

Paper Type: Original Article



Physicochemical and Immunological Properties of RiVax Loaded in PLGA Nanoparticles

Davoud Sadeghi¹, Mostafa Bakhshi¹, Mir-Morteza Sadat Ebrahimi¹, Shahram Nazarian¹, Mehdi Zeinoddini^{*2} 

¹Research Center of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

²Center for Biological Sciences and Biotechnology, Malik Ashtar University of Technology, Tehran, Iran;*(Associate Professor: Corresponding author: zeinoddini@modares.ac.ir).

Citation:

Sadeghi, D., Bakhshi, M., Sadat Ebrahimi, M. M., Nazarian, S. & Zeinoddini, M. (2024). Physicochemical and immunological properties of RiVax loaded in PLGA nanoparticles. *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 37 (Issue No. 3), PP. 71-82

Received: 2024.02.28

Accepted: 2024.06.16

Abstract

Introduction: Ricin is a glycoprotein poison found in the castor plant, which consists of two chains A (RTA) and B (RTB). There are two protein vaccine candidates based on chain A including RiVax and RVEc, against poisoning caused by this toxin. Although various studies have been conducted on the immunogenicity of RiVax alone and with the help of adjuvant, modern controlled release systems such as nanoparticles have not been used to improve the immunogenicity of this protein. The aim of this study is to manufacture polylactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles containing RiVax with a slow release rate and to evaluate the physicochemical parameters and immunogenic potential of this system compared to protein alone.

Methods: First, after purifying RiVax, the water-oil-water emulsion method was used to load RiVax into poly lactic acid-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles. After investigating the physicochemical properties of nanoparticles containing RiVax, they were administered to different groups of mice.

Results: According to the above results, it was determined that despite the various researches and positive results related to the nature of immunogenicity enhancement by PLGA nanoparticles, one of the important factors in the enhancement of immunogenicity of these nanoparticles is the ratio of lactic acid to glycolic acid that constitutes PLGA, which has a significant effect on the antigen release rate or on the immune response.

Keywords: Immunization, PLGA nanoparticles (NPs), Ricin, RiVax protein



خصوصیات فیزیکیوشیمیایی و ایمونولوژیکی RiVax بارگذاری شده در نانوذرات PLGA

داود صادقی^۱، مصطفی بخشی^۲، میرمرتضی سادات ابراهیمی^۳، شهرام نظریان^۴، مهدی زین الدینی^{۵*}

^۱استادیار، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران.
^۲دانش آموخته دکتری تخصصی، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران.
^۳دانش آموخته دکتری تخصصی، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران.
^۴دانشیار، مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین، تهران، ایران.
^۵دانشیار، مرکز علوم زیستی و زیست‌فناوری، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
 (*نویسنده مسئول: zeinoddini@modares.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۹

چکیده

مقدمه: ریسین یک سم گلیکوپروتئینی موجود در گیاه کرچک است که از دو زنجیره A (RTA) و B (RTB) تشکیل شده است. دو کاندید واکسن پروتئینی بر پایه زنجیره A شامل RiVax و RVEc بر مقابله با مسمومیت ناشی از این سم وجود دارد. اگرچه مطالعات مختلفی در مورد قدرت ایمنی زایی RiVax به تنهایی و با کمک ادجوانت (ماده محرک) انجام شده است، اما سیستم‌های با قابلیت ره‌ایش کنترل شده نوین مانند نانوذرات، به منظور بهبود ایمنی‌زایی این پروتئین تا به امروز مورد استفاده قرار نگرفته است. هدف از این مطالعه ساخت نانوذرات پلی لاکتیک-کو-گلاپکولیک اسید (PLGA) حاوی RiVax با سرعت ره‌ایش آهسته و ارزیابی پارامترهای فیزیکیوشیمیایی و پتانسیل ایمنی زایی این سیستم در مقایسه با پروتئین تنها می باشد.

روش‌ها: ابتدا پس از خالص‌سازی RiVax، از روش امولسیون آب-روغن-آب برای بارگذاری RiVax در نانوذرات PLGA استفاده شد. پس از بررسی ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی نانوذرات حاوی RiVax، آن‌ها به گروه‌های مختلف موشی تجویز شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان دهنده این بود که با توجه به استفاده از پلیمر PLGA با نسبت پلی لاکتیک اسید بیشتر نسبت به پلی گلاپکولیک اسید، الگوی آزادسازی پروتئین از نانوذره آهسته بود (۱۲ درصد پروتئین در ۴۰ روز) و نتایج ایمن‌سازی تفاوتی در پاسخ ایمنی نانوذرات حاوی RiVax نسبت به RiVax تنها نشان نداد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج فوق مشخص شد که با وجود تحقیقات مختلف و نتایج مثبت در ارتباط با ماهیت ارتقاء ایمنی زایی توسط نانوذرات PLGA یکی از عوامل مهم در ارتقاء ایمنی زایی این نانوذرات نسبت اسید لاکتیک به اسید گلیکولیک تشکیل دهنده PLGA است که این عامل تأثیر قابل توجهی بر میزان آزادسازی آنتی ژن و یا بر پاسخ ایمنی دارد.

مقدمه

بسیاری از ارگانسیم ها سمومی تولید می کنند که روی سلول های دیگر تأثیر می گذارد و گاهی منجر به مرگ می شود. این پروتئین ها به افزایش زنده ماندن و تولیدمثل موجودات کمک می کند. برخی از آن ها نقش های دقیق و ویژه ای دارند. پروتئین های غیرفعال-کننده ریبوزوم (Ribosome-Inactivating Proteins) تولید شده توسط برخی گیاهان، نمونه ای شناخته شده از این گروه هستند. RIP ها به طور ویژه بر روی ریبوزوم های سلول های یوکاریوتی اثر داشته و منجر به مهار سنتز پروتئین و در نهایت مرگ سلولی می شوند. ریسین یکی از RIP های شناخته شده است که از گیاه کرچک استخراج می شود. وزن مولکولی ریسین حدود ۶۵-۶۰ کیلودالتون است و از دو زنجیره A و B تشکیل شده است [1]، [3]. مطالعات حیوانی نشان داده است که محافظت در برابر مصرف خوراکی، استنشاق و مسمومیت تزریقی ریسین با ایمن سازی غیرفعال (آنتی بادی خنثی کننده خاص علیه ریسین) یا ایمن سازی فعال (از طریق واکسن) امکان پذیر است [4]. تحقیقات متعددی برای ساخت واکسن مناسب علیه سم ریسین انجام شده که یکی از بهترین واکسن ها، نوعی پروتئین نوترکیب به نام RiVax است. این پروتئین نوترکیب، زنجیره A سم ریسین (RTA) دگلیکوزیله با دو جهش نقطه ای شامل جایگاه سمیت ریبوزومی (Y80A) و موتیف مسئول ایجاد سندرم نشت عروقی (V76M) است. مطالعات مختلفی در مورد RiVax به تنهایی و همراه با ادجوانت انجام شده است، اما از سیستم های تحویل نوین مانند نانوذرات (NPs) برای بهبود ایمنی زایی این پروتئین ها تا به امروز استفاده نشده است [5]، [8]. یکی از سیستم های جدید دارورسانی و واکسن رسانی که امروزه به طور متداول مورد استفاده قرار می گیرد، سیستم تحویل مبتنی بر نانوذرات است. امروزه نانوبیوفناوری نقش زیادی در توسعه واکسن ایفا کرده و فرصت هایی را در طراحی نانوذرات فراهم نموده که از نظر ترکیب، اندازه، شکل و سطح متفاوت است. استفاده از نانوذرات نه تنها بر سرعت آزادسازی آنتی ژن تأثیر می گذارد، بلکه باعث افزایش پایداری در بدن نیز می شود. طی دو دهه گذشته ذرات نانومقیاس (کمتر از ۱۰۰۰ نانومتر) مانند ذرات شبه ویروس (virus like particles)، لیپوزوم ها، ISCOM ها، پلیمرها و نانو ذرات تجزیه ناپذیر به عنوان بستر انتقال بالقوه آنتی ژن های واکسن مورد توجه قرار گرفته اند که می توانند آنتی ژن های واکسن را تثبیت و به عنوان کمک کننده عمل نمایند. برخی از این نانوذرات (NPs) می توانند از طریق مسیرهای مختلف وارد سلول های ارائه دهنده آنتی ژن شده و در نتیجه پاسخ ایمنی به آنتی ژن را تعدیل کنند [9]. همچنین نانوذرات به دلیل شباهت اندازه با ترکیبات بدن به راحتی توسط اندوسیتوز وارد بدن می شوند [10]. پلیمر (Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA)) یکی از پلیمرهای پرکاربرد برای تهیه نانوذرات زیست سازگار و زیست تخریب پذیر است. این پلیمر یکی از موفق ترین پلیمرهای مورد استفاده در دارورسانی است، در واقع مونومرهای متابولیک اسید لاکتیک و اسید گلیکولیک از هیدرولیز PLGA تولید می شوند. اسید لاکتیک، محصول طبیعی متابولیسم در اکثر موجودات است که پس از ورود به چرخه هضم، به آب و دی اکسید کربن تجزیه می شود. اسید گلیکولیک یکی از اجزای پلی ساکارید موجود در اندام های حیوانی است که بدون تغییر از کلیه دفع می شود. با توجه به اینکه این مونومرها به راحتی در بدن متابولیزه می شوند، استفاده از PLGA برای تهیه نانوذره برای تحویل واکسن ساختار پروتئینی برای کاربردهای زیست پزشکی مناسب است [11]، [13]. هدف از این مطالعه ساخت نانوذرات PLGA حاوی RiVax با سرعت رهایش آهسته و ارزیابی پارامترهای فیزیکوشیمیایی و پتانسیل ایمنی زایی این سیستم در مقایسه با RiVax به تنهایی است.

مواد و روش ها

بیان و تخلیص RiVax

در این تحقیق ژن به رمز در آورنده زنجیره A ریسین که دارای دو جهش در جایگاه سمیت ریبوزومی و موتیف سندرم نفوذ رگی بود (RiVax, Y80A, V76M)، از تحقیق قبلی تهیه شد [14]. این ژن در داخل پلاسمید pET21a+ که حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین است قرار داده شده بود که دارای جایگاه های برش با آنزیم های XhoI و NdeI بود. پروتئین نوترکیب RiVax پس از انتقال پلاسمید نوترکیب به *E. coli* BL21 (DE3) و تایید بیان، خالص سازی شد. برای خالص سازی RiVax از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA استفاده شد. جهت انجام این کار پروتئین فوق تحت شرایط طبیعی با شیب غلظتی ایمیدازول تخلیص و نمونه های حاصل بر روی ژل پلی اکریل آمید (SDS-PAGE 14 درصد) الکتروفورز شدند [14]. همچنین در اینجا جهت سنجش میزان پروتئین از روش پروتئین سنجی برادفورد استفاده شد و اعداد حاصل با نمودار استاندارد BSA مقایسه شد.

ساخت نانوذرات PLGA بارگذاری شده با پروتئین نو ترکیب RiVax

پلیمر PLGA (لاکتید: گلیکولید ۷۵:۲۵) از سیگما آلدریج خریداری شد. برای تهیه نانوذرات از روش آب-روغن-آب (امولسیون دوگانه با تبخیر حلال) استفاده شد. ۳۰ میلی گرم پلیمر PLGA به چهار میلی لیتر دی کلرومتان اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق همگن شد. سپس یک میلی گرم پروتئین به صورت قطره چکان به محلول اضافه و به مدت ۵ دقیقه هموزن شد تا امولسیون آب-روغن ساخته شود. امولسیون تحت اولتراسونیک (سه بار با تقویت ۵۰ درصد و سیکل ۰/۵ هر بار به مدت ۲۰ ثانیه) قرار گرفت. در ادامه هشت میلی لیتر پلی وینیل الکل ۲/۵ درصد (w/v) در آب مقطر (دوبار تقطیر) به صورت تازه تهیه شد و امولسیون PLGA-آنتی ژن به آرامی به محلول پلی وینیل الکل اضافه شد. سونیکاسیون چهار بار به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. حجم امولسیون w/o/w تولید شده با افزودن آب مقطر به ۳۰ میلی لیتر تنظیم شد و محلول به مدت دو ساعت دیگر بر روی همزن قرار گرفت تا دی کلرومتان کاملاً تبخیر شود. جمع آوری نانوذرات با سانتریفیوژ در ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه در ۲۰ دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی گراد انجام شد [15].

پراکندگی دینامیک نور (DLS)

جهت بررسی شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا نانوذرات سنتز شده از دستگاه پراکندگی دینامیک نور مدل Malvern ساخت کشور انگلستان استفاده شد. جهت انجام اینکار نانوذرات تولید شده در آب مقطر رقیق شدند و پس از ورتکس در کوت مخصوص قرار داده شدند و اندازه گیری ها در دمای اتاق صورت پذیرفت.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

جهت بررسی خصوصیات ظاهری نانوذرات از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل EM3200 ساخت شرکت KYKY استفاده شد. این مدل میکروسکوپی دارای دو نوع دتکتور با نام های SE (Secondary electron detector) و BSE (Back scattered electron detector) است. به منظور جلوگیری از رشد نانوذرات نمونه های تازه تهیه شده بر روی یک سطح شیشه ای قرار داده شدند. پس از خشک شدن کامل، نمونه بوسیله یک لایه نازک طلا با روش P.V.D (Physical vapor deposition) پوشش داده شد. جهت انجام لایه نشانی طلا از دستگاه Sputter coater مدل SBC12 ساخت شرکت KYKY استفاده شد. در نهایت پس از لایه نشانی، نمونه نانوذرات توسط میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ارزیابی بازده وزنی تولید ذرات، بازده و ظرفیت بارگذاری نانوذرات

به منظور بررسی بازده وزنی تولید نانوذرات (Particle yield)، پس از تهیه نانوذرات نمونه ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ، محلول رویی حذف و نانوذرات توسط لیوفیلیزاتور خشک گردید. ماده خشک بدست آمده توسط ترازوی دیجیتال توزین و طبق رابطه شماره ۱، درصد بازده وزنی تولید نانوذرات محاسبه شد.

همچنین از روش غیرمستقیم برای تخمین میزان پروتئین محبوس شده در نانوذرات استفاده شد. پس از تهیه نانوذرات حاوی RiVax در شرایط بهینه، سوسپانسیون به دست آمده تحت سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد قرار گرفت، مایع رویی جدا شد، میزان پروتئین موجود در مایع رویی به روش برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین و بازده بارگذاری (Loading Efficiency) و ظرفیت بارگذاری (Loading Capacity) با روابط زیر محاسبه شدند [16].

$$\text{Partical Yield\%} = \frac{\text{Total amount of PLGA NPs}}{\text{Theoretical mass (PLGA + entrapped RiVax)}} \times 100$$

$$\text{Loading Efficiency\%} = \frac{\text{Total amount of RiVax} - \text{Free RiVax}}{\text{Total amount of RiVax}} \times 100$$

$$\text{Loading Capacity\%} = \frac{\text{Total amount of RiVax} - \text{Free RiVax}}{\text{Total amount of PLGA NPs}} \times 100$$

پایداری RiVax در حین بارگذاری در نانوذرات PLGA

برای مشخص نمودن تأثیر احتمالی روش تولید نانوذره PLGA بر روی پایداری و ماندگاری پروتئین نوترکیب، ابتدا حجم مشخصی از محلول حاوی نانوذره پس از تولید به دو لوله فالكون ۱۵ میلی لیتری منتقل و سپس سانتریفیوژ شد. پس از حذف محلول رویی، با توجه به رهایش کند نانوذرات پی‌ال‌جی‌ای، به رسوب آنها ۲ میلی لیتر بافر رهایش سریع نانوذره پی‌ال‌جی‌ای (محلول حاوی SDS پنج درصد و NaOH ۰/۱ مولار) اضافه شد. سپس نمونه نانوذرات موجود در دو فالكون در مدت زمان های یک ساعت و ۱۶ ساعت در محلول رهایش سریع بر روی شیکر به آرامی شیک شدند. سپس نمونه جمع‌آوری شده از تخریب کامل نانوذرات پی‌ال‌جی‌ای به همراه حجم مشخص پروتئین نوترکیب RiVax، در چاهک‌های ژل SDS-PAGE تزریق و با شدت جریان ۲۰ میلی‌آمپر الکتروفورز گردید. در نهایت ژل SDS-PAGE رنگ آمیزی شد تا وجود باندهای پروتئینی رهایش شده از نانوذرات مشخص شود. همچنین درصد باندهای پروتئینی حاصل از نانوذرات رهایش شده با باند پروتئین نوترکیب RiVax توسط نرم افزار BioDoc Analyze بررسی شد. همچنین جهت تأیید حفظ ویژگی پروتئین پس از بارگذاری در نانوذرات، پروتئین رهایش شده در حضور آنتی بادی ضد زنجیره A توسط وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت [16]، [17].

رهایش RiVax از نانوذرات PLGA در شرایط *In vitro*

نانوذرات PLGA حاوی سه میلی گرم RiVax نوترکیب در ۵۰۰ میکرولیتر بافر SBF (سیال بدن شبیه سازی شده) مجدداً معلق شدند و با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تکان داده شدند. نمونه برداری به شرح زیر انجام شد: محلول واکنش با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس ۵۰۰ میلی لیتر مایع رویی جمع‌آوری شد و به همان حجم بافر SBF به میکروتیوب اضافه شد. فواصل نمونه گیری در مرحله اولیه ۲۴ ساعت بود و سپس هر سه روز یکبار نمونه گیری انجام می شد که این کار تا ۴۰ روز ادامه یافت.

ایمن زایی موش ها

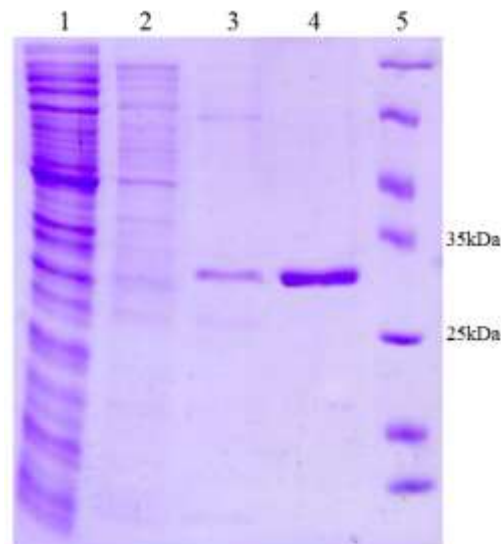
در این تحقیق سه گروه موش ۸-۶ هفته با وزن تقریبی ۲۵-۲۰ گرم (۱۲ موش در هر گروه) در قفس های جداگانه قرار گرفتند. NPهای نوترکیب RiVax و PLGA حاوی RiVax به روش زیر جلدی- داخل صفاقی (۵۰ درصد زیر جلدی و ۵۰ درصد داخل صفاقی) در چهار بازه زمانی (روزهای ۰، ۱۴، ۲۸ و ۴۲ از شروع آزمایش) به هر گروه تزریق شد. به گروه های موش ۱۰ میکروگرم پروتئین RiVax، به تنهایی یا بارگذاری شده در نانوذرات PLGA تزریق شد. در گروه دیگر از بافر سالین به عنوان شاهد استفاده شد. تیتراسیون IgA و IgG در نمونه های سرم و مدفوع موش های ایمن شده یک هفته پس از تجویز چهارم (روز ۴۹) آنتی ژن انجام شد. تهیه نمونه مدفوع با افزودن ۳۰۰ میلی لیتر بافر سالین استریل به ۱۰۰ میلی گرم مدفوع انجام شد. نمونه‌ها با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه در مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مواد رویی جمع‌آوری شد و ۱۰ میکرولیتر PMSF (۱۰۰ میلی‌مولار) به یک میلی لیتر مایع رویی اضافه شد و در نهایت در مدت ۲۵ دقیقه با دور ۱۳۵۰۰ سانتریفیوژ و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای تعیین آنتی بادی تولید شده علیه آنتی ژن از روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد. جهت انجام این کار مقدار ۵ میکروگرم، پروتئین نوترکیب محلول در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کوتینگ داخل هر یک از چاهک های الایزا ریخته شد. سپس میکروپلیت به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. پس از تخلیه مواد مرحله اول، محتوای چاهک ها پنج مرتبه با بافر بافر سالین حاوی توپین شستشو داده شد. سپس توسط بافر بلاکینگ (محلول شیرخشک ۵ درصد وزنی/ حجمی در بافر سالین حاوی توپین) کف چاهک ها مسدود شد. پس از انجام شستشو چاهک ها، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مدفوع بدون رقت سازی به چاهک ها اضافه شد. همچنین برای بررسی تیتراژ آنتی بادی IgA و IgG سرم به ترتیب رقت‌های یک پنجم و یک صدم بکار برده شد. پس از انجام شستشو کونژوگه با HRP در نسبت رقت ۱/۱۰۰۰ استفاده شد. در نهایت سوبسترا حاوی محلول OPD (O-phenylenediamine) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و میکروپلیت به محل تاریکی منتقل شد تا واکنش انجام گیرد. پس از تغییر رنگ محلول، واکنش با اسید سولفوریک ۲/۵ مولار متوقف و رنگ زرد به نارنجی تبدیل گردید. پس از توقف کامل واکنش، جذب نوری چاهک ها توسط دستگاه قرائت کننده الیزا در طول موج ۴۹۵ نانومتر خوانده شد. سپس تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار Statistica (آزمون دانکن) انجام شد.

نتایج و بحث

ساخت RiVax

برای خالص‌سازی پروتئین، پس از لیز سلولی، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و مایع رویی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد برای خالص‌سازی RiVax توسط ستون Ni-NTA در شرایط غیردناوره‌سازی نگهداری شد. شکل ۱ نتایج خالص‌سازی پروتئین توسط ستون را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، بخش عمده‌ای از پروتئین پس از اعمال بافر حاوی ایمیدازول (۲۵۰ میلی مولار) شسته می‌شود.



شکل ۱- SDS-PAGE برای RiVax خالص شده روی ژل آکریل آمید ۱۴ درصد: (۱) سوپ قبل از عبور از ستون Ni-NTA، (۲) سوپ پس از عبور از ستون Ni-NTA، (۳) بافر شستشو اول (ایمیدازول ۴۰ میلی مولار)، (۴) بافر شستشو دوم (ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار)، (۵) نشانگرهای وزن مولکولی (Prestained Protein Ladder 10-170, 100µl-SL7012)

Figure 1- SDS-PAGE of purified Rivax on 14 percent acrylamide gel: 1) Soup before pass through Ni-NTA column, 2) Soup after pass through Ni-NTA column, 3) Elution buffer1 (40mM imidazole), 4) Elution buffer2 (250mM imidazole), 5) The molecular weight markers (Prestained Protein Ladder 10-170, 100µl-SL7012)

تجزیه و تحلیل DLS

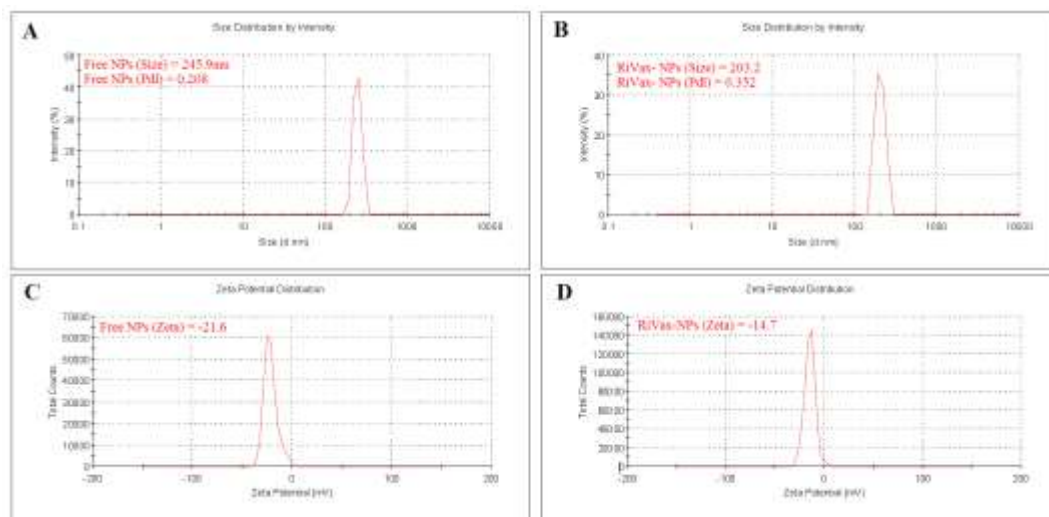
نتایج این مطالعه نشان داد که قطر و شاخص PdI نانوذرات آزاد RiVax به ترتیب $245/9$ نانومتر و $0/208$ بود. (شکل ۱A) پارامترهای ذکر شده در بالا برای NP های حاوی RiVax به ترتیب $203/2$ نانومتر و $0/352$ بودند. (شکل ۱B) خروجی این آزمون نشان داد که اندازه نانوذرات حاوی RiVax کاهش یافته، اما افزایش یافته است. همچنین، نتایج نشان داد که پتانسیل زتا نانوذرات PLGA آزاد $21/6$ میلی ولت است (شکل ۲A) و این پارامتر برای نانوذرات حاوی RiVax $14/7$ میلی ولت (شکل ۲B) است.

تصویربرداری SEM

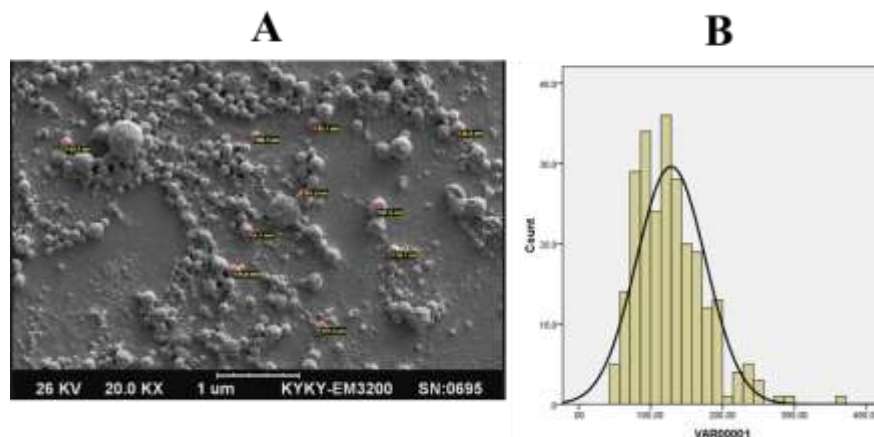
تصاویر SEM شکل کروی نانوذرات PLGA ساخته شده را نشان می‌دهد. همچنین، نتایج این مطالعه خروجی DLS را تایید می‌کند. (شکل ۳A) اندازه متوسط نانوذرات تجزیه شده توسط نرم افزار ImageJ، 128 نانومتر بود (شکل ۳B).

بازده ذرات (Particle yield)، ظرفیت و بازده بارگذاری نانوذرات

سوپرناتانت های جمع آوری شده به منظور محاسبه بازده ذره، ظرفیت بارگذاری و کارایی بارگذاری نانوذرات PLGA حاوی RiVax و BSA به عنوان پروتئین مدل مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در هر یک از پارامترهای فوق الذکر RiVax نو ترکیب بیشترین درصد را دارد (جدول ۱).



شکل ۲- نمودارهای آمار اندازه و توزیع که در آن اندازه ذرات ۲۴۵/۹ نانومتر قبل از بارگذاری پروتئین (A) و ۲۰۳/۲ نانومتر بعد از بارگذاری پروتئین (B). همچنین پتانسیل زتا نانوذرات آزاد ۲۱/۶- میلی ولت (C) و پتانسیل زتا نانوذرات حاوی RiVax ۱۴/۷- میلی ولت (D) Figure 2- The charts show size statistics and their distribution in which size was 238.4 nm and 190.3 nm before (A) and after (B) protein entrapment. Also, the zeta potential of NPs was measured -21.6 mV(C) and the zeta potential of NPs containing RiVax was estimated -14.7 mV (D)



شکل ۳- تصویر SEM از نانوذرات PLGA (A) و تحلیل اندازه متوسط نانوذرات توسط نرم افزار ImageJ (B) Figure 3- SEM imaging. A) Imaging of PLGA NPs, B) The average size of NPs analyzed by ImageJ software

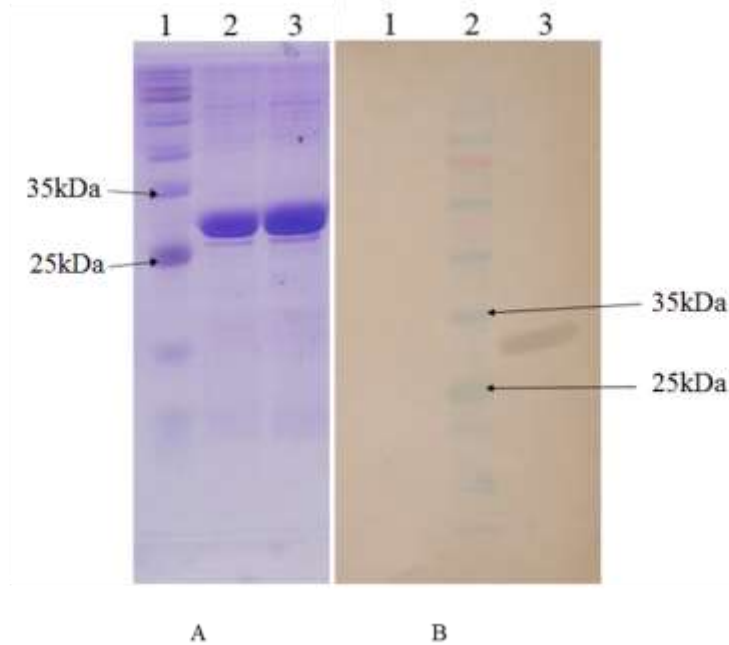
جدول ۱- بازده ذرات (PY)، ظرفیت بارگذاری (LC) و کارایی بارگذاری (LE) نانوذرات PLGA

Table 1- Particle yield (PY), loading capacity (LC) and loading efficiency (LE) of PLGA NPs

Type	LC%	PY%	LE%
PLGA nanoparticle containing BSA	1.2	89	33
PLGA nanoparticle containing RiVax	3.2	97.7	97

پایداری RiVax در حین بارگذاری در نانوذرات

پس از ارزیابی رهاسازی RiVax از نانوذرات PLGA و در مقایسه با RiVax تنها به عنوان شاهد، مشخص شد که پروتئین به دام افتاده دنا توره نشده است (شکل A ۴) برای این پیشنهاد، همان مقادیر نمونه الکتروفورز شده بر روی SDS-PAGE، نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل شدت باند با تحلیل BioDoc نشان داد که ۶۴ درصد از کل پروتئین روی نانوذرات بارگذاری شده است. همچنین، نتایج به دست آمده از وسترن بلات نشان می دهد که RiVax آزاد شده از نانوذرات PLGA فعالیت و خواص آنتی ژنی خود را حفظ کرده است (شکل B ۴).

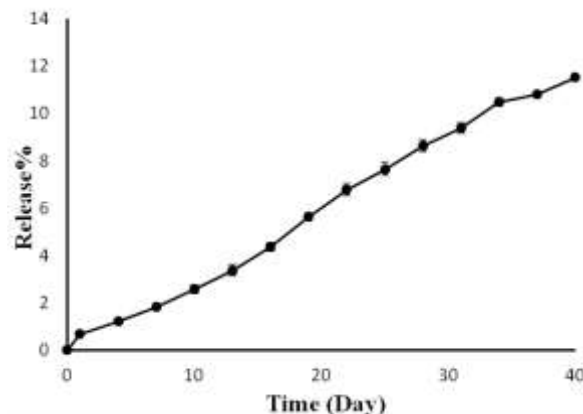


شکل ۴- (A) تحلیل SDS-PAGE از RiVax آزاد شده از نانوذرات PLGA خط ۱. نشانگر مولکولی پروتئین، خط ۲. RiVax آزاد شده از نانوذرات، خط ۳. RiVax تنها به عنوان کنترل. (B) تحلیل وسترن بلات RiVax آزاد شده از نانوذرات PLGA خط ۱. BSA، خط ۲. نشانگر مولکولی پروتئین، خط ۳. RiVax رها شده از نانوذرات

Figure 4- A) SDS-PAGE analysis of the released RiVax from PLGA NPs. Lane1: Protein molecular marker. Lane 2: Released RiVax from NPs. Lane 3: Naked RiVax as control. B) Western blotting analysis of released RiVax from PLGA NPs. Lane 1: BSA. Lane 2: Protein molecular marker. Lane 3: Released RiVax from NPs

پروفایل رهاسازی RiVax از نانوذرات (*In-vitro*)

رهش RiVax از نانوذرات PLGA به مدت ۴۰ روز ارزیابی شد. همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده، پروفایل آزادسازی پروتئین در ۲۴ ساعت ابتدایی فرایند رهایش سریع بود و سپس با سرعت ثابت ادامه یافت. پس از دوره انکوباسیون (روز ۴۰) تقریباً ۱۲ درصد از پروتئین به دام افتاده از نانوذرات آزاد شد که با مطالعات مشابه انجام شده بر روی نانوذرات PLGA مطابقت کامل دارد.

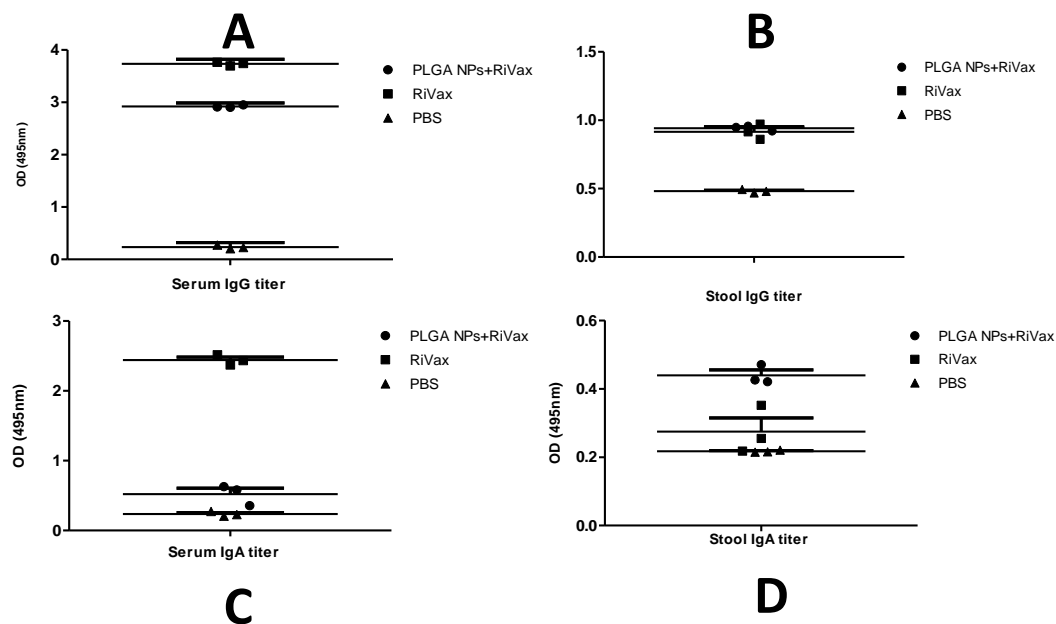


شکل ۵- مشخصات رهاسازی آزمایشگاهی RiVax از نانوذرات PLGA طی ۴۰ روز
Figure 5- *In-vitro* release profile of RiVax from PLGA NPs during 40 days

ایمنی زایی موش

از تحلیل آماری نتایج پاسخهای ایمن‌سازی در موش‌ها مشخص شد که بین RiVax تنها و نانوذرات حاوی RiVax، تفاوت معنی‌داری در سطح IgG در سرم ($P > 0.01$) (شکل A ۶) و مدفوع ($p < 0.01$) وجود ندارد (شکل B ۶). با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل مربوط به IgA در سرم در شکل C ۶، بالاترین تیتراسیون، از RiVax تنها بود که تفاوت معنی‌داری با سایر تزریق‌ها داشت

($p < 0.01$). همانطور که در شکل D نشان داده شده است، از تجزیه و تحلیل آماری IgA مدفوع مشخص شد، هیچ تفاوت معنی داری بین آنتی بادی های افزایش یافته از هر گروه وجود ندارد ($p > 0.01$).



شکل ۶- میانگین تیتراسیون IgG و IgA در نمونه های سرم و مدفوع در موش های ایمن شده با تجویز SC-IP. (A) میانگین تیتراسیون IgG در سرم، (B) میانگین تیتراسیون IgG در مدفوع، (C) میانگین تیتراسیون IgA در سرم، (D) میانگین تیتراسیون IgA در مدفوع

Figure 6- The average of IgG and IgA titration in serum and stool samples at immunized mice by SC-IP administration. A) The average of IgG titration in serum. B) The average of IgG titration in stool. C) The average of IgA titration in serum. D) The average IgA titration in the stool

ریسین یک گلایکوپروتئین سمی است و می توان آن را به راحتی از دانه های کرچک استخراج کرد و یکی از عوامل پر خطر از نظر لیست CDC محسوب می شود و در درجه B میزان خطر دسته بندی می شود. برای آن پادزهر تایید شده ای وجود ندارد با این حال، در حال حاضر دو واکسن زیر واحد بر علیه آن وجود دارد RiVax و RVEc، که هر دو بر اساس زیر واحد RTA هستند. RiVax سیستم ایمنی انسان را وادار می کند تا آنتی بادی هایی تولید کند که RT را شناسایی و با اتصال با آنها از ورود آن به داخل سلول ها و کشتن آن ها جلوگیری می کند [18]. مطالعات زیادی در مورد ایمنی زایی RiVax به تنهایی یا در ترکیب با ادجوانت ها وجود دارد، با این حال، مطالعه منتشر شده ای در مورد ارزیابی ایمنی زایی واکسن کاندید از طریق تحویل توسط نانوذرات وجود ندارد. PLGA یک کopolymer مصنوعی و مشتقات آن پلی استرهای آلیفاتیک هستند که در نسبت های مختلف اسید لاکتیک و اسید گلیکولیک، وزن های مولکولی مختلف و با تنوع گروه های انتهایی (استر یا کربوکسیلیک اسید) سنتز می شوند [19]. پلیمرهای PLGA به طور گسترده در چند دهه گذشته برای کاربردهای زیست پزشکی مورد مطالعه قرار گرفته اند، به دلیل خواص ایمنی فوق العاده آنها، از نخ بخیه تا کمک به بازسازی استخوان ها و همچنین در ایمپلنت ها و نانوذرات به کار رفته در رسانش دارو و واکسن می توان اشاره نمود. این ترکیب هیچ اثر سمی در بدن نداشته و همچنین مورد تایید FDA نیز است [18]. این پلیمر می تواند به عنوان حامل برای عوامل مختلف مانند داروهای آنگریز و آب دوست، پروتئین ها و پپتیدها، DNA و siRNA مورد استفاده قرار گیرد. همچنین این پلیمر با توجه به نسبت های مختلف منومرهای خود دارای سرعت رهایش متفاوتی است [20]. در این مطالعه، RiVax نوترکیب در نانوذرات PLGA با سرعت رهایش آهسته بارگذاری شد. سه روش اصلی برای بارگیری پپتیدها و پروتئین ها در نانوذرات PLGA وجود دارد که شامل روش های امولسیون آب/روغن/آب، جداسازی فازی و روش خشک کردن پاششی می باشند. در مطالعه حاضر از امولسیون آب/روغن/آب (امولسیون دوگانه با تبخیر حلال) استفاده شد. در این روش پپتیدها و پروتئین های محلول در آب در محلول PLGA در حلال دی کلرومتان پراکنده شدند. سپس این کمپلکس (آب در روغن) با افزودن پلی وینیل الکل به عنوان سورفکتانت به امولسیون آب/روغن/آب تبدیل شد [21]. پلی وینیل الکل بهترین سورفکتانت رایجی است که در روش تبخیر حلال استفاده می شود. غلظت های مختلف (درصد ۵-۵/۰ w/v) این سورفکتانت در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. می توان با

افزایش غلظت پلی وینیل الکل به دلیل کاهش کشش سطح، ذرات با اندازه های کوچکتر را تهیه کرد [22]. با این وجود، ویژگی آبریز بودن نانوذرات تهیه شده به دلیل افزایش غلظت سورفکتانت افزایش می یابد و در نتیجه جذب سلولی آنها کاهش می یابد زیرا خواص سطحی نانوذرات در این فرآیند مؤثر است [23]. Eldridge و همکاران [24] نشان دادند که ذرات آبریز بیشتر از ذرات آبدوست جذب می شوند و تعداد ذرات به دام افتاده رابطه مستقیمی با خاصیت آبریز بودن پلیمر مورد استفاده برای تهیه آنها دارد. برای اینکه فرآیند جذب مؤثر باشد، باید شرایط تعادلی بین خواص آبریز و آب دوست یک پلیمر وجود داشته باشد. با در نظر گرفتن این اصول، ۲/۵ درصد (w/v) پلی وینیل الکل به منظور تهیه نانوذرات با اندازه کوچکتر و یا افزایش هیدروفیل نانوذرات مورد استفاده قرار گرفت [25]. همچنین با در نظر گرفتن نتایج DLS مشخص شد که میانگین اندازه نانوذرات آزاد و بارگذاری شده به ترتیب ۲۳۸ و ۱۹۰ نانومتر است. در تحقیق دیگری نشان داده شد که میانگین اندازه نانوذرات PLGA به روش امولسیون دوگانه با پلی وینیل الکل ۰/۷-۰/۳ درصد به ترتیب ۳۴۷ و ۳۲۵ نانومتر است [26]. در تحقیق حاضر، ۲/۵ درصد (w/v) پلی وینیل الکل استفاده شد. این موضوع نشان داد که افزایش غلظت پلی وینیل الکل یکی از عوامل مؤثر بر اندازه نانوذرات PLGA است. در مطالعه دیگر، یک پروتئین نوترکیب کایمیریک با روش امولسیون مضاعف در نانوذرات PLGA بارگذاری شد که اندازه ذرات آماده شده حدود ۲۵۲/۷ نانومتر بود [27]. از مقایسه نتایج این مطالعه و سایرین، اندازه ذرات آماده شده مناسب در نظر گرفته شد. همچنین پتانسیل زتا برای نانوذرات PLGA حاوی RiVax و نانوذرات آزاد به ترتیب ۲۱/۶- و ۱۴/۷- بود. در مطالعات دیگر نیز این پارامتر در محدوده منفی قرار داشت. برای مثال در تحقیق Tamilselvan و همکاران در سال ۲۰۱۴، نانوذرات PLGA حاوی داروهای آبدوست را سنتز کردند که پتانسیل زتا برای این نانوذرات ۱۳- میلی ولت بود [28]. می توان استنباط کرد که تغییرات قابل توجهی در میزان پتانسیل زتا بین نانوذرات آزاد و حاوی RiVax رخ نداده است و در هر دو وضعیت، پایدار هستند که از تجمع آنها جلوگیری می کند. همچنین پتانسیل زتا نانوذرات PLGA منفی در مقایسه با ذرات با بار مثبت برای جذب روده ای مناسب تر است. مطالعات دیگر نشان می دهد که نانوذرات با بار مثبت در مقایسه با آنهایی که بار منفی دارند بیشتر از بدن دفع می شوند. بنابراین نانوذرات ساخته شده در این تحقیق زمان بیشتری در بدن می مانند که این موضوع می تواند در تقویت دوره ایمن سازی پروتئین RiVax مؤثر باشد [29]. با توجه به فرآیند تهیه نانوذرات (امولسیون W/O/W) و همچنین تأثیر این روش بر کنفورماسیون پروتئین [30] و حساسیت پروتئین RiVax در یک محیط ناسازگار [6] به منظور تأیید ساختار صحیح پروتئین، نانوذرات PLGA حاوی RiVax در محلول آزادسازی قرار داده شد و نرخ جذب نانوذرات اندازه گیری و مشخص شد که مقدار پروتئین به دام افتاده ۶۴ درصد کل پروتئین است. نتایج نشان داد که پروتئین در تمام مراحل به دام افتادن پایدار بوده است. در مطالعه حاضر نانوذرات PLGA تیترا آنتی بادی مطلوبی را در مقایسه با پروتئین تنها ارائه ندادند و ایمنی مناسبی را در موش ها ایجاد نکردند. در همین ارتباط می توان گفت با توجه به مطالعات مختلف نشان داده شده است که اندازه، اصلاح سطح و الگوی رهایش نانوذرات PLGA در ایمن سازی آنتی ژن بارگذاری شده بر روی آن بسیار مؤثر است. به عنوان مثال مشخص شده است که اندازه متوسط نانوذرات بر پایه PLGA و یا پلی (L-لاکتیک اسید) بر روی ایمن سازی واکسن هیپاتیت B روی تأثیر زیادی دارد [31] و همچنین اصلاح سطح نانوذرات پلیمری PLGA با لیپیدها بر روی انتقال همزمان آنتی ژن و ادجوانت ها تأثیر بسزایی دارد [32]. از طرفی در ارتباط با الگوی رهایش نانوذرات PLGA نیز نسبت های مختلف لاکتیک اسید به گلیکولیک اسید در پلیمر PLGA بر میزان رهایش آنتی ژن و در نتیجه میزان پاسخ ایمنی تأثیر به سزایی دارد. یکی از مهمترین ویژگی های کوپلیمر PLGA نسبت اسید لاکتیک به اسید گلیکولیک در ترکیب نهایی است. امروزه نسبت های مختلفی مانند ۲۵:۷۵، ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵ به صورت تجاری در دسترس هستند. با افزایش مقدار اسید لاکتیک، آب گریزی PLGA افزایش یافته و تمایل به جذب آب کاهش می یابد. در صورت نیاز به آزادسازی بیشتر آنتی ژن در مدت زمان کوتاهتر می توان از PLGA با نسبت اسید گلیکولیک بیشتری استفاده نمود [11]، [33]. نسبت اسید لاکتیک به اسید گلیکولیک در ترکیب PLGA مورد استفاده در این تحقیق ۷۵:۲۵ با سرعت رهش آهسته، به دلیل مقدار زیاد اسید لاکتیک بود. ۱۲ درصد از کل پروتئین به دام افتاده پس از ۴۰ روز آزاد شده بود. همانطور که Rajapaksa و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند، حدود ۱۴-۱۲ درصد از کل پروتئین به دام افتاده پس از ۴۰ روز با استفاده از اسید لاکتیک: اسید گلیکولیک با نسبت ۸۵:۱۵ آزاد شد [۱۷]. با توجه به نتایج مربوط به سرعت آزادسازی RiVax از نانوذرات PLGA و پاسخ های ایمنی، پیشنهاد می شود از یک PLGA با نسبت اسید گلیکولیک بیشتر برای افزایش نرخ آزادسازی به عنوان تابعی از زمان برای به دست آوردن ایمنی قابل توجه در مدل حیوانی در آینده استفاده شود.

نتیجه گیری

هدف از این مطالعه ساخت نانوذرات PLGA حاوی RiVax با سرعت رهایش آهسته و ارزیابی پارامترهای فیزیکیوشیمیایی و پتانسیل ایمنی زایی این سیستم در مقایسه با RiVax به تنهایی است. با توجه به نتایج فوق مشخص شد که ماهیت آزادسازی نانوذرات PLGA به نسبت اسید لاکتیک به اسید گلیکولیک بستگی داشته و این عامل تأثیر قابل توجهی بر میزان آزادسازی آنتی ژن و یا بر پاسخ ایمنی دارد. پیشنهاد می‌شود از یک PLGA با نسبت اسید گلیکولیک بیشتر برای افزایش نرخ آزادسازی به عنوان تابعی از زمان برای به دست آوردن ایمنی قابل توجه در مدل حیوانی در آینده استفاده شود.

اعلام تعارض منافع

در این پژوهش که مستخرج از رساله است. دانشجو و سایر پژوهشگران تعارض منافی ندارند. اساتید راهنما عضو هیئت علمی دانشگاه هستند و استاد مشاور نیز عضو محترم هیئت علمی دانشگاه می باشد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از رساله دکترا است که از حمایت طرح سپاس دانشگاه جامع امام حسین(ع) در سال ۱۳۹۴ برخوردار شده است. این مطالعه تجربی پس از تصویب کمیته اخلاق دانشگاه جامع امام حسین(ع) با کد IR.IHU.REC.1396.1805 انجام شده است.

منابع

- [1] Yu, H., Li, S., Xu, N., & Liu, W. (2022). Ricin toxin and its neutralizing antibodies: A review. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 214, 47–53.
- [2] Liu, G., Wu, Z., Peng, Y., Shang, X., & Gao, L. (2022). Integrated transcriptome and proteome analysis provides insight into the ribosome inactivating proteins in *Plukenetia volubilis* Seeds. *International journal of molecular sciences*, 23 (17), 9562.
- [3] Iglesias, R., Russo, R., Landi, N., Valletta, M., Chambery, A., Di Maro, A., Bolognesi, A., Ferreras, J. M., & Citores, L. (2022). Structure and biological properties of ribosome-inactivating proteins and lectins from Elder (*Sambucus nigra* L.) Leaves. *Toxins*, 14 (9), 611.
- [4] Smallshaw, J. E., Richardson, J. A., Pincus, S., Schindler, J., & Vitetta, E. S. (2005). Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin. *Vaccine*, 23 (39), 4775–4784.
- [5] Smallshaw, J. E., Richardson, J. A., & Vitetta, E. S. (2007). RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol. *Vaccine*, 25 (42), 7459–7469.
- [6] Smallshaw, J. E., & Vitetta, E. S. (2010). A lyophilized formulation of RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, retains immunogenicity. *Vaccine*, 28 (12), 2428–2435.
- [7] Marconescu, P. S., Smallshaw, J. E., Pop, L. M., Ruback, S. L., & Vitetta, E. S. (2010). Intradermal administration of RiVax protects mice from mucosal and systemic ricin intoxication. *Vaccine*, 28 (32), 5315–5322.
- [8] Legler, P. M., Brey, R. N., Smallshaw, J. E., Vitetta, E. S., & Millard, C. B. (2011). Structure of RiVax: a recombinant ricin vaccine. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 67 (Pt 9), 826–830.
- [9] Gregory, A. E., Titball, R., & Williamson, D. (2013). Vaccine delivery using nanoparticles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 13.
- [10] Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C. X., Mitter, N., Yu, C., & Middelberg, A. P. (2014). Nanoparticle vaccines. *Vaccine*, 32 (3), 327–337.
- [11] Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Préat, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 161 (2), 505–522.
- [12] Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3 (3), 1377–1397.
- [13] Silva, A. L., Soema, P. C., Slütter, B., Ossendorp, F., & Jiskoot, W. (2016). PLGA particulate delivery systems for subunit vaccines: Linking particle properties to immunogenicity. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12 (4), 1056–1069.
- [14] Sadeghi D, Ebrahimi F, Zeinoddini M, Tarverdizadeh Y, Bakhshi M, Bagheripor M, & Aghaei, S.M. (2018). Preparation and evaluation of Rivax protein loading in chitosan nanoparticles. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 20 (6) :62-69.
- [15] Kordbacheh, E., Nazarian, S., Sadeghi, D., & Hajizadeh, A. (2018a). An LTB-entrapped protein in PLGA nanoparticles preserves against enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Iranian journal of basic medical sciences*, 21 (5), 517–524.

- [16] Kordbacheh, E., Nazarian, S., Hajizadeh, A., & Sadeghi, D. (2018b). Entrapment of LTB protein in alginate nanoparticles protects against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 126 (4), 320–328.
- [17] Rajapaksa, T. E., Stover-Hamer, M., Fernandez, X., Eckelhoefer, H. A., & Lo, D. D. (2010). Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 142 (2), 196–205.
- [18] Rasetti-Escargueil, C., & Avril, A. (2023). *Medical Countermeasures against Ricin Intoxication*. *Toxins*, 15 (2), 100.
- [19] Jain R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21 (23), 2475–2490.
- [20] Cun, D., Jensen, D. K., Maltesen, M. J., Bunker, M., Whiteside, P., Scurr, D., Foged, C., & Nielsen, H. M. (2011). High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: quality by design optimization and characterization. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 77 (1), 26–35.
- [21] Freitas, S., Merkle, H. P., & Gander, B. (2005). Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 102 (2), 313–332.
- [22] Menon, J. U., Kona, S., Wadajkar, A. S., Desai, F., Vadla, A., & Nguyen, K. T. (2012). Effects of surfactants on the properties of PLGA nanoparticles. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 100 (8), 1998–2005.
- [23] Sahoo, S. K., Panyam, J., Prabha, S., & Labhasetwar, V. (2002). Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 82 (1), 105–114.
- [24] Eldridge, J. H., Meulbroek, J. A., Staas, J. K., Tice, T. R., & Gilley, R. M. (1989). Vaccine-containing biodegradable microspheres specifically enter the gut-associated lymphoid tissue following oral administration and induce a disseminated mucosal immune response. *Advances in experimental medicine and biology*, 251, 191–202.
- [25] Norris, D. A., Puri, N., & Sinko, P. J. (1998). The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Advanced drug delivery reviews*, 34 (2-3), 135–154.
- [26] Halayqa, M., & Domańska, U. (2014). PLGA biodegradable nanoparticles containing perphenazine or chlorpromazine hydrochloride: effect of formulation and release. *International journal of molecular sciences*, 15 (12), 23909–23923.
- [27] Nazarian, S., Gargari, S. L., Rasooli, I., Hasannia, S., & Pirooznia, N. (2014). A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiological research*, 169 (2-3), 205–212.
- [28] Tamilselvan, N., Raghavan, C. V., Balakumar, K., & Karthik, S. (2014). Preparation of PLGA nanoparticles for encapsulating hydrophilic drug: modifications of standard methods and its in vitro biological evaluation. *Asian Journal of Research in Biological and Pharmaceutical Sciences*, 3, 121-132.
- [29] Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., & Farokhzad, O. C. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceuticals*, 5 (4), 505–515.
- [30] Panyam, J., Dali, M. M., Sahoo, S. K., Ma, W., Chakravarthi, S. S., Amidon, G. L., Levy, R. J., & Labhasetwar, V. (2003). Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 92 (1-2), 173–187.
- [31] Thomas, C., Rawat, A., Hope-Weeks, L., & Ahsan, F. (2011). Aerosolized PLA and PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. *Molecular pharmaceuticals*, 8 (2), 405–415.
- [32] Bershteyn, A., Hanson, M. C., Crespo, M. P., Moon, J. J., Li, A. V., Suh, H., & Irvine, D. J. (2012). Robust IgG responses to nanograms of antigen using a biomimetic lipid-coated particle vaccine. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 157 (3), 354–365.
- [33] Park, J., Mattessich, T., Jay, S. M., Agawu, A., Saltzman, W. M., & Fahmy, T. M. (2011). Enhancement of surface ligand display on PLGA nanoparticles with amphiphilic ligand conjugates. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 156 (1), 109–115.