رساند. برش PA در سرم میزبان تحت تاثیر پروتئازهای شبه‌فورینی رخ می‌دهد (۷).

برای مقابله با سیاه‌زخم سه راه شامل واکسیناسیون برای پیشگیری در مرحله اول، آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت شامل پنی‌سیلین، داکسی‌سیکلین و سیپروفلوکساسین و درمان‌های ضد سم برای جلوگیری از اثرات سمی باکتری در اواخر مرحله عفونت، وجود دارد (۸). واکسن‌های معمول سیاه‌زخم از سویه‌ای از *باسیلوس آنتراسیس* که توکسین در مقادیر غیرکشنده تولید می‌کند، تهیه می‌گردد. ایمنی‌زایی در برابر سیاه‌زخم به کمک چند نوبت تزریق زیرجلدی با فاصله صورت می‌گیرد. تزریق یادآور سالانه نیز توصیه می‌شود. کارایی واکسن‌های موجود بر روی انسان کاملاً تایید نشده است (۹).

امروزه تلاش‌های زیادی برای بهینه کردن عملکرد داروها و واکسن‌ها جهت کاهش اثرات جانبی آن انجام می‌شود. در این زمینه سامانه‌های رهایش کنترل شده نقش موثری در رساندن عوامل فارماکولوژیکی و بیولوژیکی به نقاط مشخصی در بدن و رهایش آن با سرعت کنترل شده و بهینه ایفا می‌کنند. لذا نه تنها تاثیر درمانی دارو یا ایمنی‌زایی واکسن را بیشتر می‌کند، بلکه اثرات جانبی نامطلوب را نیز می‌کاهد. از راهکارهای موفق در زمینه رهایش کنترل شده، استفاده از سامانه‌های کلوتیدی است. این سامانه‌ها شامل لیپوزوم، نیوزوم، میکروذرات، نانوذرات و ... است. در میان حامل‌های کلوتیدی، لیپوزوم‌ها و نانوذرات بیشتر از بقیه مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند. نانوذرات وسیله‌ی مناسبی برای تحویل داروهایی با وزن مولکولی کم و نیز ماکرومولکول‌های بزرگ مانند پروتئین‌ها، پپتیدها و یا ژن‌ها در بدن (از راه‌های تجویزی مختلف) هستند. این نانوذرات به عنوان یک ابزار عالی برای تحویل برخی از ماکرومولکول‌های زیستی، داروها، ژن‌ها و واکسن‌ها به محل مورد نظر در داخل بدن عمل می‌کنند (۱۰). نانوذرات زیست تخریب‌پذیر را می‌توان از انواع مواد مانند پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر مصنوعی تهیه نمود. انتخاب پلیمر پایه با توجه به هدف و کاربرد نهایی، به بسیاری از عوامل بستگی دارد از جمله آن‌ها می‌توان به اندازه نانوذرات مورد نظر، خواص دارو یا آنتی‌ژن مورد نظر (حلالیت آبی، پایداری و غیره) جهت بارگذاری در پلیمر، ویژگی‌ها و عملکرد سطح، درجه تجزیه‌پذیری بیولوژیک و زیست‌سازگاری و مشخصات رهایش محصول نهایی و ... اشاره نمود (۱۱).

پیشرفت در ترکیب و فرمولاسیون واکسن‌ها به افزایش ایمنی ارائه‌شده توسط واکسن‌ها کمک می‌کند. ادجوانت‌ها و سیستم‌های تحویلی جدید ایمنی‌زایی را تقویت نموده و نیاز به

واکسن‌های نوین را مرتفع می‌کند. نانوبیوتکنولوژی نقش زیادی در پیشرفت واکسن‌ها داشته و فرصت طراحی نانوذراتی که در ترکیب، اندازه، شکل و خواص سطحی متفاوت بوده را برای کاربردهای پزشکی ارائه می‌دهد (۱۲). استفاده از نانوذرات علاوه بر رهایش آهسته آنتی‌ژن در بدن، منجر به افزایش پایداری آنتی‌ژن‌های ارائه‌شده به بدن نیز می‌شود. همچنین به دلیل مشابهت اندازه نانوذرات با اجزا سلولی، می‌توانند به راحتی با مکانیسم اندوسیتوز وارد سلول زنده شوند. همگرایی تکنولوژی پروتئین با نانوتکنولوژی، عصر مهمی در نانوپزشکی را نوید می‌دهد.

## ۲. اهداف

در این تحقیق، به بررسی اثر آنتی‌ژن PA63 به دو صورت آزاد و بارگذاری‌شده در نانوذره PLGA بر روی ایمنی‌زایی موش سوری پرداخته شده است. واکسن‌های با اندازه نانو و سیستم‌های تحویل دارویی متمایز آن‌ها می‌تواند در پیشگیری از بیماری و درمان، نقش موثری داشته باشد.

## ۳. مواد و روشها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و روش گردآوری اطلاعات از نوع مطالعات کتابخانه‌ای و تجربیات آزمایشگاهی بود. لازم به ذکر است که تمام کارهای پژوهشی این مقاله با رعایت کامل اصول اخلاق (کد اخلاق: IR.IHU.REC.1399.065) انجام گرفته است.

### ۳.۱. انتقال پلاسمید به باکتری

برای تهیه سلول‌های مستعد (Competent cell)، سوش باکتری *E. coli* BL21-DE3 به مدت ۱۵ ساعت (کشت شبانه)، در پنج میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع استریل، بدون آنتی‌بیوتیک رشد داده شد (درون شیکرانکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه). از محیط کشت فوق ۵۰ میکرولیتر را به پنج میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع استریل اضافه، درون شیکرانکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه رشد داده شد تا جذب آن، در طول موج ۵۹۵ نانومتر به ۰/۴ تا ۰/۵ رسید. ارلن حاوی محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه در یخ قرار داده شد.

محیط کشت کنار شعله به لوله مخصوص سانتریفیوژ (Falcon) انتقال داده و با سرعت دور ۴۰۰۰ به مدت پنج دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از حذف مایع رویی در کنار شعله به رسوب سه میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۵۰ میلی‌مولار فیلترشده استریل اضافه شد و سپس ۳۰ دقیقه در یخ قرار داده شد. محلول با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و محلول رویی در کنار شعله به‌طور کامل دور ریخته شد. رسوب حاصله در ۶۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۵۰ میلی‌مولار استریل حل و در حجم‌های ۱۵۰ میکرولیتر به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری

سانتی گراد قرار داده شدند. سپس سلول‌ها از طریق سونیکاسیون (قدرت ۷۵ درصد در ۱۲ سیکل، ۲۰ ثانیه سونیکاسیون و ۲۰ ثانیه در یخ) شکسته شدند و سلول‌های لیز شده در مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند تا سلول‌های نشکسته، قطعات دیواره سلولی و دیگر اجزا سلولی ته‌نشین شود. در نهایت محلول رویی بر روی ژل SDS-PAGE جهت بررسی بیان الکتروفورز گردید.

### ۳.۳. تخلیص پروتئین با استفاده از ستون ATN-iN

برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون نیکل-نیتربلوتری استیک اسید (Ni-NTA) محصول شرکت Shinegene استفاده شد. از آنجایی که پروتئین نوترکیب هدف به صورت محلول بود، بافرهای مناسب برای شستشوی ستون متناسب با شرایط استفاده شد. برای تعیین غلظت پروتئین موجود در محلول‌های به دست آمده حاصل از مرحله قبل، از روش برادفورد استفاده شد.

### ۴.۳. تهیه نانوذرات AGLP حاوی پروتئین نوترکیب

برای تولید نانوکپسول‌ها از روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال استفاده شد. این روش بر خلاف روش امولسیون ساده یا یگانه که برای داروهای نامحلول در آب مناسب است، روشی مبتنی بر امولسیون آب-روغن-آب (w/o/w یا Water/Oil/Water) است و یکی از مناسبترین راه‌ها برای بارگذاری کردن داروهای آب‌دوست نظیر پپتیدها، پروتئین‌ها و واکسن‌ها است. در این روش، محلول بافری دارو به فاز آلی شامل پلیمر اضافه و تشکیل امولسیون اولیه (W/O) را می‌دهد. این امولسیون به آرامی و در حین هم‌زدن به حجم بزرگی از آب که شامل امولسیفایر است (امولسیفایر در این آزمایش پلی وینیل الکل یا PVA است) اضافه شده تا امولسیون آب-روغن-آب حاصل شود. در پایان، حلال از امولسیون به روش تبخیر و استخراج حلال جدا می‌گردد.

جهت تهیه نانوذرات PLGA، در یک بشر، چهار میلی لیتر دی کلرومتان ریخته و به آن ۳۰ میلی گرم پلیمر PLGA اضافه و سپس حدود دو ساعت اجازه داده شد تا پلیمر بر روی هم‌زن مغناطیسی به خوبی حل شود (نکته مهم این است که دی کلرومتان نقش حلال پلیمر PLGA و همچنین فاز روغنی را در این آزمایش ایفا می‌کند و به شدت فرار است بنابراین در طول انجام آزمایش باید درب ظرف تولید نانوذره با فویل آلومینیومی به خوبی پوشش داده شود). پس از گذشت مدت زمان فوق، یک میلی لیتر از محلول پروتئینی حاوی یک میلی گرم پروتئین به صورت قطره‌قطره به محلول پلیمری در حال هم‌زدن اضافه شد و سپس حدود پنج دقیقه اجازه داده شد تا مخلوط پلیمر و پروتئین بر روی هم‌زن مغناطیسی به خوبی حل شود تا امولسیون آب-روغن (W/O) ایجاد شود. پس از این مرحله سه مرتبه سونیکه با قدرت ۵۰ درصد و سیکل ۵/۵ هر بار به مدت ۲۰ ثانیه انجام شود. هشت میلی لیتر محلول PVA ۲/۵ درصد در آب مقطر به صورت تازه آماده شد (با کمی حرارت PVA بهتر

استریل منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در یخ قرار داده شد. تراریخت نمودن (Transformation) سلول‌های مستعد به روش شوک حرارتی انجام شد. مقدار ۱۰-۵ میکرولیتر از پلاسמיד حاوی ژن جهش یافته به دو میکروتیوب در کنار شعله به تیوب‌های حاوی سلول‌های مستعد قرار داده شده در یخ اضافه گردید و با تکان‌های ضعیف حل شد و به مدت ۳۰ دقیقه درون یخ قرار گرفت. جهت شوک سرما-گرم به محلول، لوله‌ها بلافاصله از یخ خارج و در حمام آبگرم در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲۰-۹۰ ثانیه قرار داده شد. بعد از آن لوله‌ها سریعاً به درون یخ انتقال داده شد و به مدت پنج دقیقه به همین وضعیت باقی ماندند. به میکروتیوب‌ها یک میلی لیتر محیط کشت LB مایع استریل اضافه نموده، حدود یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور قرار داده شد.

پس از حدود یک ساعت سلول‌ها با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه در ته میکرو تیوب جمع‌آوری نموده و رسوب در ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر LB مایع باقی مانده در ته تیوب مخلوط گردید. سپس بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر) برده و به مدت ۱۵ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد تا رشد کنند.

### ۲.۳. بیان پروتئین نوترکیب در باکتری

ابتدا تعدادی از کلونی‌های موجود بر روی محیط کشت جامد انتخاب و هر کدام به لوله‌های حاوی پنج میلی لیتر محیط کشت LB مایع و آنتی‌بیوتیک با غلظت نهایی ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر تلقیح و به مدت ۱۵ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه گرمادهی شد. در ادامه مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت تازه به طور جداگانه در دو لوله (یکی شاهد و دیگری تست) حاوی پنج میلی لیتر محیط کشت LB مایع و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی‌بیوتیک تلقیح و لوله‌ها با شرایط فوق گرمادهی شدند. پس از رسیدن مقدار جذب نوری لوله‌ها به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، به هر کدام از لوله‌های تست در شرایط استریل (کنار شعله)، ماده IPTG با غلظت نهایی یک میلی مولار اضافه و به لوله‌های شاهد IPTG اضافه نگردید. سپس لوله‌های شاهد و تست به مدت حدود چهار ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و سرعت ۹۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. پس از اتمام زمان فوق، محیط کشت داخل لوله‌های تست و شاهد به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری جداگانه منتقل و به مدت دو دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری شوند. سپس سلول‌های باکتریایی جمع‌آوری شده (اعم از تست و شاهد) به روش طبیعی تیمار شدند. ابتدا سلول‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده pH = ۸ به مدت یک ساعت و درون شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه

زیرپوستی تزریق شد (به هر موش ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه در برگیرنده ۱۰ میکروگرم آنتی ژن). همچنین پروتئین نوترکیب PA63 بارگذاری شده در نانوذرات PLGA نیز به صورت دوتزریقه (روز ۱ و ۲۸) به صورت زیرپوستی انجام گردید. برای حیوانات شاهد نیز به جای آنتی ژن از نانوذرات فاقد پروتئین و PBS استفاده شد. خون گیری ها یک هفته پس از تزریق دوم، یک هفته پس از تزریق سوم و یک هفته پس از تزریق چهارم صورت پذیرفت. خون گیری ها با استفاده از پیپت پاستور از گوشه چشم هر موش به آرامی به عمل آمد. قطرات خون به داخل تیوب های ۱/۵ میلی لیتری منتقل و پس از برچسب زدن و ذکر مشخصات حیوانات، به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و سپس سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت پنج دقیقه انجام شد. در مرحله بعد، از سرم به دست آمده به منظور بررسی میزان تیتراژ آنتی بادی IgG تولیدی با استفاده از الایزا غیرمستقیم استفاده شد.

### ۶.۳. آنالیز آماری

برای بررسی آماری داده های حاصل از تیتراژ آنتی بادی تولید شده توسط الایزا غیرمستقیم در سرم، از آزمون های ANOVA استفاده شد. این آزمون برای مقایسه میانگین تیتراژ آنتی بادی نمونه ها در سطح خطای پنج درصد و با نرم افزار GrapPad prism ver 8 انجام شد.

### ۴. نتایج

#### ۱.۴. انتقال پلاسمید به باکتری *E. coli*

فرآورده واکنش الحاق، با روش شوک حرارتی در سلول های صلاحیت دار شده (*E. coli* BL21(DE3) وارد گردید و روی محیط LB آگار حاوی آنتی بیوتیک (۸۰ میکروگرم در میلی لیتر) گسترش داده شد. نتایج به دست آمده بدین صورت بود که:

- نمونه تست اصلی مرحله الحاق که هم حاوی وکتور و هم حاوی قطعه ژن مورد نظر بود، رشد خوبی داشت.
  - نمونه کنترل منفی در فرایند ترانسفورماسیون که فقط حاوی سلول های مستعد بود و انتقالی به آن صورت نگرفته بود، اصلاً رشدی نداشت که نشان دهنده عدم وجود آلودگی در حین انجام مراحل کار است.
  - نمونه کنترل مثبت این فرایند که حاوی نمونه خاصی از یک پلاسمید تخلیص شده ی مقاوم بود، رشد بسیار بالایی داشت.
- برای انجام مراحل بعدی تعدادی از این کلونی ها روی پلیت LB حاوی آنتی بیوتیک منتقل شدند تا به صورت ذخیره برای مراحل بعدی نگهداری شوند. در تصویر ۱ نتایج فوق الذکر نشان داده شده است.

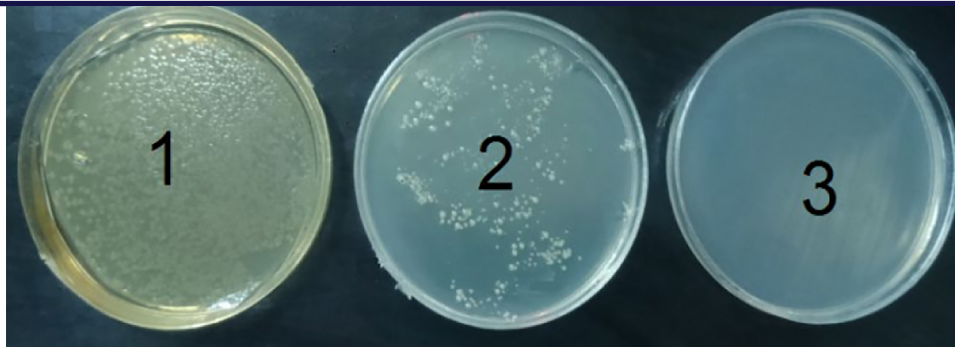
در آب حل می شود) و سپس با سرنگ محلول حاوی نمونه PLGA + آنتی ژن قطره قطره به PVA اضافه در حال هم زدن اضافه شد. سپس همانند مرحله قبل نمونه سونیکه شد ولی این بار مراحل چهار بار و مدت زمان سونیکه نیز ۳۰ ثانیه بود. در این مرحله حجم امولسیون دو گانه W/O/W به دست آمده را با آب مقطر به ۳۰ میلی لیتر رسانده و بشر بر روی همزن قرار داده شد و دو ساعت اجازه داده شد تا در حال هم زدن حلال دی کلرومتان کاملاً تبخیر شود. با گذشت زمان لازم برای تبخیر حلال و سخت شدن ذرات موجود در محلول، جمع آوری ذرات آن ها انجام گرفت. برای جمع آوری ذرات کل محلول به داخل لوله فالكون ۵۰ میلی لیتری ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. برای بررسی اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات تولید شده از دستگاه DLS مدل Malvern ساخت کشور انگلستان متعلق به دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) استفاده شد. جهت بررسی خصوصیات ظاهری نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل FEI Quanta ۲۰۰ ساخت شرکت FEI استفاده شد. این مدل میکروسکوپی دارای دو نوع دتکتور با نام های SE و BSE است. به منظور جلوگیری از رشد نانوذرات نمونه های تازه تهیه شده بر روی یک سطح شیشه ای قرار داده شد. پس از خشک شدن کامل، نمونه به وسیله یک لایه نازک طلا با روش P.V.D پوشش داده شد. جهت انجام لایه نشانی طلا از دستگاه Sputter coater مدل SBC12 ساخت شرکت KYKY استفاده شد.

برای بررسی الگوی رهایش پروتئین نوترکیب PA63 از نانوکپسول، مقداری از نانوذرات PLA-PEG حاوی سه میلی گرم پروتئین در حجم ۵۰۰ میکرولیتر محلول PBS درون میکروتیوب دو میلی لیتری ریخته و با هم زدن پراکنده شد. میکروتیوب درون شیکرانکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. در هر مرحله زمانی برای برداشت نمونه، محلول حاوی نانوذرات به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور، سانتریفوژ و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته و به همان میزان بافر تازه جایگزین می شد و پس از ورتکس کردن مجدد در شیکرانکوباتور قرار می گرفت. انجام این آزمون به مدت ۴۹ روز ادامه داشت. در ابتدا، چهار ساعت پس از انجام رهایش و در ادامه در فاصله زمانی هر هفت روز انجام گرفت. سپس با استفاده از روش پروتئین سنجی برادفورد با سه بار تکرار، غلظت پروتئین موجود در نمونه تعیین گردید. در نهایت منحنی درصد تجمع پروتئین رها شده از نانوذرات در مدت زمان های تعیین شده، ترسیم شد.

### ۵.۳. ایمنی زایی در موش

برای انجام ایمنی زایی، پروتئین نوترکیب به همراه ادجوانت فروند کامل و ناقص طی چهار نوبت به گروه تست و شاهد موش های سوری به ترتیب در روز ۱، ۱۴، ۲۸ و ۴۲ به صورت





تصویر ۱. رشد کلنی‌های *E. coli* نوترکیب، روی محیط‌های حاوی آنتی‌بیوتیک. پلیت ۱: نمونه کنترل مثبت، حاوی پلاسمید مقاوم. پلیت ۲: پلیت حاوی پلاسمید نوترکیب. پلیت ۳: نمونه کنترل منفی فقط حاوی سلول‌های مستعد بود.

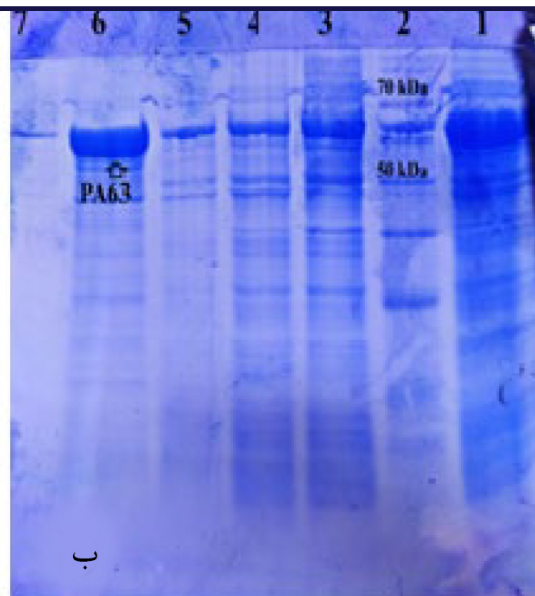
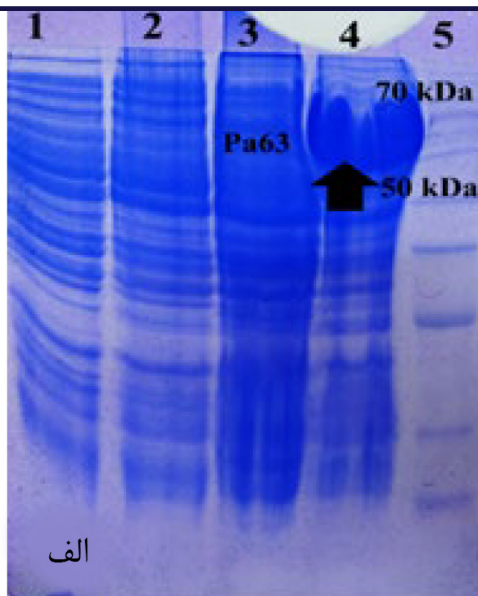
## ۲.۴. بررسی بیان پروتئین در میزبان *E. coli* توسط روش SDS-PAGE

پس از کشت سلول‌ها و القا با IPTG، بیان پروتئین نوترکیب صورت پذیرفت و سپس نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. باند پروتئینی آنتی‌ژن PA63 درون نمونه رسوب حاصل از سونیکاسیون دیده می‌شود؛ بنابراین پروتئین نوترکیب، به‌صورت انکلوژن بادی تولیدشده و در محیط سیتوپلاسمی باکتری محلول نیست. همان‌طور که در شکل ۲ الف مشخص است، باند پروتئینی PA63 نزدیک ۶۸ کیلوالتون است که درون بافر لیزکننده B حاصل از سونیکاسیون دیده می‌شود. باند پروتئین‌های مورد انتظار در شکل نشان می‌دهد

که ژن‌های همسان‌سازی‌شده با القای IPTG بیان زیادی را به‌صورت انکلوژن بادی در باکتری دارند.

## ۳.۴. آماده‌سازی نمونه برای عبور از ستون کروماتوگرافی

محلول به‌دست‌آمده برای استفاده در ستون Ni-NTA مورد استفاده قرار گرفت. سپس محلول شفاف به ستون منتقل گردید و در هر مرحله شستشو نمونه‌ای از آن برای بررسی میزان خلوص پروتئین نوترکیب با استفاده از SDS-PAGE برداشته شد که نتایج آن نشان می‌دهد پروتئین‌های مورد نظر با بافر IM ۲۵۰ (ایمیدازول ۲۵۰) از ستون Ni-NTA جدا می‌شوند (تصویر ۲).



تصویر ۲. تصویر الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲ درصد. الف، بیان پروتئین نوترکیب PA63. ستون ۱: نمونه کنترل بدون القای IPTG در محلول PBS، ستون ۲: نمونه با القای IPTG در محلول PBS، ستون ۳: نمونه کنترل بدون القای IPTG در بافر لیزکننده B، ستون ۴: نمونه با القای IPTG در بافر لیزکننده B، ستون ۵: نشانگر پروتئینی شماره ۳۱۰۰۱۳ SM. ب، تخلیص پروتئین PA63 از ستون نیکل. با استفاده از ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE. ستون ۱: flow قبل از ستون ستون ۲: مارکر شماره ۳۱۰۰۱۳ SM. ستون ۳: flow بعد از ستون ستون ۴: بافر C، ستون ۵: بافر D، ستون ۶: بافر E250، ستون ۷: بافر MES.

حاصل با نمودار استاندارد BSA مقایسه گردید و غلظت حاصل از تخلیص در طی این فرایند برای PA63، مقدار ۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

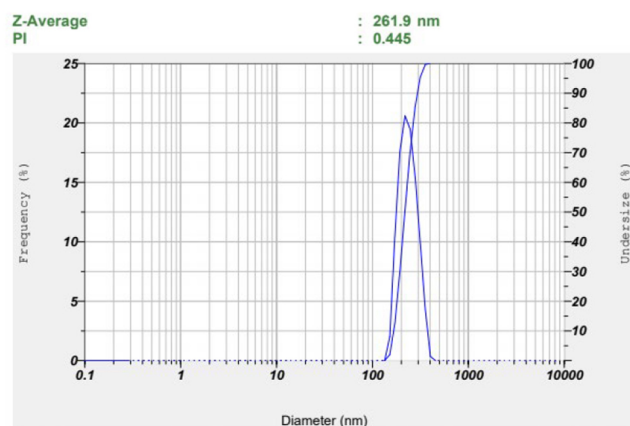
## ۴.۴. تعیین غلظت پروتئین نوترکیب

از نمونه پروتئین‌های تخلیص‌شده با ستون Ni-NTA تعیین غلظت پروتئین نوترکیب با روش برادفورد انجام شد. اعداد

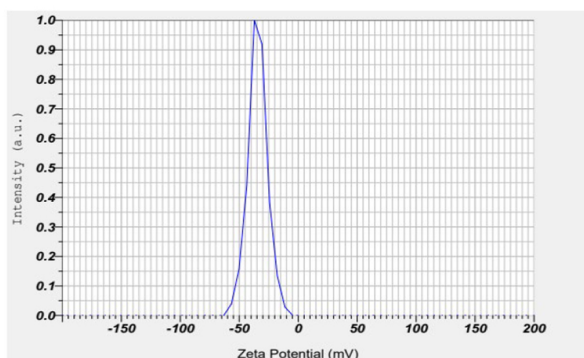
## ۵.۴. بررسی اندازه نانوذرات PLGA با استفاده از پراش نور پویا

پس از آماده‌سازی نمونه، نانوذرات PLGA تولیدشده در حضور و یا نبود پروتئین نوترکیب از نظر اندازه توسط دستگاه DLS مورد

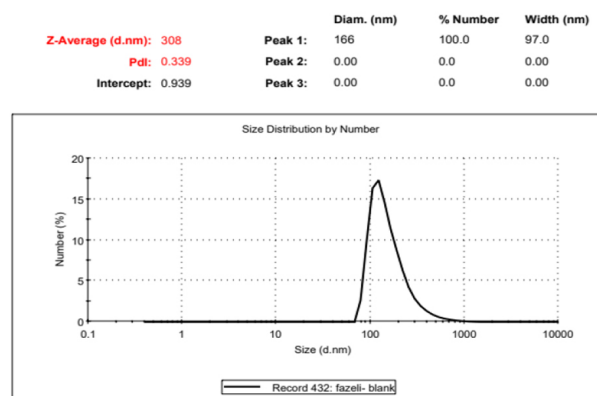
الف



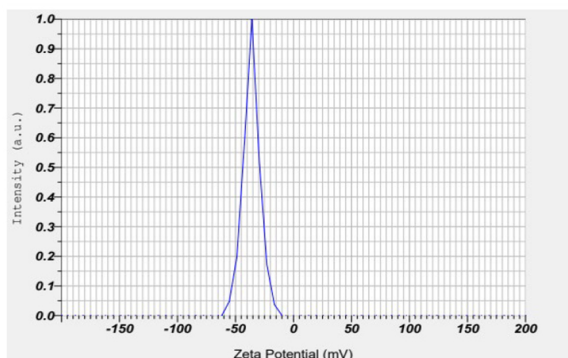
Zeta Potential (Mean) : -34.4 mV  
Electrophoretic Mobility Mean : -0.000267 cm<sup>2</sup>/Vs



ب



Zeta Potential (Mean) : -36.3 mV  
Electrophoretic Mobility Mean : -0.000282 cm<sup>2</sup>/Vs



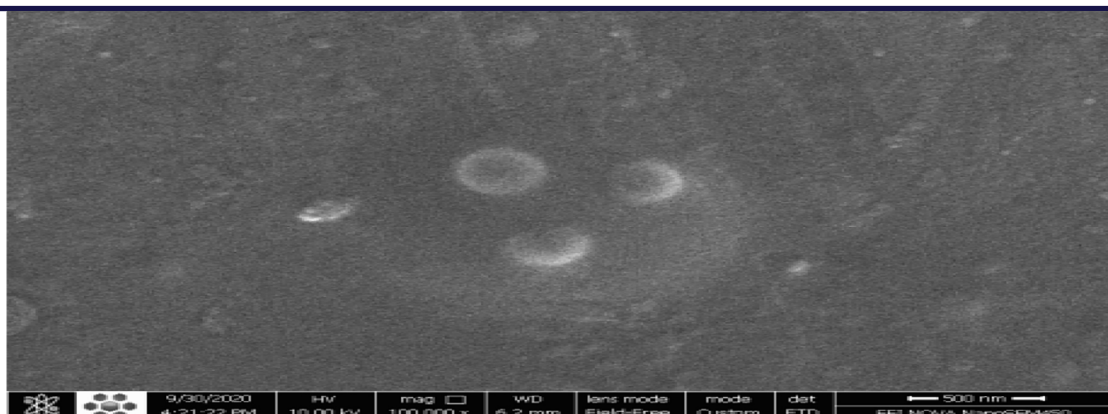
تصویر ۳. نمودار بررسی نمونه در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS. الف، بازه توزیع اندازه PLGA فاقد پروتئین، ب، بازه توزیع اندازه PLGA حاوی پروتئین PA63. ج، پتانسیل زتای PLGA فاقد پروتئین، د، پتانسیل زتای PLGA حاوی پروتئین PA63

## ۷.۴. بررسی خصوصیات ظاهری نانوذرات AGLP حاوی پروتئین‌های نوترکیب

پس از لایه‌نشانی، نمونه نانوذرات توسط میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت. تصاویر میکروسکوپ الکترونی کروی بودن سطح ذرات حاصل از فرایند تولید نانوذرات در شرایط بهینه را مطلوب نشان داد. همچنین این تصاویر، نتایج دستگاه DLS مربوط به توزیع اندازه نانوذرات را تایید نمود. تصویر ۴، تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات تهیه شده است که کروی و تا حد زیادی حائز شرایط ایده‌آل هستند.

## ۶.۴. بررسی پتانسیل زتا نانوذرات PLGA حاوی پروتئین‌های نوترکیب

در فرآیندهای گوناگون صنعتی، غذایی و دارویی به‌منظور جداسازی و برآورد ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی، بررسی ویژگی‌های سطحی مواد از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. این آزمون نیز از نمونه‌های نانوذرات PLGA که توزیع اندازه ذرات آن در مراحل قبل مورد بررسی قرار گرفته بود، تهیه شد. نتایج نشان‌دهنده این بود که پتانسیل زتا نانوذرات PLGA فاقد و حاوی پروتئین دارای یک پیک میانگین در محدوده -۳۰ میلی‌ولت تا -۳۶ میلی‌ولت بود (تصویر ۳ ب).



تصویر ۴. تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM مدل FEI Quanta 200 از نانوذرات PLGA حاوی PA63 (نانوذرات خشک شده بر روی سطح شیشه‌ای، روی گرید قرار گرفته و پس از پوششدهی با طلا، تصویربرداری شد).

سانتریفیوژ نانوذرات Freeze drying شدند و سپس بازده وزنی تولید نانوذرات محاسبه شد. همچنین محلول رویی جمع‌آوری و پروتئین‌سنجی شد و طبق فرمول راندمان احتباس (LE درصد) و ظرفیت احتباس (LC درصد) نانوذرات از روش غیرمستقیم محاسبه گردید (جدول ۱).

#### ۸.۴. بررسی بازده وزنی تولید نانوذرات، راندمان احتباس و ظرفیت احتباس نانوذرات به روش غیرمستقیم

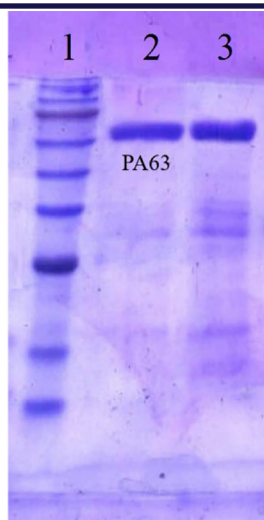
در این بخش از تحقیق پس از ساخت نانوذرات و انجام

جدول ۱. بررسی بازده وزنی (PY درصد)، راندمان احتباس (LE درصد) و ظرفیت احتباس (LC درصد) نانوذرات

| گروه‌ها                         | LE درصد | PY درصد | LC درصد |
|---------------------------------|---------|---------|---------|
| نانوذرات PLGA حاوی BSA          | ۳۶      | ۸۷      | ۱.۴     |
| نانوذرات PLGA حاوی پروتئین PA63 | ۹۷      | ۹۶.۲    | ۳.۵     |

#### ۱۰.۴. نتایج بررسی پایداری و ماندگاری پروتئین نو ترکیب در طول تهیه نانوذرات PLGA

پس از انجام رهایش کامل نانوذرات PLGA و مقایسه آن با پروتئین نو ترکیب به عنوان کنترل، مشخص شد که پروتئین در طول مراحل ساخت نانوذرات پایدار بوده و دنا توره نشده است (تصویر ۶).

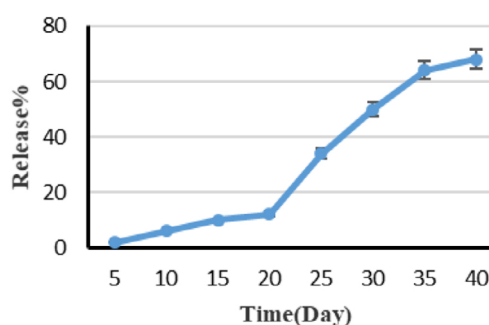


تصویر ۶. آنالیز SDS-PAGE ۱۲ درصد رنگ آمیزی شده به روش کوماسی بلو از پروتئین‌های رهایش شده از نانوذرات PLGA: ستون ۱: نشانگر مولکولی پروتئین. ستون ۲: پروتئین نو ترکیب PA63 رهایش شده از نانوذرات به مدت ۱۶ ساعت. ستون ۳: پروتئین نو ترکیب PA63

#### ۹.۴. بررسی برون تن رهایش آنتی ژن از نانوذرات PLGA

رهایش پروتئین از نانوذرات PLGA به مدت ۴۰ روز بررسی و براساس درصد تجمعی رهایش پروتئین در تصویر ۵ نمایش داده شد. همان‌طور که در تصویر ۵ مشاهده می‌شود فرایند رهایش توکسین در ۲۰ روز نخست با یک سرعت تقریباً ثابت انجام شده است، اما از این زمان به بعد با یک سرعت تصاعدی رهایش انجام شده است و پس از گذشت ۴۰ روز از بررسی رهایش حدوداً ۶۸ درصد از پروتئین از نانوذرات رهایش شده است که این الگوی رهایش با الگوی رهایش نانوذرات PLGA در مطالعات دیگر مشابهت دارد.

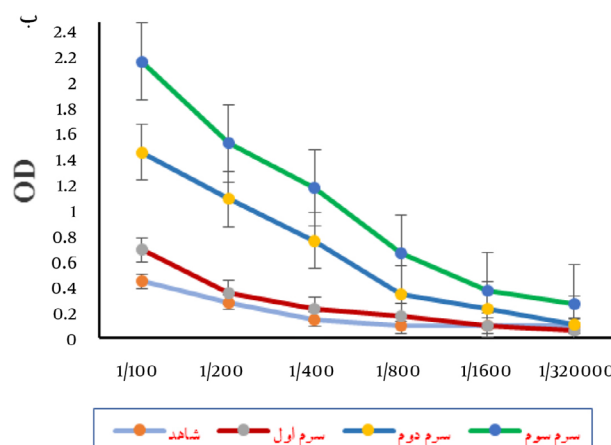
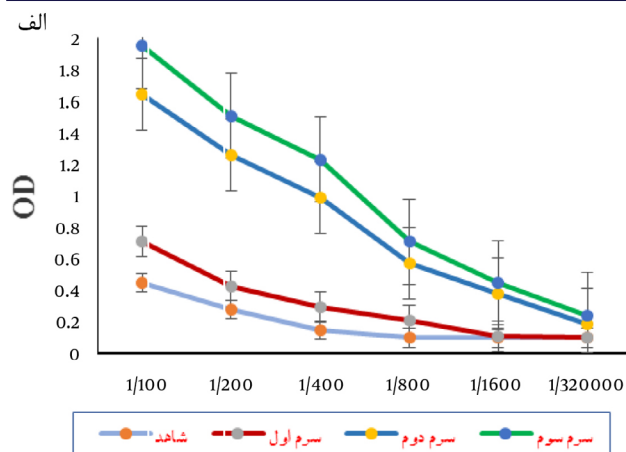
PLGA Release



تصویر ۵. نتایج درصد تجمعی رهایش آنتی ژن از نانوذرات PLGA در طول مدت ۴۰ روز

## ۱۱.۴. ارزیابی تیتراژ IgG در سرم موش‌های ایمن شده

به منظور ارزیابی آنتی‌بادی تولیدشده و محاسبه میزان آن در هر مرحله تجویز از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. یک

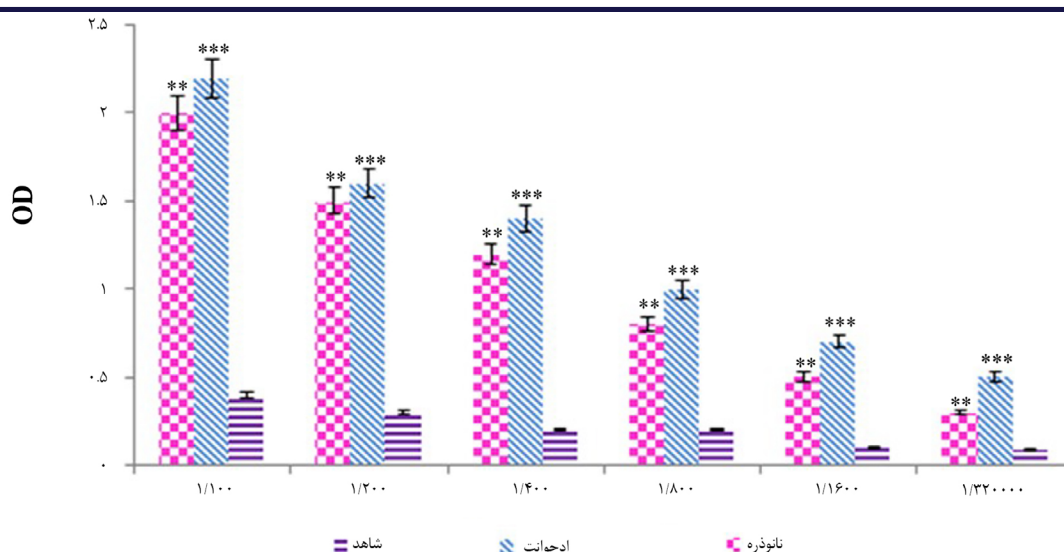


تصویر ۷. تیتراژ آنتی‌بادی تولیدشده در سرم موش‌های ایمن به صورت تجویز زیرجلدی و مقایسه آن با گروه شاهد. محور عمودی: جذب نوری در طول موج ۴۹۵ و محور افقی: رقت را نشان می‌دهد. الف، تولید آنتی‌بادی علیه PA63 کپسوله‌شده با PLGA، تولید آنتی‌بادی علیه PA63 همراه با آدجوانت

شد. این آزمون مقایسه میانگین تیتراژ آنتی‌بادی نمونه‌ها و معنی‌دار بودن متغیرها را در سطح خطای حداقل یک درصد نشان داد (تصویر ۸).

## ۱۲.۴. آنالیز آماری

برای بررسی آماری داده‌های حاصل از تیتراژ آنتی‌بادی تولیدشده توسط الایزای غیرمستقیم در سرم، از آزمون‌های ANOVA استفاده



تصویر ۸. آنالیز آماری تیتراژ آنتی‌بادی تولیدشده علیه PA63 همراه با آدجوانت، کپسوله‌شده با PLGA و شاهد به صورت تجویز زیرجلدی در سرم موش‌های ایمن شده و مقایسه آن با گروه شاهد ( $P < 0.01$ ,  $0.01/P$ ) که معنی‌دار بودن متغیرها را نشان می‌دهد. (\*\* معادل  $P < 0.01$  و \*\*\* معادل  $P < 0.001$  است).

## ۵. بحث

تحقیق استفاده شد. نانوذره PLGA با خصوصیات مختلف از نظر خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوت، الگوی رهایش، نحوه سنتز و میزان بارگیری مورد مطالعه قرار گرفت تا بهترین شکل پلیمر برای بارگذاری پروتئین‌ها مشخص شود.

تخریب PLGA بستگی به نسبت مونومری برای تولید این پلیمر دارد. گلیکولیک اسید کمی از لاکتیک اسید آب‌دوست‌تر است و نسبت بیشتر آن باعث افزایش سرعت هیدرولیز می‌گردد

در این تحقیق، میانگین تیتراژ آنتی‌بادی تولیدی در موش سوری علیه پروتئین نوترکیب PA63 به صورت بارگذاری شده نسبت به آزاد، افزایش داشت. با توجه به مزایای سیستم‌های نانوذرات در کاهش خطرات احتمالی پروتئینی و همچنین احتمال افزایش ایمنی‌زایی آن به عنوان سیستم‌های تحویل نوین واکسن‌های پروتئینی، از نانوذرات بر پایه پلیمرهای سنتزی برای انجام این



الکل ۰/۳ تا ۰/۷ درصد استفاده شده است (۲۰). در این مطالعه از پلی وینیل الکل ۲/۵ درصد استفاده شد که می‌توان چنین نتیجه گرفت که افزایش پلی وینیل الکل در مطالعه حاضر خود یکی از عوامل کاهش سایز نانوذرات PLGA است. در مطالعه دیگری توسط نظریان و همکاران با استفاده از روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال یک پروتئین نو ترکیب کایمیک در نانوذرات PLGA بارگذاری گردید که اندازه نانوذرات تولیدشده در این مطالعه در محدوده ۲۵۲/۷ نانومتر گزارش شد (۲۱). مقایسه نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر نشان‌دهنده‌ی اندازه مناسب نانوذرات تولید شده بود.

در این تحقیق، همچنین از نانوذرات PLGA نیز جهت بررسی ایمنی‌زایی در موش‌ها استفاده شد و میزان تیترا آنتی‌بادی و ایمنی‌زایی آن مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعات مختلف جهت افزایش ایمنی‌زایی از نانوذرات و میکروذرات PLGA حاوی آنتی‌ژن استفاده شده است. به‌عنوان مثال در یک مطالعه، Diwan و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند تجویز زیرجلدی توکسوئید کزاز همراه با ادجوانت قوی الیگوداکسی نوکلئوتیدهای (ODNs) حاوی CpG در نانوسفر PLGA، ایجاد پاسخ ایمنی سیستمیک و سلولی بسیار بالایی از نوع Th1 (INF- $\gamma$ , IgG3, IgG2b) و همچنین Th2 (IgG1) می‌نماید (۲۲). با توجه به مطالعات مختلف نشان داده شده است که اندازه، اصلاح سطح و الگوی رهایش نانوذرات PLGA در ایمن‌سازی آنتی‌ژن بارگذاری‌شده بر روی آن بسیار موثر است (۲۳). به‌عنوان مثال، مشخص شده است که اندازه متوسط نانوذرات بر پایه PLGA و یا پلی (L-لاکتیک اسید) بر روی ایمن‌سازی واکسن هیاتیت B روی تاثیر زیادی دارد (۲۴) و همچنین اصلاح سطح نانوذرات پلیمری PLGA با لیپیدها بر روی انتقال همزمان آنتی‌ژن و ادجوانتها تاثیر به‌سزایی دارد (۲۵). از طرفی در ارتباط با الگوی رهایش نانوذرات PLGA نیز نسبت‌های مختلف لاکتیک اسید به گلیکولیک اسید در پلیمر PLGA بر میزان رهایش آنتی‌ژن و در نتیجه میزان پاسخ ایمنی تاثیر به‌سزایی دارد. امروزه می‌توان PLGA را به صورت تجاری با نسبت‌های مختلف ۲۵:۷۵، ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵ از لاکتیک اسید به گلیکولیک اسید تهیه کرد. هر چه میزان لاکتیک اسید بیشتر باشد، میزان آب‌گریزی پلیمر هم افزایش یافته و تمایل به جذب آب در آن کمتر خواهد شد. در مواردی که نیاز به رهاسازی مقدار زیادتری از آنتی‌ژن در بازه‌ی زمانی کوتاه‌تری مد نظر باشد، می‌توان از پلیمر با میزان گلیکولیک اسید بیشتر استفاده نمود (۲۶). با توجه به رهایش بسیار کند PLGA می‌توان استنتاج کرد که چنانچه از پلیمرهای PLGA دارای نسبت بیشتر پلی گلیکولیک اسید در مقایسه با پلی لاکتیک اسید استفاده شود، مقدار بیشتری آنتی‌ژن در مدت زمان کمتر به بدن حیوان ارائه خواهد شد. همچنین تیترا آنتی‌بادی مربوط به خون‌گیری روز ۴۲ام از ۲۸ام بیشتر و دارای جهش قابل قبولی بود که این عمل ناشی از الگوی رهایش نانو ذره و البته تکرار یادآور است. طی این تحقیق، مشخص شد که میزان پروتئین تخلیص‌شده، مدل ساخت نانو ذره، رهایش و پایداری نانوذرات و

(۱۳). از آن‌جا که میزان پروتئین و مدت زمان ارائه آن به سیستم ایمنی بر میزان پاسخ‌های ایمنی تاثیر می‌گذارد، از PLGA با نسبت ۵۰:۵۰ استفاده شد (۱۴). به دلیل محافظت خوبی که این پلیمر در شرایط داخل بدن می‌تواند داشته باشد به‌عنوان حامل ذرات مختلفی اعم از داروهای با خاصیت آب‌دوستی و آب‌گریزی، پروتئین‌ها و پپتیدها، پلاسמיד، DNA و siRNA به کار می‌رود (۱۵). پلیمرهای PLGA با درجه GMP (با کارایی ساخت بالا) از دیدگاه صنعتی دارای ارزش بسیار بالایی هستند (۴). برای بارگذاری پپتیدها یا پروتئین‌ها درون نانوذرات PLGA سه روش عمده وجود دارد: روش امولسیون آب-روغن-آب (w/o/w)، روش‌های جدایی فازی و روش خشک کردن از طریق اسپری کردن. در این مطالعه از روش امولسیون آب-روغن-آب استفاده شد. در نهایت باید مرحله پراکندگی با استفاده از امواج فراصوت یا همگن‌سازهای دارای سرعت بالا انجام می‌شد (۱۶) که از امواج اولتراسونیک با قدرت ۵۰ درصد و سیکل ۵/۵ استفاده شد. اغلب، سورفکتانت‌ها برای پایدار کردن نانوذرات در فاز آبی به‌منظور جلوگیری از تجمع و یا رسوب پلیمرهای غیرمحلول در آب به کار می‌روند. در این تحقیق، پلی وینیل الکل به‌عنوان سورفکتانت مورد استفاده قرار گرفت. پلی وینیل الکل متداول‌ترین سورفکتانتی است که در روش تبخیر حلال مورد استفاده قرار می‌گیرد. در مطالعات مختلف غلظت‌های ۵/۵ تا ۵ درصد وزنی به حجمی از پلی وینیل الکل مورد استفاده قرار گرفته است. با افزایش غلظت این سورفکتانت، تولید ذراتی با اندازه کوچکتر به دلیل کاهش کشش سطحی، امکان‌پذیر است. با افزایش غلظت پلی وینیل الکل، نانوذرات تولیدشده دارای خاصیت آب‌دوستی بیشتری بوده و در نتیجه میزان جذب آن‌ها از طریق سلول‌ها، کمتر می‌شود. خصوصیات سطح نانوذرات در برداشت و جذب آن موثر است (۱۷). Eldrige و همکارانش نشان دادند ذرات آب‌گریز بیشتر از ذرات آب‌دوست جذب می‌شوند و تعداد ذرات به دام افتاده در پلاک‌های پیر با آب‌گریزی پلیمر مورد استفاده برای تهیه نانو ذره ارتباط مستقیم دارد. افزایش مقدار آب‌گریزی ذرات سبب افزایش انتشار در مخاط می‌گردد، اما انتقال این ذرات در خلال سلول‌های M را کاهش می‌دهد. لذا برای این که فرایند برداشت و جذب کارایی لازم را داشته باشد باید تعادلی بین آب‌دوستی و آب‌گریزی پلیمر مورد استفاده برای تولید نانوذرات وجود داشته باشد (۱۸). بر همین اساس، در این مطالعه از غلظت ۲/۵ درصد پلی وینیل الکل استفاده شد تا هم نانوذراتی با اندازه کوچک و پراکندگی اندازه کمتر تولید شود و هم آب‌دوستی نانوذرات بسیار بالا نباشد (۱۹). نانوذراتی که در این تحقیق تولید شدند، نانوذرات PLGA با اندازه (فاقد و حاوی پروتئین) در محدوده ۲۰۰ و ۳۰۰ نانومتر بود. در تحقیق انجام شده توسط Halayqa و Domanska کلورپرومازین هیدروکلراید (CPZ-HCl) و پرفنازین (PPH) در نانوذرات PLGA با روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال بارگذاری شد. میانگین اندازه نانوذرات PLGA حاوی CPZ-HCl و PPH به ترتیب برابر ۳۴۷ و ۳۲۵ نانومتر بود. در تحقیق Halayqa و Domanska از پلی وینیل

## References

- Schmidt TR, Scott EJ, Dyer DW. Whole-genome phylogenies of the family Bacillaceae and expansion of the sigma factor gene family in the *Bacillus cereus* species-group. *BMC Genomics*. 2011;**12**:430. [PubMed ID:21864360]. [PubMed Central ID:PMC3171730]. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-430>.
- Koehler TM. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Mol Aspects Med*. 2009;**30**(6):386-96. [PubMed ID:19654018]. [PubMed Central ID:PMC2784286]. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.004>.
- Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, Johansen HA, Fouet A, Mock M, et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol*. 2000;**66**(6):2627-30. [PubMed ID:10831447]. [PubMed Central ID:PMC110590]. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2627-2630.2000>.
- Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;**75**(1):1-18. [PubMed ID:19782542]. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>.
- Mirhaj H, Honari H, Zamani E. Evaluation of immune response to recombinant *Bacillus anthracis* LFDI-PA4 chimeric protein. *Iran J Vet Res*. 2019;**20**(2):112-9. [PubMed ID:31531033]. [PubMed Central ID:PMC6716276].
- Brey RN. Molecular basis for improved anthrax vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;**57**(9):1266-92. [PubMed ID:15935874]. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.028>.
- Gordon VM, Klimpel KR, Arora N, Henderson MA, Leppla SH. Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases. *Infect Immun*. 1995;**63**(1):82-7. [PubMed ID:7806387]. [PubMed Central ID:PMC172960]. <https://doi.org/10.1128/iai.63.1.82-87.1995>.
- Friedlander AM. Tackling anthrax. *Nature*. 2001;**414**(6860):160-1. [PubMed ID:11700539]. <https://doi.org/10.1038/35102660>.
- Hicks CW, Sweeney DA, Cui X, Li Y, Eichacker PQ. An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users. *Intensive Care Med*. 2012;**38**(7):1092-104. [PubMed ID:22527064]. [PubMed Central ID:PMC3523299]. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2541-0>.
- Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnol*. 2011;**9**:55. [PubMed ID:22123084]. [PubMed Central ID:PMC3238292]. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-55>.
- Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*. 2006;**2**(1):8-21. [PubMed ID:17292111]. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>.
- Honari H, Mojtabaaghaie S, Hoseinzadeh M. [C-CfTXA-STxB chimeric antigen loading in PLA-PEG-PLA tri-block copolymers and its immunization in mice]. *Koomesh*. 2022;**24**(4):e152763. Persian.
- Houchin ML, Topp EM. Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: a review of reactions and mechanisms. *J Pharm Sci*. 2008;**97**(7):2395-404. [PubMed ID:17828756]. <https://doi.org/10.1002/jps.21176>.
- Lu JM, Wang X, Marin-Muller C, Wang H, Lin PH, Yao Q, et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev Mol Diagn*. 2009;**9**(4):325-41. [PubMed ID:19435455]. [PubMed Central ID:PMC2701163]. <https://doi.org/10.1586/erm.09.15>.
- Cun D, Jensen DK, Maltesen MJ, Bunker M, Whiteside P, Scurr D, et al. High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: quality by design optimization and characterization. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;**77**(1):26-

تیتراژ آنتی‌بادی مشاهده‌شده دارای داده‌های قابل قبولی بودند و نانوذرآت می‌توانند وسیله‌ی مناسبی برای تحویل داروهای با وزن مولکولی کم و نیز ماکرومولکول‌های بزرگ مانند پروتئین‌ها با ترکیب PA63 باشند.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمام اساتید و دانشجویان مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماید.

### مشارکت نویسندگان:

ح.ه.؛ ایده اولیه و طراحی مطالعه؛ م.ا.م.؛ بررسی مقالات و مطالعات آماری. تمام نویسندگان در ویرایش و بازخوانی و بررسی نهایی مشارکت داشته‌اند.

### کد اخلاق:

IR.IHU.REC.1399.065

### تضاد منافع:

نویسندگان اظهار داشتند که فاقد هر گونه تضاد منافع هستند.

### حمایت مالی/معنوی:

بودجه پژوهشی این طرح توسط دانشگاه جامع امام حسین (ع) تأمین شده است.

### بازایی داده‌ها:

مجموعه داده ارائه شده در مطالعه با درخواست از نویسنده مربوطه در حین ارسال یا پس از انتشار در دسترس است.

35. [PubMed ID:21093589]. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.008>.
16. Freitas S, Merkle HP, Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J Control Release*. 2005;**102**(2):313-32. [PubMed ID:15653154]. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.10.015>.
17. Sahoo SK, Panyam J, Prabha S, Labhasetwar V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J Control Release*. 2002;**82**(1):105-14. [PubMed ID:12106981]. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00127-x](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00127-x).
18. Eldridge JH, Hammond CJ, Meulbroek JA, Staas JK, Gilley RM, Tice TR. Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the peyer's patches. *J Controlled Release*. 1990;**11**(1-3):205-14. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(90\)90133-e](https://doi.org/10.1016/0168-3659(90)90133-e).
19. Norris DA, Puri N, Sinko PJ. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;**34**(2-3):135-54. [PubMed ID:10837675]. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(98\)00037-4](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(98)00037-4).
20. Halayqa M, Domanska U. PLGA biodegradable nanoparticles containing perphenazine or chlorpromazine hydrochloride: effect of formulation and release. *Int J Mol Sci*. 2014;**15**(12):23909-23. [PubMed ID:25535080]. [PubMed Central ID:PMC4284797]. <https://doi.org/10.3390/ijms151223909>.
21. Nazarian S, Gargari SL, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Res*. 2014;**169**(2-3):205-12. [PubMed ID:23906742]. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.005>.
22. Diwan M, Tafaghodi M, Samuel J. Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres. *J Control Release*. 2002;**85**(1-3):247-62. [PubMed ID:12480329]. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00275-4](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00275-4).
23. Honari H, Minaei M, Mirhaj H, Etemad- Ayoubi SM. [Antibody titers of PEG-PLA block copolymer nanosphere containing chimeric recombinant protein of protective antigen and lethal factor of *Bacillus anthracis*]. *Koomesh*. 2021;**23**(4):441-8. Persian. <https://doi.org/10.52547/koomesh.23.4.441>.
24. Thomas C, Rawat A, Hope-Weeks L, Ahsan F. Aerosolized PLA and PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. *Mol Pharm*. 2011;**8**(2):405-15. [PubMed ID:21189035]. <https://doi.org/10.1021/mp100255c>.
25. Bershteyn A, Hanson MC, Crespo MP, Moon JJ, Li AV, Suh H, et al. Robust IgG responses to nanograms of antigen using a biomimetic lipid-coated particle vaccine. *J Control Release*. 2012;**157**(3):354-65. [PubMed ID:21820024]. [PubMed Central ID:PMC3811132]. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.029>.
26. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release*. 2012;**161**(2):505-22. [PubMed ID:22353619]. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>.

## Research Article

## Investigating the Immunogenicity of PA63 Antigen in Free Form and Loaded in PLGA Nanoparticle in Mice

Hossein Henari <sup>1,\*</sup>, Mohammad Ebrahim Minaei <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Basic Science, Imam Hossein Comprehension University, Tehran, Iran

\*Corresponding author: Faculty of Basic Science, Imam Hossein Comprehension University, Tehran, Iran. Email: honari.hosein@gmail.com.

Received 20/09/2023; Accepted 01/06/2024

### Abstract

**Background:** So far, an ideal vaccine for anthrax has not been approved. PA63 antigen has antigenic properties, and scientists use this antigen to produce new generations of vaccines. The main aim of this research is to investigate the ability to produce antibodies and immunogenicity of PA63 recombinant antigen-loaded in PLGA nanoparticles in mice as a potential vaccine candidate.

**Methods:** In this experimental study, the vector containing the PA63 gene was introduced into DE3 BL21 E. coli bacteria, and their transformation and protein expression levels were evaluated by PAGE-SDS. After purifying the recombinant proteins with column chromatography, the recombinant proteins were loaded in PLGA polymer and injected into mice three times in a row to study immunogenicity.

**Results:** The size and zeta potential of nanoparticles containing nanoparticles containing PA63 protein were measured as 261.9 nm and 34.4 mV. Electron photographs of nanoparticles show the spherical shape of nanoparticles and the correct size and zeta potential. The mean antibody titer produced against PA63 recombinant protein was increased in the loaded form compared to the free one.

**Conclusion:** In this research, due to the advantages of nanoparticle systems in reducing possible protein risks and also the possibility of increasing its immunogenicity as new delivery systems of protein vaccines, nanoparticles based on natural and synthetic polymers containing PA63 protein were used. PLGA nanoparticles with different characteristics in terms of different physicochemical properties, release patterns, synthesis methods, and loading rates were studied to determine the best form of polymer for protein loading.

**Keywords:** Anthrax, Nanoparticles, PLGA, Recombinant Proteins, Immunogenicity, Vaccine