

Synthesis of PEG-PLA Block Copolymer Nanospheres Containing Mixed Recombinant Proteins of Protective Antigen and Lethal Factor of *Bacillus anthracis*

Hossein Honari^{1*} , Mohammad Ebrahim Minaei¹, Hassan Mirhaj¹, Sayyed Masih Etemadaubi¹

¹Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein Comprehension University, Tehran, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: 05 December 2020

Revised: 16 December 2020

Accepted: 01 September 2021

* Correspondence to:

Hossein Honari

Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein Comprehension University, Tehran, Iran

Email: Honari.hossein@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Anthrax is a zoonotic disease and vaccine production is one way to protect people against this bacterium. This study investigates the application of copolymer nanocapsule (PEG-PLA) systems with controlled release specificity for a recombinant protective antigen and lethal factor of *Bacillus anthracis* to provide a vaccine candidate.

Material & Methods: In this experimental study, the dual solvent evaporation emulsion method was used to produce nanocapsules. Moreover, zeta potential and size of nanoparticles, loading efficiency of nanoparticles, recombinant protein release pattern, the probable effect of PLA-PEG nanoparticle production on the shelf life of recombinant proteins were investigated in this study. Mice were used as test and control samples for antibody production and immune response evaluation.

(Ethic code: 9727250)

Findings: The results of this study showed that mixed proteins (LFD1+PAD4) loaded on PEG-PLA block copolymer had an average size of 109 nm, the zeta potential of -27.7 mV, and PDI=0.394. In this study, it was shown that the release of these antigens was carried out in two stages of rapid and slow release. The release of the proteins was estimated at about 20% on the first day and 78% on the 49th day. The titers of antibodies produced in the serum of the mouse groups against these antigens at defined intervals were significantly different from each other.


Discussion & Conclusion: The results of this study suggest the application of PEG-PLA block copolymer nanocapsules containing mixed recombinant proteins of protective antigen and lethal factor of *Bacillus anthracis*. Due to less degradation and more protection of antigen activity in nanoparticles, compared to traditional methods, as well as fewer repeat injections, higher specificity, reduced side effects, lower cost, and slower release rate, the use of nanoparticles is a good option to replace traditional methods.

Keywords: Copolymer nanocapsule, Lethal factor, Protective antigen, Vaccine

➤ How to cite this paper

Honari H, Minaei ME, Mirhaj H, Etemadaubi SM. Synthesis of PEG-PLA Block Copolymer Nanospheres Containing Mixed Recombinant Proteins of Protective Antigen and Lethal Factor of *Bacillus anthracis*. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;29(5): 89-101.

سنتر نانوسفر کوپلیمری دوبلوکه PEG-PLA حاوی مخلوط پروتئین‌های نوترکیب آنتی‌ژن محافظت‌کننده و فاکتور کشنده باسیلوس آنتراسیس

حسین هنری^{۱*} ، محمد ابراهیم مینایی^۱، حسن میرحاج^۱، سید مسیح اعتماد ایوبی^۱

^۱مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۵

تاریخ داوری: ۱۳۹۹/۰۹/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۰

نویسنده مسئول:

حسین هنری

مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

Email:

Honari.hosein@gmail.com

مقدمه: سیاه‌زخم از بیماری‌های مشترک انسان و دام است و تولید واکسن یکی از راه‌های محافظت افراد در برابر این باکتری است. مطالعه حاضر کاربرد سامانه‌های نانوکپسول کوپلیمری (PEG-PLA) با ویژگی رهایش کنترل‌شده برای پروتئین‌های نوترکیب آنتی‌ژن محافظت‌کننده و فاکتور کشنده باسیلوس آنتراسیس را با هدف ارائه کاندید واکسن بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، برای تولید نانوکپسول‌ها از روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال استفاده شد و اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات، بازده بارگذاری نانوذرات، الگوی رهایش پروتئین نوترکیب، تأثیر احتمالی روش تولید نانوذره PLA-PEG بر پایداری و ماندگاری پروتئین‌های نوترکیب بررسی گردید. به‌منظور تولید آنتی‌بادی و بررسی پاسخ ایمنی، از موش‌های سوری به‌عنوان نمونه آزمایش و شاهد بهره گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد که پروتئین‌های مخلوط (LFD1+PAD4) بارگذاری‌شده در کوپلیمر دوبلوکه PEG-PLA اندازه میانگین ۱۰۹ نانومتر و پتانسیل زتا ۲۷/۷- میلی ولت و $PDI=0.394$ دارند. در این تحقیق نشان داده شد که رهایش آنتی‌ژن‌های یادشده در دو مرحله رهایش سریع و آهسته انجام می‌شود که آزادسازی پروتئین‌ها در روز اول حدود ۲۰ درصد و پس از گذشت ۴۹ روز، به میزان ۷۸ درصد محاسبه گردید. میزان آنتی‌بادی تولیدشده در سرم گروه‌های موشی علیه این آنتی‌ژن‌ها در فواصل زمانی مشخص، با یکدیگر اختلاف معناداری داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، به‌کارگیری نانوکپسول کوپلیمری دوبلوکه PEG-PLA حاوی مخلوط پروتئین‌های نوترکیب آنتی‌ژن محافظت‌کننده و فاکتور کشنده باسیلوس آنتراسیس را توصیه می‌کند. با توجه به تخریب کمتر و حفاظت بیشتر فعالیت آنتی‌ژن در نانوذرات نسبت به استفاده از روش‌های سنتی و نیز تکرار تزریق کمتر، اختصاصیت بالاتر، کاهش عوارض جانبی، هزینه کمتر و آهسته رهش بودن، استفاده از نانوذرات گزینه مناسبی برای جایگزین شدن با روش‌های سنتی است.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌ژن محافظت‌کننده، فاکتور کشنده، نانوکپسول کوپلیمری، واکسن

← **استناد:** هنری، حسین؛ مینایی، محمد ابراهیم؛ میرحاج، حسن؛ اعتماد ایوبی، سید مسیح. سنتر نانوسفر کوپلیمری دوبلوکه PEG-PLA حاوی مخلوط پروتئین‌های نوترکیب آنتی‌ژن محافظت‌کننده و فاکتور کشنده باسیلوس آنتراسیس. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دی ۱۴۰۰؛ ۲۹(۵): ۸۹-۱۰۱.



پXO1 قرار گرفته است و پیش‌تر به pBA1 معروف بود. ساختار سه‌بعدی آنتی‌ژن حفاظتی شناسایی شده است. ساختار کریستالی آن نشان می‌دهد که این مولکول به چهار دومین مجزا از نظر عملکردی تقسیم‌بندی می‌شود که روی هم تا می‌خورند. هر دومین برای مرحله خاصی از ایجاد سمیت ضروری است (۵).

واکسیناسیون مؤثرترین روش پیشگیری از بیماری سیاه‌زخم محسوب می‌شود که می‌تواند جان هزاران نفر را نجات بخشد. عامل این بیماری شامل سه جزء مهم یعنی اسپور، باسیل و سم است که حذف هر یک از این موارد حفاظت حداقل را علیه سیاه‌زخم ایجاد می‌کند (۶).

سویه‌های بیماری‌زای باسیلوس آنتراسیس واجد دو پلاسمید بزرگ هستند: پلاسمید توکسین pXO1 و پلاسمید کپسول pXO2. سویه‌هایی که تنها واجد یکی از این‌ها باشند، غیر بیماری‌زا هستند. اولین واکسن که پاستور در سال ۱۸۸۱ تولید کرد، یک سویه تخفیف حدت یافته بود (pXO1-pXO2+) که کپسول داشت؛ اما توکسین تولید نمی‌کرد. این سویه سطح بسیار پایین‌تری از ایمنی را در مقایسه با سویه‌های واکسن تولیدکننده توکسین ایجاد می‌نمود. واکسنی که پاستور تهیه کرده بود، ۵۰ سال به‌طور وسیع در اروپا و آمریکا، برای واکسینه نمودن گاو و گوسفندها به‌کاربرده شد (۷).

واکسن‌های تأییدشده AVA (استفاده‌شده در آمریکا) و AVP (استفاده‌شده در انگلیس) برای جلوگیری از مرگ‌ومیر ناشی از سیاه‌زخم کاربرد دارند. آنتی‌ژن حفاظتی (PA) جزء اصلی این واکسن‌ها است که در ساختار توکسین‌کشنده و ادم مشترک است و این توکسین‌ها نقش اصلی را در بیماری‌زایی باکتری دارند. AVP در مقایسه با AVA، حاوی سطوح پایین‌تری از PA و غلظت‌های بالاتری از آنتی‌ژن‌های دیگر سیاه‌زخم مانند فاکتور کشنده (LF)، فاکتور ادم (EF) و برخی از پروتئین‌های سطحی است و در نتیجه ممکن است از نظر ایجاد مصونیت به بیماری، از AVA اندکی بهتر

بیماری سیاه‌زخم در انسان، در نتیجه تماس مستقیم با حیوانات بیمار و یا فراورده‌های حیوانات مانند پوست، مو و پشم ایجاد می‌شود؛ بنابراین دامپزشکان، دامداران، میکروب‌شناسان، کشاورزان، چوپانان، کارگران کشتارگاه‌ها و کارگران مشغول به کار در صنایع پوست و پشم، بیشتر در معرض ابتلا به این بیماری هستند. سه راه بروز آلودگی در انسان به صورت پوستی، تنفسی و گوارشی است. سیاه‌زخم پوستی، شایع‌ترین شکل سیاه‌زخم در انسان است که در نهایت، موجب ایجاد یک جوشگاه سیاه‌رنگ می‌شود. این نوع از سیاه‌زخم به مرگ در ۲۰ درصد موارد منجر می‌گردد. سیاه‌زخم تنفسی که در نتیجه تنفس اسپورباکتری رخ می‌دهد، کشنده‌ترین شکل بیماری محسوب می‌شود و موجب مرگ بیمار در مدت ۲۴ ساعت می‌گردد. سیاه‌زخم گوارشی ناشی از مصرف غذای آلوده به اسپور و نادرترین شکل بیماری در انسان است. تقریباً ۹۵ درصد از موارد ابتلا به سیاه‌زخم در انسان، از نوع جلدی و پنج درصد از موارد، به شکل تنفسی است (۲، ۱). باکتری باسیلوس آنتراسیس سه آنتی‌ژن شامل آنتی‌ژن کپسولی، آنتی‌ژن سوماتیک و کمپلکس سمی دارد (۳).

کمپلکس سمی از سه جزء جداگانه تشکیل شده است که مسئول بیشتر نشانه‌های بالینی برای سیاه‌زخم است. این سم شامل آنتی‌ژن حفاظتی (۸۳ کیلودالتون)، عامل کشنده (۹۰ کیلودالتون) و عامل آماس یا ادم (۸۹ کیلودالتون) است که به ترتیب توسط ژن‌های pag، lef و cya موجود روی پلاسمید pXO1 باکتری کد می‌شود. ژن atxA به‌عنوان فعال‌کننده سم سیاه‌زخم معروف است که تنظیم‌کننده رونویسی ژن‌های کدکننده سه سم پروتئینی است (۴). وجود پلاسمید و ژن تنظیمی atxA که روی پلاسمید قرار گرفته، برای بیماری‌زایی ضروری است. آنتی‌ژن حفاظتی به علت نقشی که در فراخوانی پاسخ ایمنی حفاظتی علیه سیاه‌زخم دارد، به این نام خوانده شده است. ژن کدکننده PA در لوکوس pag روی پلاسمید

عمل کند (۸).

تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه و پروتئین‌های مربوط بیان و تخلیص گردید. برای تولید نانوکپسول‌ها از روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال استفاده شد. در این روش، محلول بافری به فاز آلی شامل پلیمر اضافه می‌شود و امولسیون اولیه (W/O) را تشکیل می‌دهد. این امولسیون به آرامی و در حین هم زدن، به حجم بزرگی از آب که شامل امولسیفایر است (امولسیفایر در این آزمایش پلی وینیل الکل یا PVA است) اضافه می‌گردد تا امولسیون آب-روغن-آب حاصل شود. در پایان، حلال از امولسیون به روش تبخیر و استخراج حلال جدا می‌گردد (۱۲).

برای تهیه نانوذرات PLA-PEG، در یک بشر ۲ میلی‌لیتر تتراهیدروفوران (THF) ریخته و ۴۰ میلی‌گرم پلیمر PLA-PEG اضافه و سپس حدود ۲ ساعت اجازه داده شد تا پلیمر روی همزن مغناطیسی به‌خوبی حل شود. پس از گذشت مدت‌زمان بالا، یک میلی‌لیتر از مخلوط مساوی پروتئین‌های LFD1 و PAD4 (یک میلی‌گرم از هر پروتئین) به‌صورت قطره‌قطره به محلول پلیمری در حال هم زدن اضافه گردید و سپس حدود ۵ دقیقه اجازه داده شد. پس از این مرحله، امولسیون تهیه‌شده با قدرت ۷۵ درصد و سیکل ۰/۵ به مدت ۳۰ ثانیه سونیکیت شد. یک میلی‌لیتر محلول پلی وینیل الکل (PVA) یک درصد در آب مقطر به‌صورت تازه آماده و سپس با سرنگ محلول حاوی نمونه پلیمر و پروتئین، قطره‌قطره به PVA در حال هم زدن اضافه گردید؛ سپس همانند مرحله پیش، نمونه سونیکیت شد؛ اما این بار مدت‌زمان سونیکت ۶۰ ثانیه بود. در این مرحله، حجم امولسیون دوگانه W/O/W به‌دست آمده را با آب مقطر به ۳۰ میلی‌لیتر رسانده و بشر بر روی همزن قرار گرفت و ۲ ساعت اجازه داده شد تا در حال هم زدن، حلال تتراهیدروفوران کاملاً تبخیر شود. با گذشت زمان لازم برای تبخیر حلال و سخت شدن ذرات موجود در محلول، جمع‌آوری ذرات آن‌ها انجام گرفت. برای جمع‌آوری ذرات، کل محلول به داخل دو لوله فالكون ۵۰ میلی‌لیتری جداگانه ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه با

واکسن‌های مبتنی بر PA نوترکیب (rPA) یکی از گزینه‌های جایگزین برای واکسن‌های AVA و AVP هستند. این واکسن‌های نوترکیب با سرعت بیشتری سبب مصونیت می‌شوند و بنابراین می‌توانند در موارد پس از مواجهه با عامل بیماری سیاه‌زخم، مؤثرتر از واکسن‌های نسل گذشته عمل کنند. از سویی، واکسن‌های نوترکیب از نظر فرمولاسیون، همگنی بالاتری دارند و ایمنی و مصونیت‌زایی این واکسن‌ها با استفاده از آزمایش‌های بالینی مشخص شده است (۹)؛ همچنین با توجه به مطالعات صورت گرفته، تولید واکسن‌های نوترکیب حاوی PA و فاکتور کشنده می‌تواند اثرگذاری بیشتری برای فعال‌سازی دستگاه ایمنی داشته باشد؛ در نتیجه، نسل‌های جدید واکسن به‌سوی تولید واکسن‌های کایمر بین آنتی‌ژن حفاظتی و فاکتور سم است (۱۰). تجویز PA به‌صورت داخل جلدی، جزو روش‌های موفقیت‌آمیز برای واکسیناسیون سیاه‌زخم است. استفاده از پچ‌های پوستی حاوی rPA و جایگزینی آن زیرپوست، موجب القای سطح چشمگیری از آنتی‌بادی در حیوانات الگو شده است (۱۱).

در این مطالعه تجربی، به‌کارگیری سامانه‌های نانوکپسول کوپلیمری (PEG-PLA) با ویژگی رهایش کنترل‌شده برای پروتئین‌های نوترکیب آنتی‌ژن محافظت‌کننده و فاکتور کشنده باسیلوس آنتراسیس با هدف ارائه کاندید واکسن بررسی شده است. استفاده از نانوکپسول برای تولید واکسن نوترکیب سیاه‌زخم، با توجه به ویژگی‌های نانوذرات در رهایش و حفاظت بیشتر فعالیت آنتی‌ژن می‌تواند گزینه مناسبی برای جایگزین شدن با روش‌های سنتی باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نانوذرات حاوی پروتئین‌های مخلوط LFD1 و PAD4: آنتی‌ژن‌های استفاده‌شده در این تحقیق، مخلوط پروتئین‌های نوترکیب LFD1 (دامنه ۱ فاکتور کشنده) و PAD4 (دامنه ۴ آنتی‌ژن حفاظتی) سیاه‌زخم بود که باکتری‌های دارای این دو ژن به‌صورت جداگانه، از مرکز

PLA-PEG حاوی ۳ میلی گرم پروتئین در حجم ۵۰۰ میکرولیتر محلول PBS درون میکروتیوب ۲ میلی لیتری ریخته و با هم زدن پراکنده شد. میکروتیوب درون شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ rpm قرار گرفت و در فواصل زمانی منظم، نمونه برداری از محلول انجام گردید (۱۴). انجام این آزمون به مدت ۴۹ روز ادامه داشت؛ سپس با استفاده از روش پروتئین سنجی برادفورد با سه بار تکرار، غلظت پروتئین موجود در نمونه تعیین شد. در نهایت، منحنی درصد تجمع پروتئین رهاسده از نانوذرات در مدت زمان های تعیین شده ترسیم گردید.

بررسی پایداری و ماندگاری پروتئین در طول تهیه نانوذرات: برای مشخص کردن تأثیر احتمالی روش تولید نانوذره PLA-PEG بر پایداری و ماندگاری پروتئین، ابتدا حجم مشخصی از محلول حاوی نانوذره پس از تولید به یک لوله فالكون ۱۵ میلی لیتری منتقل و سپس ساترئیفوژ شد. پس از حذف محلول رویی، به رسوب آن ها ۲ میلی لیتر بافر رهایش نانوذره (محلول حاوی ۵% SDS و NaOH 0.1M) اضافه گردید (۱۵)؛ سپس نمونه نانوذرات در مدت زمان ۱۶ ساعت در محلول رهایش سریع روی شیکر به آرامی شیک شدند. در نهایت، نمونه جمع آوری شده از تخریب کامل نانوذرات به همراه حجم مشخص پروتئین نوترکیب، در ژل SDS-PAGE رنگ آمیزی گردید تا وجود باندهای پروتئینی رهایش شده از نانوذرات مشخص شود.

تزیق زیرپوستی پروتئین های مخلوط (PAD4 و LFD1) به گروه های موشی: به منظور تولید آنتی بادی و بررسی پاسخ ایمنی، از موش های سوری (از نوع *Mus musculus*) ماده با وزن ۲۵-۲۰ گرم و سن ۴ هفته) به عنوان نمونه آزمایش و شاهد استفاده شد. برای انجام ایمنی زایی، مخلوط پروتئین های نوترکیب PAD4+LFD1 (به نسبت مساوی) که هر دو غیر بارگذاری شده هستند، به طور جداگانه طی چهار نوبت به گروه آزمایش به ترتیب در روز اول، روز چهاردهم، روز بیست و هشتم و روز چهل و دوم به صورت زیرپوستی و به گروه شاهد به همین

سرعت ۲۰۰۰۰ g ساترئیفوژ گردید. پس از ته نشین شدن کامل ذرات، به منظور ارزیابی بازده بارگذاری از لحاظ مقدار پروتئین منتقل شده به فاز آبی دوم، مایع رویی جمع آوری و بررسی شد؛ سپس رسوب دو بار و هر بار با ۱۵ میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده شستشو داده و با سرعت ۲۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه ساترئیفوژ گردید (۱۳).

بررسی ویژگی های ظاهری نانوذرات: برای بررسی اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات تولید شده، با استفاده از پراش نور پویا از دستگاه DLS (مدل Malvern ساخت کشور انگلستان) استفاده شد. برای بررسی ویژگی های ظاهری نانوذرات، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (مدل EM3200 ساخت شرکت KYKY ساخت کشور چین) استفاده گردید. به منظور جلوگیری از رشد نانوذرات، نمونه های تازه تهیه شده روی یک سطح شیشه ای قرار گرفتند. پس از خشک شدن کامل، نمونه به وسیله یک لایه نازک طلا با روش P.V.D پوشش داده شد. برای انجام لایه نشانی طلا از دستگاه Sputter coater (مدل SBC12 ساخت شرکت KYKY ساخت کشور چین) استفاده گردید. در نهایت، پس از لایه نشانی، نمونه نانوذرات توسط میکروسکوپ ارزیابی شدند.

بررسی بازده بارگذاری نانوذرات: به منظور بررسی بازده بارگذاری نانوذرات، پس از تهیه نانوذرات و انجام ساترئیفوژ، ۲۰ میلی گرم از نانوذرات در یک میلی لیتر سود یک مولار مخلوط و به آرامی برای چند دقیقه، ورتکس و پروتئین در محلول PBS از نانوذرات خارج می شود؛ سپس محلول ساترئیفوژ و سوپ به دست آمده برای مشخص شدن میزان پروتئین آنالیز می گردد. بازده بارگذاری با استفاده از فرمول زیر محاسبه می شود (۱۳):

$$EE = \frac{m}{m_0} \times 100\%$$

m0 = میزان پروتئین اولیه

m = میزان پروتئین بارگذاری شده در نانوذرات

بررسی برون تن رهایش آنتی ژن از نانوذرات: برای بررسی الگوی رهایش پروتئین نوترکیب، میزانی از نانوذرات

نانوذرات بدون پروتئین و PBS استفاده گردید. به منظور تعیین تیتراژ آنتی بادی موجود در سرم موش از روش الیزای غیرمستقیم استفاده گردید. برای بررسی آماری داده‌ها از آزمون‌های ANOVA و T-test بهره گرفته شد. این آزمون برای مقایسه میانگین تیتراژ آنتی بادی نمونه‌ها انجام گردید.

ترتیب PBS تزریق گردید (جدول شماره ۱)؛ همچنین مخلوط پروتئین‌های نو ترکیب PAD4+LFD1 کپسوله شده در نانوذرات PLA-PEG نیز به شکل یک تزریق (روز اول) و دو تزریق (روز اول و بیست و هشتم) به صورت زیرپوستی انجام شد (جدول شماره ۲). برای حیوانات شاهد نیز به جای آنتی ژن از

جدول ۱. گروه‌ها، زمان و مقادیر پروتئینی غیر بارگذاری شده تزریقی در مراحل ایمن سازی

ردیف	پروتئین تزریقی	توزیع (میکروگرم)				تعداد موش‌ها در هر گروه	روش تزریق
		توزیع ۱ (۲۰)	توزیع ۲ (۱۵)	توزیع ۳ (۱۰)	توزیع ۴ (۱۰)		
۱	پروتئین مخلوط LFD1+PAD4 آزاد	روز اول	روز ۱۴	روز ۲۸	روز ۴۲	۵ سر در هر گروه	زیرپوستی
۲	PBS	+	+	+	+		

جدول ۲. گروه‌ها، زمان و مقادیر پروتئینی بارگذاری شده تزریقی در مراحل ایمن سازی

ردیف	پروتئین تزریقی	توزیع (۲۰ میکروگرم)		تعداد موش‌ها در هر گروه	روش تزریق
		توزیع ۱ (روز اول)	توزیع ۲ (روز ۲۸)		
۱	پروتئین مخلوط LFD1+PAD4 بارگذاری شده در نانوذرات	+	-	۵ سر در هر گروه	زیرپوستی
۲	پروتئین مخلوط LFD1+PAD4 بارگذاری شده در نانوذرات	+	+		
۳	نانوذرات PLA-PEG	+	+		

یافته‌ها

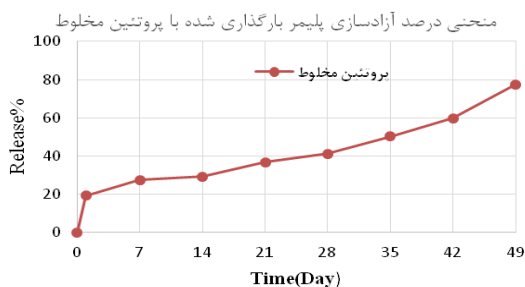
نتایج بررسی برون تن رهایش آنتی ژن از نانوذرات: برای بررسی برون تن رهایش آنتی ژن از نانوذرات PEG-PLA پس از ۴۹ روز، بر اساس درصد تجمعی

نتایج بازده بارگذاری نانوذرات: برای بررسی بازده بارگذاری نانوذرات، پس از ساخت نانوذرات و انجام سانتریفیوژ، نانوذرات Freeze drying شدند. محلول رویی جمع آوری و پروتئین سنجی انجام و بر اساس فرمول بخش روش‌ها ظرفیت بارگیری نانوذرات محاسبه گردید (جدول شماره ۳).

جدول ۳. بررسی مقدار بهینه ظرفیت بارگیری با تغییر غلظت پلیمر و آنتی ژن. فرمولاسیون‌های متفاوت با تغییر غلظت پلیمر و غلظت پروتئین مخلوط برای به دست آوردن بیشترین ظرفیت بارگیری نانوذرات تهیه شد.

درصد ظرفیت بارگیری	غلظت پروتئین مخلوط (میلی گرم)	غلظت پلیمر (درصد)
LFD1+PAD4		
۴۴/۴	۲	۲
۳۵/۴	۲	۴
۴۱	۲	۶
۳۳	۲	۸
۴۲	۱	۲

بر اساس نتایج جدول شماره ۳، بهترین شرایط برای بیشترین میزان بارگذاری پروتئین هنگامی بود که از محلول PEG-PLA با غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر حلال آلی (غلظت ۲ درصد) و میزان پروتئین ۲ میلی گرم استفاده شد. در این شرایط، میزان بارگذاری پروتئین در نانوذرات حدود ۴۴/۴ درصد برای پروتئین مخلوط محاسبه گردید.



شکل ۱. نتایج درصد تجمعی رهائش پروتئین نوترکیب مخلوط از نانوذرات PEG-PLA در طول مدت ۴۹ روز. پس از گذشت ۴۹ روز، درصد رهائش پروتئین‌های مخلوط نوترکیب PAD4+LFD1 کپسوله‌شده در نانوذرات PLA-PEG حدود ۷۸ درصد تعیین گردید.

رهائش پروتئین در نمودار نمایش داده شد. همان‌طور که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، پس از این مدت‌زمان، در حدود ۷۸ درصد رهائش از نانوذرات PEG-PLA انجام شده است.

نتایج بررسی ویژگی‌های ظاهری نانوذرات: در بررسی اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات با استفاده از پراش نور پویا، نتایج نشان‌دهنده این بود که از نظر پتانسیل زتا و PDI نانوذرات در محدوده مناسبی قرار داشتند (جدول شماره ۴).

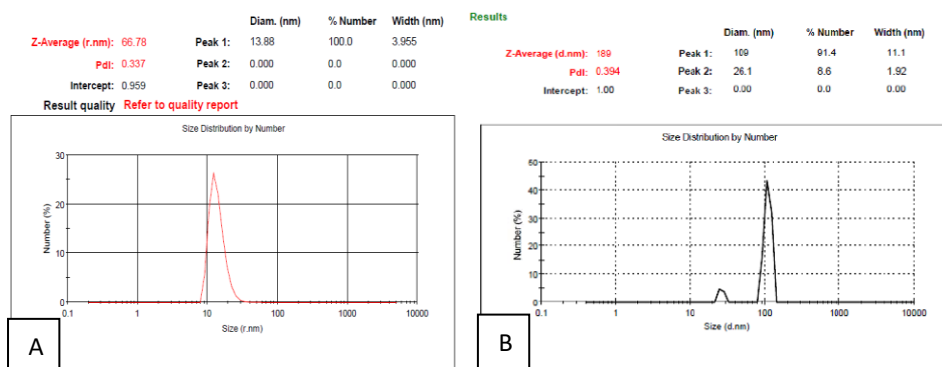
جدول ۴. بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات با استفاده از پراش نور پویا. با تغییر در مؤلفه‌های مؤثر در فرایند ساخت نانوذرات، در نهایت نانوذرات آنتی‌ژن مخلوط PAD4+LFD1 بارگذاری شده در PEG-PLA با میانگین اندازه ۱۰۹ نانومتر و پتانسیل زتای ۲۷/۷- میلی‌ولت و $0.394 = \text{DPI}$ تهیه شد.

PDI	اندازه (نانومتر)	پتانسیل زتا (میلی ولت)	نمونه کنترل
۰/۳۳۷	۱۳/۸۸	-۳۲/۱	نانوذرات حاوی مخلوط پروتئین‌های LFD1 و PAD4
۰/۳۹۴	۱۰۹	-۲۷/۷	

در طول تهیه نانوذرات و در شرایط خنثی، از طریق الگوی الکتروفورز بررسی گردید. کیفیت الگوی بانندی پروتئین‌های LFD1 و PAD4 پیش از بارگذاری در نانوذرات PEG-PLA و پس از رهائش از آن‌ها تغییر مشخصی نداشت (شکل شماره ۴).

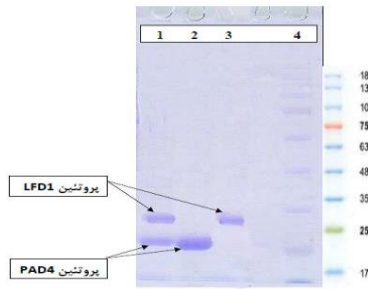
ارزیابی تیتراژ IgG در سرم موش‌های ایمن‌شده: به‌منظور ارزیابی تیتراژ آنتی‌بادی تولیدشده از تزریق پروتئین‌های مخلوط (LFD1 و PAD4) به سه شکل

در بررسی ویژگی‌های ظاهری نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی، تصاویر میکروسکوپ الکترونی کروی و صاف بودن سطح ذرات حاصل از فرایند تولید نانوذرات در شرایط بهینه را مطلوب نشان داد. شکل شماره ۳ تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات تهیه‌شده است که کروی و تا حد بسیاری حائز شرایط ایدئال هستند. نتایج بررسی پایداری و ماندگاری پروتئین نوترکیب در طول تهیه نانوذرات: پایداری و ماندگاری پروتئین نوترکیب

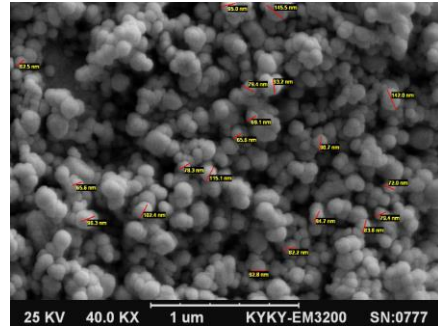


شکل ۲. نمودار بررسی بازه توزیع اندازه نانوذرات PEG-PLA حاوی پروتئین مخلوط PAD4+LFD1 (A) و بدون پروتئین (B) در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS. منحنی‌های آزمون پراکنندگی نور دینامیکی برحسب اندازه و (nm) و توزیع (%).

شد که نتایج در شکل‌های شماره ۵، ۶ و ۷ مشاهده

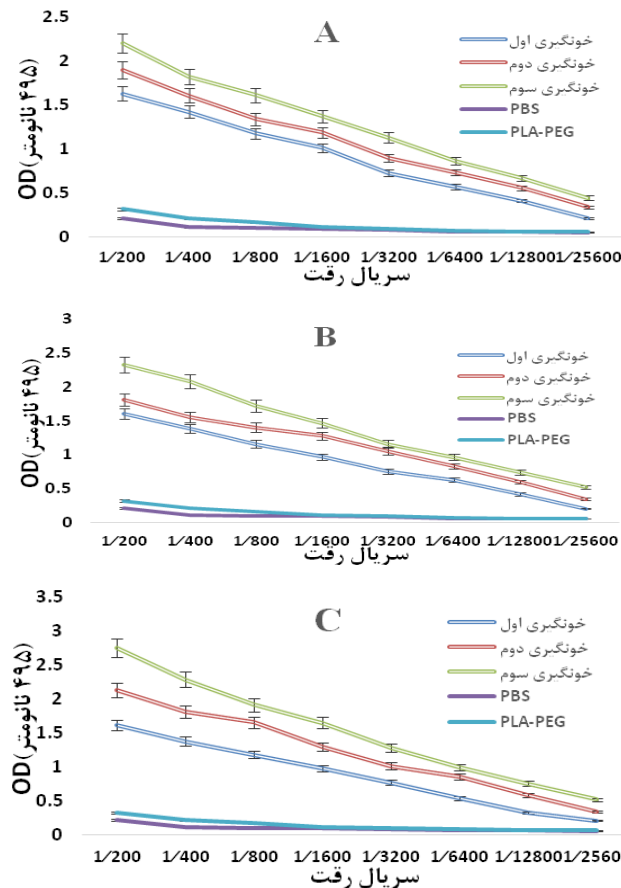


شکل ۴. الگوی الکتروفورز ارزیابی کیفیت پروتئین مخلوط LFD1 و PAD4 رهایش یافته از نانوذرات PEG-PLA. ستون ۱. پروتئین‌های LFD1 و PAD4؛ ستون ۲. پروتئین‌های PAD4 و LFD1؛ ستون ۳. پروتئین PAD4 پیش از بارگذاری در نانوذرات PEG-PLA؛ ستون ۴. پروتئین LFD1 پیش از بارگذاری در نانوذرات PEG-PLA؛ ستون ۵. نشانگر مولکولی پروتئین. با مقایسه الگوی باندی پروتئین‌های LFD1 و PAD4 پیش از بارگذاری در نانوذرات PEG-PLA و پس از رهایش از آن‌ها، تغییری در کیفیت آن ایجاد نشده است.

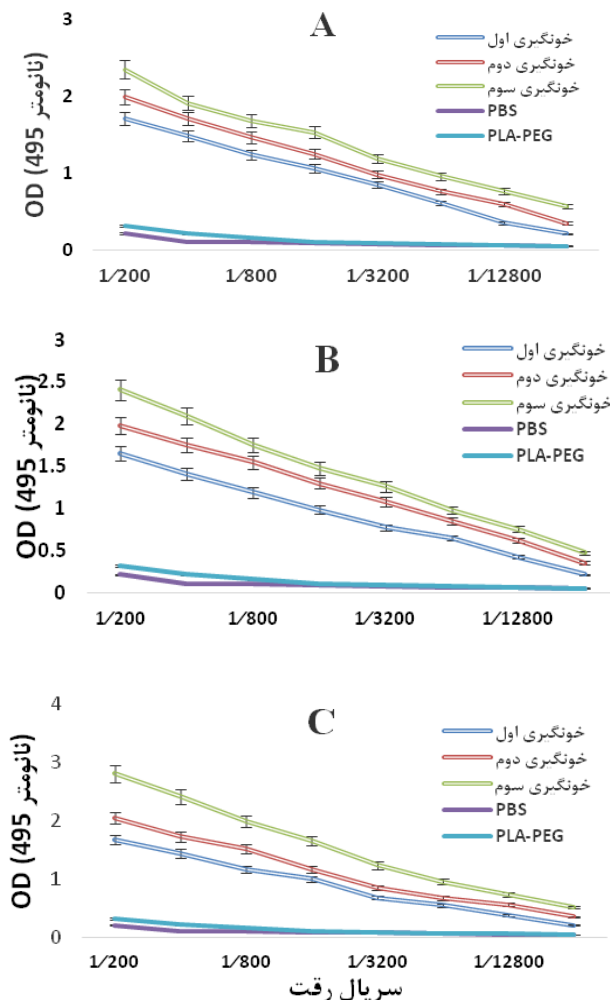


شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی مدل KYKY-EM3200 از نانوذرات حاوی پروتئین (نانوذرات خشک شده بر سطح شیشه‌ای، روی گرید قرار گرفته و پس از پوشش دهی با طلا، تصویربرداری شد).

آزاد (چهار بار تزریق)، بارگذاری شده (یک بار تزریق) و بارگذاری شده (دو بار تزریق) و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق، از روش الیزای غیرمستقیم علیه آنتی ژن‌های PAD4، LFD1 و پروتئین مخلوط PAD4+LFD1 استفاده



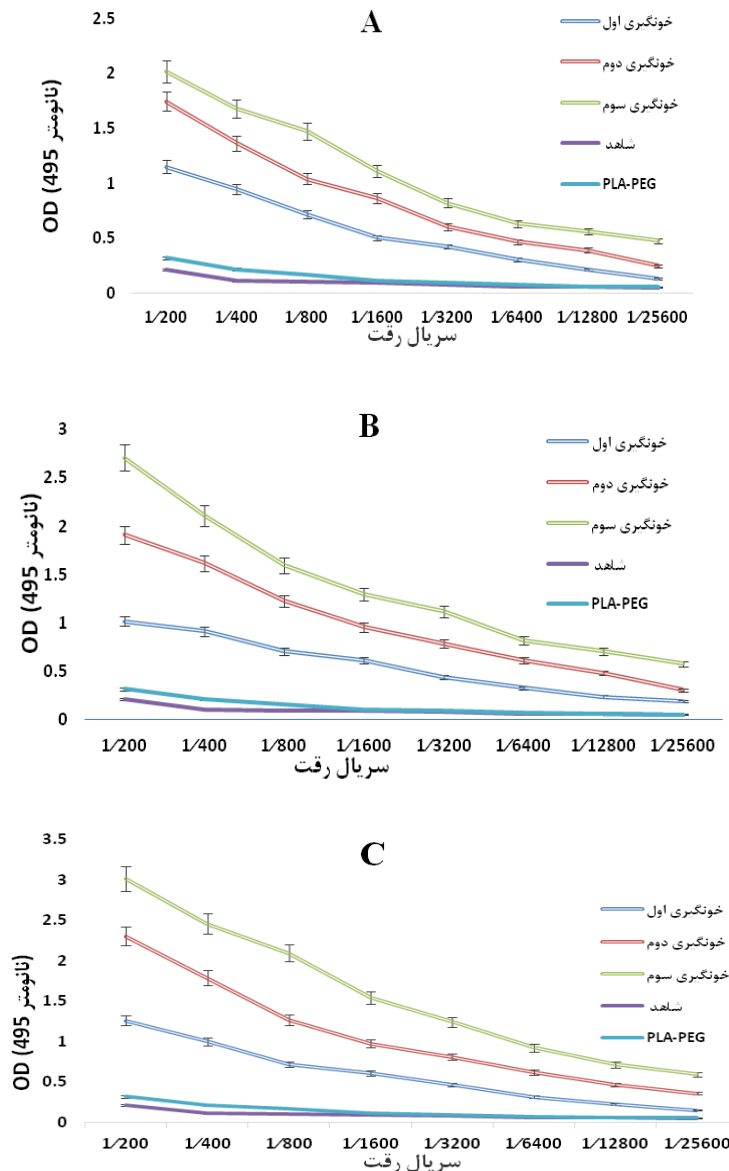
شکل ۵. منحنی الیزای تولید آنتی بادی IgG ۱۰ روز پس از هر بار تجویز تزریقی پروتئین مخلوط LFD1 و PAD4 به سه صورت آزاد (A)، بارگذاری شده یک تزریقه (B) و بارگذاری شده دو تزریقه (C) علیه پروتئین LFD1. تولید آنتی بادی علیه پروتئین‌های مخلوط نو ترکیب PAD4+LFD1 در برابر آنتی ژن LFD1 انجام شده است و بالاترین میزان تیتراژ آنتی بادی مربوط به خون گیری سوم است. تیتراژ آنتی بادی علیه پروتئین‌های مخلوط به صورت دو بار تزریق بارگذاری شده در نانوذرات PLA-PEG، نسبت به یک بار تزریق بارگذاری شده و آزاد، بیشتر است.



شکل ۶. منحنی الیزای تولید آنتی‌بادی IgG ۱۰ روز پس از هر بار تجویز تزریقی پروتئین مخلوط LFD1 و PAD4 به سه صورت آزاد (A)، بارگذاری شده یک‌تزیقی (B) و بارگذاری شده دو‌تزیقی (C) علیه پروتئین PAD4. تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های مخلوط نو ترکیب PAD4+LFD1 در برابر آنتی‌ژن PAD4 انجام شده است و بالاترین میزان تیتراژ آنتی‌بادی مربوط به خون‌گیری سوم است. تیتراژ آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های مخلوط به صورت دو بار تزریق بارگذاری شده در نانوذرات PLA-PEG، نسبت به یک‌بار تزریق بارگذاری شده و آزاد، بیشتر است.

آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های مخلوط به صورت بارگذاری شده نسبت به آزاد، تولید میزان بیشتر آنتی‌بادی را نشان می‌دهد؛ همچنین اختلاف تیتراژ آنتی‌بادی میان گروه‌های یک‌بار تزریق بارگذاری شده و دو بار تزریق بارگذاری شده و آنتی‌ژن آزاد نشان‌دهنده آن است که بیشترین تیتراژ آنتی‌بادی، مربوط به دو بار تزریق بارگذاری شده است. نتایج الیزای نشان داد که نانوذرات حاوی آنتی‌ژن مخلوط PAD4+LFD1 می‌تواند با ره‌ایش تدریجی و عرضه آن به دستگاه ایمنی، میزان مناسبی آنتی‌بادی تولید کند.

می‌شود. نتایج نشان داد که بالاترین میزان تیتراژ آنتی‌بادی در همه تجویزها مربوط به خون‌گیری سوم بود که ۱۰ روز پس از آخرین تزریق، خون‌گیری از موش‌ها به عمل آمده است؛ همچنین در خون‌گیری آخر، بیشترین آنتی‌بادی علیه نانوذرات بارگذاری شده با آنتی‌ژن مخلوط PAD4+LFD1 اندازه‌گیری شد. افزایش تیتراژ آنتی‌بادی در گروه‌هایی که نانوذرات حاوی آنتی‌ژن مخلوط PAD4+LFD1 را دریافت کرده‌اند، نشان می‌دهد که نانوذرات توانسته‌اند به عنوان ادجوانت عمل کنند و با ره‌ایش مناسب و طولانی‌مدت آنتی‌ژن، آنتی‌بادی بیشتری را تولید نمایند. تیتراژ



شکل ۷. منحنی الیزای تولید آنتی‌بادی IgG ۱۰ روز پس از هر بار تجویز تزریقی پروتئین مخلوط LFD1 و PAD4 به سه صورت آزاد (A)، بارگذاری شده یک تزریق (B) و بارگذاری شده دو تزریق (C) علیه پروتئین مخلوط PAD4+ LFD1. تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های مخلوط نو ترکیب PAD4+LFD1 در برابر آنتی‌ژن PAD4+LFD1 انجام شده است و بالاترین میزان تیتراژ آنتی‌بادی مربوط به خون‌گیری سوم است. تیتراژ آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های مخلوط به صورت دو بار تزریق بارگذاری شده در نانوذرات PLA-PEG، نسبت به یک‌بار تزریق بارگذاری شده و آزاد، بیشتر است؛ همچنین تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های مخلوط نو ترکیب PAD4+LFD1 در برابر آنتی‌ژن PAD4+LFD1، نسبت به آنتی‌ژن LFD1 (شکل شماره ۵) و آنتی‌ژن PAD4 (شکل شماره ۶) بیشتر بود.

بحث و نتیجه‌گیری

در چند سال اخیر، به استفاده از سامانه‌های کنترلی انتقال دارو و واکسن توجه شده است. کاربرد این سامانه‌ها بیانگر این نکته مهم است که سرنوشت و عملکرد دارو در بدن، تنها به خواص دارو بستگی ندارد، بلکه رهایش کنترل‌شده آن نیز نقش مهمی در این زمینه

ایفا می‌کند. امروزه، تلاش‌های فراوانی برای بهینه کردن عملکرد داروها و واکسن‌ها به منظور کاهش آثار جانبی آن انجام می‌شود. نانوذرات وسیله 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 (۱۷، ۱۶). از نانوذرات

هیدروفیل به‌ویژه پروتئین‌ها و کپسوله شدن پایین داروهای قطبی تا حدودی محدود می‌شود (۲۲). ماندگاری اندک سامانه‌های همولیمیری PLA در خون، به علت تشخیص و به دام افتادن آن‌ها به وسیلهٔ ماکروفاژها در سیستم فاگوسیت تک‌هسته‌ای است که این فرایند فاگوسیتوز، از اینتراکشن نانوذرات با بعضی از پروتئین‌های خون طی فرایند آپسونیزاسیون ناشی می‌گردد. آپسونی شدن وابسته به هیدروفوبیسیته سطح نانوذرات است، به گونه‌ای که هرچه هیدروفوبیسیته سطح بیشتر باشد، فرایند آپسونی شدن بیشتر اتفاق می‌افتد و ماندگاری آن نانوذرات در خون کاهش می‌یابد (۲۳). برای رفع این معایب، از پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) در ساخت این پلیمر استفاده شد. استفاده از این ماده در پلیمر یادشده تقریباً بیشتر مشکلات بیان‌شده را رفع کرد. لی و همکاران اثربخشی واکسنی زیرواحدی مرکب از سه پروتئین غشای خارجی هموفیلوس پاراسوئیس را در مدل موشی بررسی کردند که در این مطالعه، نسبت مساوی از ترکیبات دوتایی و سه‌تایی آن‌ها برای تزریق به حیوان آزمایشگاهی استفاده گردید. نتایج به‌دست آمده نشان داد که این پروتئین‌های مخلوط در مقایسه با پروتئین انفرادی، بیشترین میزان آنتی‌بادی و ایمنی‌زایی را ایجاد می‌کنند (۲۴). مارتین و همکاران، به‌منظور ایجاد ایمنی علیه لیشمانیوز احشایی (کالا‌آزار)، واکسنی متشکل از ترکیب نسبت‌های مساوی سه پروتئین لیشمانیا اینفانتوم را بررسی کردند (۲۵).

در پژوهش حاضر، در انتخاب نوع نانوذره‌ای که بتواند اهداف این پژوهش را برآورده کند، نکاتی مانند زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری، ساختار فیزیکی و شیمیایی نانوذره، عدم آسیب به آنتی‌ژن یعنی محلول در آب باشد و طی فرآیند سنتز آن از موادی استفاده نشود که منجر به تخریب آنتی‌ژن گردد، رهایش آنتی‌ژن کنترل‌شده و قابل تنظیم، مقرون‌به‌صرفه بودن تهیه و استفاده از آن مدنظر بوده است. در این زمینه، کولیمیرهای دوتایی PEG-PLA انتخاب گردید و پروتئین‌های مخلوط (LFD1+ PAD4) در نانوذره بارگذاری شد. در این تحقیق نشان داده

کولیمیر PLA-PEG به‌عنوان سامانه‌های رسانش دارو و پروتئین از جمله داروهای ضدسرطان، ضدویروسی و کاندیدای واکسن برای بیماری‌های مختلف استفاده‌شده است (۱۸).

ویلا و همکاران توکسوئید کزاز را در نانوذرات پلیمری دوبلوکه PLA-PEG بارگذاری کردند و بازده بارگذاری را حدود ۳۵ درصد گزارش نمودند که از مطالعهٔ این پژوهش کمتر است. در این مطالعه، رهایش آنتی‌ژن در دو مرحلهٔ سریع و آهسته گزارش گردید که البته به زمان و درصد آن اشاره‌ای نشده است (۱۹).

مانیش و همکاران دامنهٔ ۴ آنتی‌ژن حفاظتی باسیلوس آتراسیس را در نانوذرات پلیمری PLGA بارگذاری کردند که رهایش دومرحله‌ای از این نانوذرات حدود ۵۰ درصد در روز اول و ۷۵ درصد تا روز ۲۸ گزارش گردید (۲۰). در مطالعهٔ مانیش و همکاران، اندازهٔ نانوذرات ۲۴۵ نانومتر و پتانسیل زتای ۱۹- میلی‌ولت تعیین شد (۲۰) و در مطالعهٔ ویلا و همکاران، اندازهٔ نانوذرات ۲۰۰ نانومتر و پتانسیل زتا حدود ۲۵/۵- میلی‌ولت (۱۹) گزارش گردید. در مطالعهٔ دیگری، قاسمی و همکاران فاکتور رشد انسانی نوترکیب را در نانوذرات پلیمری دوبلوکه PLA-PEG بارگذاری و رهایش سریع را ۱۷/۵ درصد و رهایش آهسته در مدت ۴۲ روز را ۶۵ درصد گزارش کردند؛ همچنین بازده بارگذاری حدود ۴۶ درصد گزارش شد که با مطالعهٔ حاضر همخوانی دارد (۱۳).

در پژوهشی که مالیک و همکاران دربارهٔ بارگذاری آنتی‌ژن حفاظتی در نانوذرات کیتوزان انجام دادند، غلظت مناسب کیتوزان برای بارگذاری حدود ۱۰ میلی‌گرم و مقدار پروتئین PA حدود ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. اندازهٔ نانوذرات به‌دست آمده حدود ۲۵۴ نانومتر محاسبه گردید. در رهایش سریع، حدود ۳۰ درصد در زمان ۶ ساعت و تا ۱۰۰ ساعت، حدود ۷۵ درصد پروتئین آزاد گردید (۲۱).

به‌طور کلی، کاربرد PLA به علت آب‌گریزی بالای آن، زمان تجزیهٔ بیش‌ازحد طولانی، تولید محیط اسیدی به‌محض تجزیهٔ آن به اسید لاکتیک، محیط غیردوستانه برای داروهای

بودن عامل سیاه‌زخم در جنگ‌ها و فعالیت‌های بیوترورستی، طراحی سامانه‌ای برای پیشگیری یا درمان یک ضرورت است. در سال‌های اخیر، تلاش‌های فراوانی برای استفاده از فناوری نانو به منظور تحویل دارو و واکسن صورت گرفته است. در صنعت تولید واکسن، سامانه‌های سنتی آنتی‌ژن‌رسانی که میزان بارگیری پایینی دارند، موجب تخریب بخشی از آنتی‌ژن می‌شوند. پایداری اندک، آزادسازی سریع آنتی‌ژن را به دنبال دارد و انتقال مقدار مورد نیاز آنتی‌ژن به بدن حیوان، نیازمند تکرار تزریق است؛ بنابراین، با توجه به تخریب کمتر و حفاظت بیشتر فعالیت آنتی‌ژن در نانوذرات نسبت به استفاده از روش‌های سنتی و نیز تکرار تزریق کمتر، اختصاصیت بالاتر، کاهش عوارض جانبی، هزینه کمتر و آهسته رهش بودن، استفاده از نانوذرات گزینه مناسبی برای جایگزین شدن با سامانه‌های سنتی است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که تضاد منافی در این مطالعه وجود ندارد.

کد اخلاق: ۹۵۲۷۲۵۰

References

- Riedel S, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, et al. Jawetz melnick adelbergs medical microbiology. 28th ed. Mcgraw Hill Publication. 2007; P.231-6.
- Khardori N. Anthrax bacteriology clinical presentations and management in khardori bioterrorism preparedness medicine public health policy. Wiley VCH Verlag GmbH Weinheim Publication.2006; P. 123-45.
- Gonzalez MR, Bischofberger M, Pernot L, Goot FG, Freche B. Bacterial poreforming toxins the hole story. Cell Mol Life Sci 2008; 65:493-507
- Edwards KA, Clancy HA, Baeumner AJ. Bacillus anthracis toxicology, epidemiology and current rapid detection methods. Anal Bioanal Chem2006;384:73-84. doi.10.1007/s00216-005-0090-x.
- Gupta P, Waheed SM, Bhatnagar R. Expression and purification of the recombinant protective antigen of Bacillus anthracis. Prote Exp Pur 1999; 16:369-76. doi.10.1006/prep.1999.1066.
- Wang, JY, Roehrl, MH. Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore Bacillus and toxin. Med Immunol2005; 24: 4:4. doi.10.1186/1476-9433-4-4
- Hepburn MJ, Hugh Dyson E, Simpson AJ, Breneman KE, Bailey N, Wilkinson L, Hornby R, Mateczun AJ, Bell MG, Baillie LW. Immune response to two different dosing schedules of the anthrax vaccine precipitated vaccine. Vaccine2007; 25:6089-97. doi.10.1016/j.vaccine.2007.05.018.
- Chi X, Li J, Liu W, Wang X, Yin K, Liu J, Zhang X. Generation and characterization of human monoclonal antibodies targeting anthrax protective antigen following vaccination with a recombinant protective antigen vaccine. Clin Vac Immunol 2015; 22: 553-60. doi.10.1128/CI.00792-14
- Williamson D, Dyson EH. Anthrax prophylaxis recent advances and future directions. Front Microbiol2015; 6, 1009. doi.10.3389/fmich.2015.01009
- Knockenbauer KE, Sawicka KM, Roemer EJ, Simon SR. Protective antigen composite nanofibers as a transdermal anthrax vaccine. Con Proc IEEE Eng Med Biol Soc2008;5: 1040-3. doi. 10.1109/IEMBS.2008.4649337
- Blum JS, Saltzman WM. High loading efficiency and tunable release of plasmid DNA encapsulated

شد که رهایش آنتی‌ژن‌های یادشده در دو مرحله رهایش سریع و آهسته انجام می‌شود که آزادسازی پروتئین‌ها در روز اول حدود ۲۰ درصد و پس از گذشت ۴۹ روز، به میزان ۷۸ درصد محاسبه گردید؛ همچنین بازده کپسول‌سازی آنتی‌ژن‌ها در این نانوذرات حدود ۴۵ درصد تعیین شد. در این مطالعه، بهترین شرایط برای بارگذاری پروتئین در نانوذرات PLA-PEG زمانی است که محلول پلیمر با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر (۲ درصد) و میزان پروتئین بارگذاری شده حدود ۲ میلی‌گرم باشد. اندازه نانوذرات حاصل برای نانوذرات حاوی آنتی‌ژن مخلوط حدود ۱۰۹ نانومتر بود.

مطابق با نتایج به دست آمده، بررسی رهایش آنتی‌ژن به وسیله کوپلیمرهای دوتایی PLA-PEG نشان داد که کوپلیمر به دست آمده، بازدهی نسبتاً خوبی در حدود ۴۵ درصد دارد؛ همچنین سازوکار رهایش و پایداری نانوذرات طولانی مدت است و با سرعت ثابتی آنتی‌ژن را رها می‌کند؛ در نتیجه به نظر می‌رسد که نانوذرات PLA-PEG یک حامل کارآمد برای سامانه‌های آنتی‌ژن‌رسانی کنترل شده باشد.

بنابراین، بر اساس مطالعات مختلف، بهترین راه جلوگیری از بیماری سیاه‌زخم، پیشگیری با استفاده از واکسن‌های مناسب است. به علت اهمیت و قابل استفاده

- in submicron particles fabricated from Plga conjugated with poly L lysine]. *J Cont Rel* 2008;129:66-72. doi.10.1016/j.jconrel.2008.04.002
12. Ghasemi R, Abdollahi M, Zadeh EE, Khodabakhshi K, Badeli A, Bagheri H, et al. Mpeg-pla and pla-peg-pla nanoparticles as new carriers for delivery of recombinant human growth hormone. *Sci Rep*2018;8:9854. doi.10.1038/s41598-018-28092-8
 13. Etemadaubi M, Honari H, Hajinourmohamadi A, Bagheri H, Noofeli M. [Assessment of cytotoxicity of Bacillus anthracis recombinant protective antigen in free and encapsulated forms by double block Pla-peg and Pcl-peg copolymers on vero cell]. *Jundishapur Sci Med J* 2018; 17:377-86. (Persian)
 14. Singh NA, Mandal AKA, Khan ZA. Fabrication of Pla-peg nanoparticles as delivery systems for improved stability and controlled release of catechin. *J Nanomate* 2017; :1-9. doi. 10.1155/2017/6907149
 15. Kim SK, Foote MB, Huang L. The targeted intracellular delivery of cytochrome C protein to tumors using lipid apolipoprotein nanoparticles]. *Biomaterials*2012;33:3959-66. doi. 10.1016/j.biomaterials.2012.02.010
 16. Park J, Wrzesinski SH, Stern E, Look M, Criscione J, Ragheb R, et al. Combination delivery of TGF β inhibitor and IL2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nat Mater* 2012;11:895-905. doi.10.1038/nmat3355
 17. Manickavasagam D, Novak K, Oyewumi MO. Therapeutic delivery of simvastatin loaded in Pla-peg polymersomes resulted in amplification of anti inflammatory effects in activated microglia. *AAPS J*2017;20:18. doi.10.1208/s12248-017-0176-3
 18. Vila A, Gill H, Mccallion O, Alonso MJ. Transport of Pla-peg particles across the nasal mucosa effect of particle size and peg coating density]. *J Cont Rel*2004;98:231-44. doi.10.1016/j.jconrel.2004.04.026
 19. Manish M, Rahi A, Kaur M, Bhatnagar R, Singh S. A single dose Plga encapsulated protective antigen domain 4 nanoformulation protects Mice against Bacillus anthracis spore challenge. *Plos One* 2013;8:61885. doi.10.1371/journal.pone.0061885
 20. Malik A, Gupta M, Mani R, Gogoi H, Bhatnagar R. Trimethyl chitosan nanoparticles encapsulated Protective antigen protects the Mice against anthrax. *Front Immunol.* 2018;9:562. doi. 10.3389/fimmu.2018.00562
 21. Jain AK, Goyal AK, Mishra N, Vaidya B, Mangal S, Vyas SP. Peg-pla-peg block copolymeric nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *Int J Pharm* 2010;387:253-62. doi.10.1016/j.ijpharm.2009.12.013
 22. Dong Y, Feng SS. Nanoparticles of poly D L-lactide methoxy poly ethylene glycol poly D L lactide blends for controlled release of paclitaxel. *J Biomed Mater Res*2006;78:9-12. doi. 10.1002/jbm.a.30684
 23. Li M, Cai RJ, Song S, Jiang ZY, Li Y, Gou HC, Qiu HJ. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of recombinant outer membrane proteins of Haemophilus parasuis serovar 5 in a murine model. *PLos One* 2017;12:176537. doi.10.1371/journal.pone.0176537
 24. Martins VT, Chavezfumagalli MA, Lage DP, Duarte MC, Garde E, Costa LE. et al. Antigenicity immunogenicity and protective efficacy of three proteins expressed in the promastigote and amastigote stages of Leishmania infantum against visceral Leishmaniasis. *PLos One*2015;10:137683. doi. 10.1371/journal.pone.0137683