

بررسی تیتراژ آنتی‌بادی نانوسفر کopolyمیری دو بلوکه PLA-PEG حاوی پروتئین نوترکیب کایمیریک آنتی‌ژن محافظ و فاکتور کشنده باسیلوس آنتراکسیس

حسین هنری* (Ph.D)، محمدابراهیم مینایی (Ph.D)، حسن میرحاج (Ph.D)، سید مسیح اعتماد ایوبی (Ph.D)

مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۱۷

* نویسنده مسئول، تلفن: ۷۷۱۰۵۱۲۲-۰۲۱ Honari.hosein@gmail.com

چکیده

هدف: تا به امروز واکسن‌های زیادی برای بیماری سیاه‌زخم ساخته شده؛ اما هنوز واکسنی ایده‌آل تولید نشده است. در این تحقیق، برای رفع مشکلات ناشی از واکسن‌های موجود و افزایش کارایی واکسن پیشنهادی، از پروتئین نوترکیب کایمیریک حاوی دُمین ۱ فاکتور کشنده و دُمین ۴ آنتی‌ژن محافظ باسیلوس آنتراکسیس در نانوکپسول کopolyمیری استفاده شد. مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، برای تولید نانوکپسول‌های حاوی پروتئین نوترکیب کایمیریک آنتی‌ژن محافظ و فاکتور کشنده باسیلوس آنتراکسیس از روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال استفاده شد. اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات، بازده بارگذاری نانوذرات، الگوی ره‌ایش پروتئین نوترکیب، تأثیر احتمالی روش تولید نانوذرات پلی‌لاکتیک اسید- پلی‌اتیلن گلیکول (PLA-PEG) (بر روی ماندگاری پروتئین‌های نوترکیب بررسی شد. به منظور تولید آنتی‌بادی و بررسی پاسخ ایمنی، از موش‌های سوری به عنوان نمونه تست و شاهد استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین تیتراژ آنتی‌بادی تولیدی علیه پروتئین‌های کایمیریک به صورت بارگذاری شده نسبت به آزاد، اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. اختلاف تیتراژ آنتی‌بادی بین گروه‌های یک بار تزریق بارگذاری شده و دو بار تزریق بارگذاری شده و آنتی‌ژن آزاد، معنی‌دار است و بیش‌ترین تیتراژ آنتی‌بادی، مربوط به دو بار تزریق بارگذاری شده است. همچنین بین تزریق بارگذاری شده یک تزریق و آزاد، اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. این مطلب بیانگر این است که می‌توان با بارگذاری آنتی‌ژن‌های کایمیریک در نانوذرات PLA-PEG و یک بار تزریق (به جای چهار تزریق) میزان آنتی‌بادی بیش‌تری تولید نمود. نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که دُمین چهار آنتی‌ژن محافظ و دُمین اول فاکتور کشنده باسیلوس آنتراکسیس با یک‌دیگر ادغام پذیرند و آنتی‌ژن فعالی را تولید می‌نماید. این آنتی‌ژن‌های کایمیریک تولید شده (LFD1-PA4)، فعال است و قادر به تحریک سیستم دفاعی حیوان آزمایشگاهی می‌باشد. همچنین نانوحامل‌های حاوی آنتی‌ژن تولیدی با ره‌ایش کنترل شده، می‌تواند سیستم ایمنی حیوان آزمایشگاهی را تحریک نماید.

واژه‌های کلیدی: پروتئین‌های بهم پیوسته نوترکیب، آنتی‌ژن‌های باکتریایی، باسیلوس آنتراکسیس، واکسن‌ها، سیاه زخم

مقدمه

سیاه‌زخم یک بیماری مشترک بین انسان و دام است. اگرچه سیاه‌زخم در سال‌های گذشته، یک بیماری مخرب از نظر اقتصادی در حیوانات اهلی به شمار می‌رفت و امروزه هر چند این بیماری با توسعه خدمات بهداشتی- درمانی مناسب کنترل شده است؛ ولی عامل مهمی در تهدیدات تروریستی به شمار می‌رود [۱]. اگر بیماری سیاه‌زخم در مراحل اولیه تشخیص داده شود، عفونت با آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شود؛ اما علائم همیشه به موقع ظاهر نمی‌شوند تا درمان آنتی‌بیوتیکی مؤثر باشد. بنابراین واکسناسیون برای حمایت اشخاصی که در معرض خطر هستند، الزامی است [۲]. از این‌رو تعدادی از آنتی‌ژن‌های

باسیلوس آنتراکسیس، به منظور بررسی توانایی‌شان برای القای ایمنی حمایتی علیه بیماری، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از شناخته‌شده‌ترین این آنتی‌ژن‌ها می‌توان کپسول، لایه S، پلی‌ساکاریدهای سطحی و پروتئین‌های دیگر را نام برد. تنها پروتئین‌هایی که با یک‌دیگر توکسین سیاه‌زخم را می‌سازند، باعث تولید آنتی‌بادی‌های قابل شناسایی می‌شوند [۳، ۴]. بیش‌تر واکسن‌های موجود، بر پایه کار بر روی آنتی‌ژن محافظ (Protective Antigen PA) هستند. در حال حاضر واکسن سیاه‌زخم مجوز گرفته در انگلستان (AVP)، از کشت سویه استرن باسیلوس آنتراکسیس فیلتر شده در رسوب آلوم (Alum) به‌دست می‌آید؛ در نتیجه دارای حداکثر پروتئین PA تولیدی

است. در واکنشی که در ایالات متحده آمریکا اجازه استفاده گرفته (AVA) است، آنتی ژن بر روی هیدروکسید آلومینیوم جذب می‌شود. واکنش‌های انسانی کنونی از حالت ایده‌آل فاصله دارند، تولید آن‌ها گران است، احتیاج به دوزهای تکراری دارند و ممکن است اثرات جانبی گذرا در برخی افراد ایجاد کنند. همچنین شواهدی موجود است که ممکن است حفاظت کامل علیه تمام سویه‌های این باکتری ایجاد نشود. در واقع مشکل اصلی این واکنش‌ها برنامه طولانی واکسیناسیون (شش واکسیناسیون طی هجده ماه) از یک طرف و ایجاد طیف محدود ایمنی است [۵].

دلیل ایمونوژنیسیته پایین واکنش PA، عدم پایداری و مقاومت کم PA آزاد در شرایط سخت و ناملازم است [۳]. با توجه به دلایل ذکر شده، انواع متفاوتی از راهکارهای تحویلی از قبیل میکرو و نانوسفرهای پلیمری، ایمپلنت‌های زیست تخریب‌پذیر، هیدروژل‌های قابل تزریق و PEG دار کردن حامل‌ها به طور وسیعی ارائه شده و مورد توجه قرار گرفته است [۶،۷]. از جمله مزایای این سیستم‌های تحویل دارو، سطح مناسب غلظت دارو درون خون برای مدت زمانی طولانی است که از تزریق دارو به طور مرتب جلوگیری به عمل می‌آید [۸]. استفاده از پلیمرها به عنوان حامل واکنش، نه تنها باعث محافظت در برابر شرایط اسیدی و پروتئازهای دستگاه گوارش خواهد شد، بلکه با رهایش آهسته و طولانی مدت آنتی ژن و عرضه آن به سیستم ایمنی بدن، پاسخ ایمنی مؤثر ایجاد خواهد شد. برای این منظور، می‌توان از پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار مختلفی استفاده نمود که به صورت طبیعی و یا مصنوعی تولید می‌شوند [۹].

با وجود مزایای واکنش‌های حاوی ارگانسیم زنده، مشکلاتی نیز وجود دارد؛ به عنوان مثال بسیاری از اجزای این ارگانسیم‌ها برای تحریک پاسخ سیستم ایمنی، مورد نیاز نیستند ولی در عمل کل ارگانسیم، به عنوان واکنش، به بدن موجود واکسینه شده منتقل می‌شوند. این بخش‌های اضافی می‌تواند با کاهش سطح حفاظت ایجاد شده در مقابل آنتی ژن‌های محافظ و در نهایت پاسخ نامناسب و ناکارآمد سیستم ایمنی، موجب کاهش کارایی واکسیناسیون گردد و در برخی موارد حتی منجر به ایجاد آسیب در موجود واکسینه شده، گردد. در برخی موارد نادر نیز ارگانسیم ضعیف شده به حالت بیماری‌زای خود تبدیل و موجب ایجاد بیماری در موجود زنده می‌گردد [۱۰].

با توجه به این مشکلات، امروزه سعی بر توسعه واکنش‌های حاوی یک یا چند جزء مشخص از ارگانسیم است. این واکنش‌ها تحت عنوان واکنش‌های زیرواحدی موسومند و مزیت‌های قابل توجهی بر واکنش‌های سنتی دارند؛ از جمله

بهبود ایمنی ایجاد شده (در صورت انتخاب آنتی ژن مناسب)، اختصاصی بودن، سازگاری و ذخیره‌سازی و نگهداری آسان‌تر (به عنوان مثال با استفاده از فرمولاسیون خشک شده). از طرفی این موضوع، فرصت‌های بیش‌تری برای مهندسی واکنش‌ها و تعیین فرمولاسیون مناسب برای ایجاد پاسخ ایمنی به وجود آورده است [۱۱].

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که برای دستیابی به واکنشی کارآمد، استفاده از فاکتور کشنده امری ضروری است و به خاطر وجود اپی‌توپ‌هایی که در ساختار فاکتور کشنده وجود دارد، تیتراژ آنتی‌بادی تولید شده (القا شده) علیه این آنتی ژن بالاست [۴]. از طرفی مشخص شده است که آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولیدشده علیه LF، بیش‌ترین برهم کنش را با دُمین ۱ فاکتور کشنده (LFD1) دارند که این نشان‌دهنده اهمیت این ناحیه است [۱۲]. هم‌چنین اپی‌توپ‌های LFD1 تقریباً دو برابر هر کدام از نواحی دیگر در تولید آنتی‌بادی نقش دارد [۱۳]. بنابراین در این تحقیق برای رفع مشکلات ناشی از واکنش‌های موجود و افزایش کارایی واکنش پیشنهادی، از دو دُمین مهم آنتی ژن باکتریایی ذکر شده، استفاده شد. بدین منظور ژن‌های *lfd1* و *pa4* به هم الحاق شدند و قطعه ژنی *lfd1-pa4* به صورت کایمر مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

قطعه ژنی الحاقی شامل ژن‌های *lfd1* (توالی اسیدآمینه‌ای ۲۵۷-۱ از انتهای آمینی فاکتور کشنده) و *pa4* (۵۱۰ جفت باز از انتهای کربوکسیلی آنتی ژن محافظ) (توالی بازی ۱۷۸۶-۲۲۹۶ انتهای کربوکسیلی آنتی ژن محافظ) به باکتری *E.coli* انتقال و در میزبان باکتریایی بیان شد. لازم به ذکر است که باکتری‌های حاوی ناقل بیانی ژن‌های *lfd1* و *pad4* از مرکز علم و فناوری زیست‌شناسی دانشگاه جامع امام حسین (ع) تهیه گردید. در ادامه پروتئین تولیدی از میزبان باکتریایی، تخلیص و آنتی ژن کایمر در نانوسفرهای کوپلیمر دبلوک PEG-PLA بارگذاری شد. برای تولید نانوکپسول‌ها از روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال استفاده شد [۱۴]. برای بررسی اندازه و پتانسیل زتا (Zeta Potential) نانوذرات تولید شده از دستگاه DLS مدل Malvern ساخت کشور انگلستان متعلق به دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) استفاده شد. برای بررسی الگوی رهایش پروتئین نو ترکیب کایمریک LFD1-PA4 از نانوکپسول، مقداری از نانوذرات 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

داده شد. در هر مرحله زمانی برای برداشت نمونه، محلول حاوی نانوذرات به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور، سانتریفوژ و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته و به همان میزان بافر تازه جایگزین می‌شد و پس از ورتکس کردن مجدد در شیکر انکوباتور قرار می‌گرفت. انجام این آزمون به مدت ۴۹ روز ادامه داشت. در ابتدا، ۴ ساعت پس از انجام رهایش و در ادامه در فاصله زمانی هر هفت روز انجام گرفت. سپس با استفاده از روش پروتئین‌سنجی برادفورد با سه بار تکرار، غلظت پروتئین موجود در نمونه تعیین گردید. در نهایت منحنی درصد تجمع پروتئین رها شده از نانوذرات در مدت زمان‌های تعیین شده، ترسیم شد.

برای مشخص نمودن تأثیر احتمالی روش تولید نانوذره PLA-PEG بر روی پایداری و ماندگاری پروتئین نو ترکیب، ابتدا حجم مشخصی از محلول حاوی نانوذره پس از تولید به یک لوله فالكون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل و سپس سانتریفوژ شد. پس از حذف محلول رویی، به رسوب آن‌ها ۲ میلی‌لیتر بافر رهایش نانوذره (محلول حاوی SDS ۵ درصد و NaOH 0.1M) اضافه شد. سپس نمونه نانوذرات در مدت زمان ۱۶ ساعت در محلول رهایش سریع بر روی شیکر به آرامی شیک شدند [۱۵]. سپس نمونه جمع‌آوری شده از تخریب کامل نانوذرات به همراه حجم مشخص پروتئین نو ترکیب، در چاهک‌های ژل SDS-PAGE 12 درصد الکتروفورز گردید. در نهایت ژل SDS-PAGE رنگ‌آمیزی شد تا وجود باندهای پروتئینی رهایش شده از نانوذرات مشخص شود.

برای انجام ایمنی‌زایی، پروتئین نو ترکیب LFD1-PA4 طی چهار نوبت به گروه تست و شاهد موش‌های سوری (از نوع Mus musculus ماده با وزن ۲۵-۲۰ گرم و سن ۴ هفته) به ترتیب در روز ۱، ۱۴، ۲۸ و ۴۲ به صورت زیرپوستی تزریق شد. همچنین پروتئین نو ترکیب LFD1-PA4 کپسوله شده در نانوذرات PLA-PEG نیز به صورت یک تزریقه (روز ۱) و دو تزریقه (روز ۱ و ۲۸) به صورت زیرپوستی انجام گردید (جدول ۱). برای حیوانات شاهد نیز به جای آنتی‌ژن از نانوذرات فاقد پروتئین و PBS استفاده شد.

خون‌گیری از موش‌ها در سه نوبت انجام شد. خون‌گیری‌ها یک هفته پس از تزریق دوم (روز ۲۱)، یک هفته پس از تزریق سوم (روز ۳۵) و یک هفته پس از تزریق چهارم (روز ۴۹) از گوشه چشم هر موش صورت پذیرفت. به منظور تعیین تیتراژ آنتی‌بادی موجود در سرم موش از روش الیزای غیر مستقیم به روش زیر استفاده گردید:

پروتئین آنتی‌ژن با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر PBS با حجم ۱۰۰ میکرولیتر به حفره‌های پلیت الایزا (Nunc, Maxsorb, Denmark) اضافه شد. پلیت پوشیده شده با پروتئین آنتی‌ژن به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس سه بار با بافر شستشو (بافر PBS حاوی ۰/۵ درصد توئین ۲۰) شسته شد. جهت بلوکه کردن از بافر PBS حاوی ۱ درصد آلبومین گاوی (BSA) استفاده شد. حجم ۲۰۰ میکرولیتر از این بافر به هر حفره اضافه و سپس یک ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. مجدداً پلیت سه بار با بافر شستشو، شسته شد و نمونه‌های سرمی با رقت‌های ۱ به ۲۰۰، ۱ به ۴۰۰، ۱ به ۸۰۰ و ... در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر حفره اضافه و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. پس از شست‌وشوی پلیت، آنتی‌بادی موشی کونزوگه با آنزیم پرکسیداز دارای رقت ۱ به ۱۰۰۰ به تمام حفره‌ها اضافه و به مدت ۲ ساعت نگهداری شد. پس از شست‌وشوی پلیت، سوبسترای اختصاصی OPD به حفره‌ها اضافه گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۰/۵ مولار به عنوان متوقف‌کننده واکنش در هر چاهک اضافه شد. شدت رنگ (OD) در طول موج ۴۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر مدل Stat Fax-2100 ثبت گردید. از روی منحنی استاندارد غلظت آنتی‌بادی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت [۱۶].

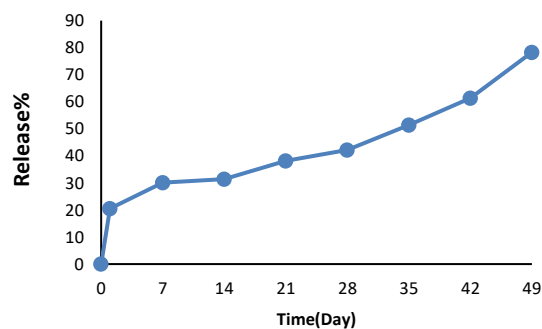
آنالیز آماری. برای بررسی آماری داده‌های حاصل از تیتراژ آنتی‌بادی تولید شده توسط الایزای غیرمستقیم در سرم، از آزمون‌های ANOVA و T.test استفاده شد. این آزمون برای مقایسه میانگین تیتراژ آنتی‌بادی نمونه‌ها (آزمون دانکن برای بررسی اختلاف بین گروه‌ها) در سطح خطای پنج درصد و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد.

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

ردیف	پروتئین تزریقی	تزریق ۱ (۲۰ میکروگرم)	تزریق ۲ (۱۵ میکروگرم)	تزریق ۳ (۱۰ میکروگرم)	تزریق ۴ (۱۰ میکروگرم)	تعداد موش‌ها در هر گروه	روش تزریق
		روزاول	روز ۱۴	روز ۲۸	روز ۴۲		
۱	پروتئین کایمر LFD1-PA4 آزاد	+	+	+	+	۵ سر در هر گروه	زیرپوستی
۲	پروتئین کایمر LFD1-PA4 بارگذاری شده در نانوذرات	+	-	+	-		
۳	PBS	+	+	+	+		

نتایج

رهایش پروتئین از نانوذرات PEG-PLA به مدت ۴۹ روز (زمان آخرین مرحله خونگیری) بررسی و بر اساس درصد تجمعی رهایش پروتئین در نمودار نمایش داده شد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود بعد از این مدت زمان در حدود ۷۸ درصد رهایش از نانوذرات PEG-PLA انجام شده است.



شکل ۱. نتایج درصد تجمعی رهایش پروتئین نو ترکیب کایمر از نانوذرات PEG-PLA در طول مدت ۴۹ روز

پس از آماده سازی نمونه، نانوذرات PEG-PLA تولید شده در حضور پروتئین کایمر LFD1-PA4 و نبود پروتئین توسط دستگاه DLS بررسی شدند. از نظر پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی (PDI) نانوذرات فوق در محدوده مناسبی قرار داشتند (جدول ۲).

جدول ۲. بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات با استفاده از پراش نور پویا

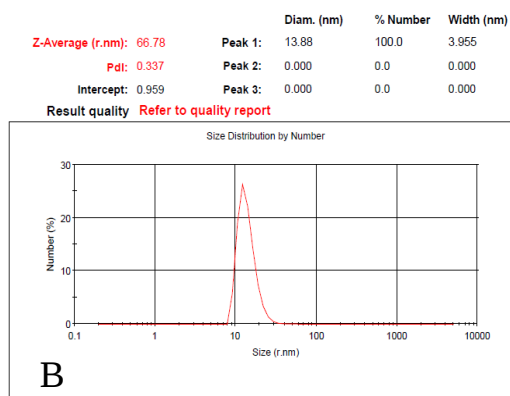
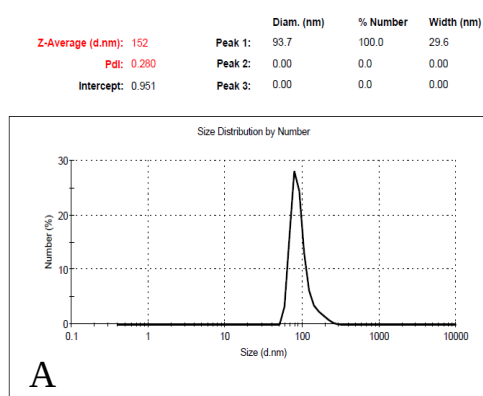
نمونه کنترل	پتانسیل زتا (میلی ولت)	اندازه (نانومتر)	PDI
نانوذرات حاوی پروتئین کایمر LFD1-PA4	-۳۲/۱	۱۳/۸۸	۰/۳۳۷
	-۲۳/۱	۹۳/۷	۰/۲۸۰

در تحقیق حاضر با تغییر در پارامترهای موثر در فرایند ساخت نانوذرات، نهایتاً نانوذرات آنتی ژن کایمر LFD1-PA4

بارگذاری شده در PEG-PLA با میانگین اندازه ۹۳/۷ نانومتر و پتانسیل زتای ۲۳/۱- میلی ولت و $PDI=0.280$ تهیه شد. این نتایج با برخی از مطالعات مطابقت دارد (شکل ۲ و ۳). با استفاده از محلول رهایش، پروتئین های کایمر LFD1-PA4 در نانوذرات PEG-PLA، میزان پروتئین رهائشده از شبکه پلیمری مذکور با قرائت جذب نوری مایع رویی محاسبه گردید. پس از بررسی پروتئین های رهائشده از نانوذرات با پروتئین های پیش از بارگذاری بر روی ژل SDS-PAGE (شکل ۴) تفاوتی مشاهده نگردید.

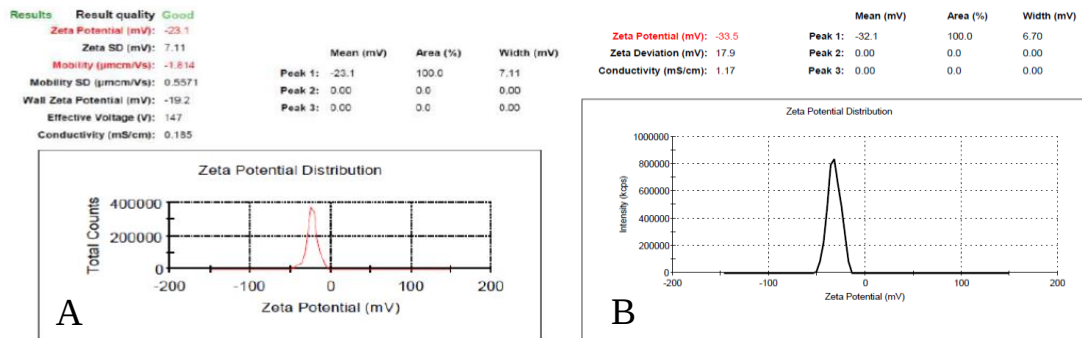
به منظور ارزیابی تیتراژ آنتی بادی تولید شده از تزریق پروتئین کایمر (LFD1-PA4) به سه شکل آزاد (چهار بار تزریق)، بارگذاری شده یک بار تزریق و بارگذاری شده دو بار تزریق و محاسبه میزان آن در هر مرحله تزریق، از روش الایزا غیرمستقیم علیه آنتی ژن های LFD1-PA4، LFD1 و PA4 استفاده شد. غلظت آنتی بادی تولید شده بر اساس جذب نوری (OD) تزریق سوم (رقت ۱/۲۰۰) و منحنی استاندارد و سه بار تکرار، اندازه گیری و نتایج در شکل ۵ مقایسه شد. نتایج نشان دهنده این بود که بالاترین میزان غلظت آنتی بادی در تمامی تجویزها مربوط به خونگیری سوم بوده که یک هفته پس از آخرین تزریق، خونگیری از موش ها به عمل آمده است. همچنین در خونگیری آخر، بیشترین غلظت آنتی بادی، علیه نانوذرات بارگذاری شده با آنتی ژن کایمر LFD1-PA4 اندازه گیری شد.

نتایج به دست آمده از آزمون دانکن نشان می دهد اختلاف بین گروه ها شامل آنتی ژن آزاد (گروه شماره ۳۱)، بارگذاری شده یک تزریق (گروه شماره ۳۲) و بارگذاری شده دو تزریق (گروه شماره ۳۳) و نیز گروه های کنترل ۱ و ۲ (شامل PBS و PLA-PEG) در سطح خطای پنج درصد معنی دار است (جدول ۳). مقایسه میانگین ها در شکل ۶ نشان داده شده است.

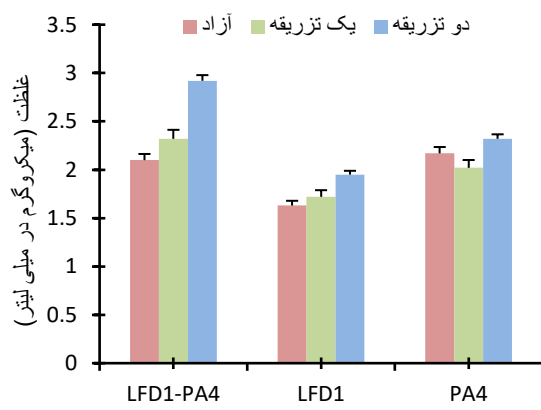


شکل ۲. نمودار بررسی بازه توزیع اندازه نانوذرات PEG-PLA حاوی پروتئین کایمر (A) LFD1-PA4 و فاقد پروتئین (B) در شرایط بهینه توسط دستگاه

DLS



شکل ۳. نمودار بررسی پتانسیل زتای نانوذرات PEG-PLA حاوی پروتئین کایمر (A) LFD^۱-PA^۴ و فاقد پروتئین (B) در شرایط بهینه توسط دستگاه DLS



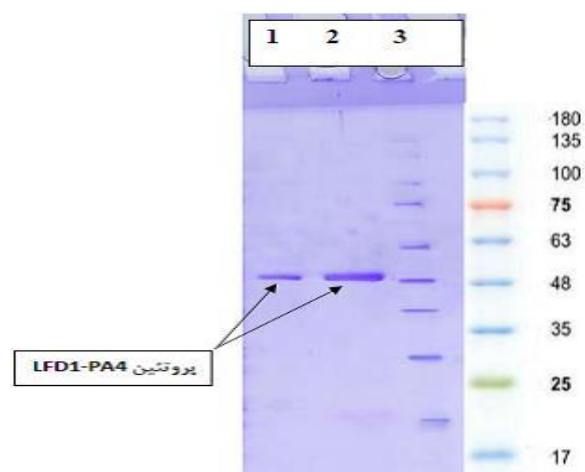
غلظت آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های نو ترکیب

شکل ۶. مقایسه میانگین تیتراژ آنتی‌بادی تولید شده ناشی از تزریق پروتئین کایمر LFD^۱-PA^۴ به سه شکل آزاد، بارگذاری شده یک تزریق و بارگذاری شده دو تزریق علیه آنتی ژن LFD^۱-PA^۴.

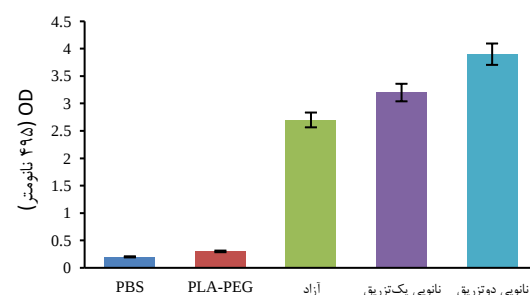
جدول ۳. نتایج آزمون دانکن: آنتی ژن آزاد، بارگذاری شده یک تزریق و بارگذاری شده دو تزریق در گروه‌های مجزا قرار گرفته‌اند.

G31_G32					
Duncan ^a					
VAR00021	N	1	2	3	4
1.00	3	.1427			
2.00	3	.2347			
31.00	3		2.7330		
32.00	3			3.0830	
33.00	3				3.8310
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



شکل ۴. الف - الگوی الکتروفورز ارزیابی کیفیت پروتئین کایمر-LFD^۱ PA^۴ رهاش یافته از نانوذرات PEG-PLA: ستون ۱- پروتئین کایمر LFD^۱-PA^۴ رهاش یافته از نانوذرات PEG-PLA. ستون ۲- پروتئین کایمر LFD^۱-PA^۴ قبل از بارگذاری در نانوذرات PEG-PLA. ستون ۳- نشانگر ملکولی پروتئین. با مقایسه الگوی باندی پروتئین-LFD^۱ PA^۴ پیش از بارگذاری در نانوذرات PEG-PLA و پس از رهاش، تغییری در کیفیت آن ایجاد نشده است.



تیتراژ آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های نو ترکیب

شکل ۵. نمودار غلظت آنتی‌بادی تولید شده پس از تزریق سوم (رقت ۱/۲۰۰) پروتئین کایمر LFD^۱-PA^۴ به سه صورت آزاد، بارگذاری شده یک تزریق و بارگذاری شده دو تزریق علیه پروتئین‌های LFD^۱-PA^۴ و LFD^۱ PA^۴.

بحث و نتیجه‌گیری

تا به امروز واکسن‌های زیادی برای سیاه‌زخم ساخته شده؛ اما هنوز واکسنی ایده‌آل تولید نشده است. مطالعات نشان داده است که برای دستیابی به واکسنی کارآمد و مناسب، به استفاده از آنتی‌ژن محافظ (PA) و فاکتور کشنده (LF) در ترکیب با یکدیگر و ادجوانتها نیاز است [۱۷، ۱۸]. بررسی توالی

یک فاکتور کننده را در انتهای آمینی قرار دادند [۲۴]. آقای Makam و همکاران برای ساخت پروتئین کایمر از چهار آنتی ژن محافظ و یک قطعه پروتئینی از انتهای کربوکسیلی آنتی ژن قابل استخراج شماره ۱، دُمین چهار را در قسمت انتهای آمینی قرار دادند [۲۵].

آقای Shcherbinin و همکاران برای تولید پروتئین کایمر از دُمین ۴ آنتی ژن محافظ و قسمت FC آنتی بادی IgG2a، دُمین چهار را در قسمت انتهای کربوکسیلی پروتئین کایمر قرار دادند، گرچه قرار دادن آن در قسمت انتهای آمینی پروتئین کایمر نیز پاسخ آنتی بادی مشابهی ایجاد نمود [۲۶].

در مطالعه مشابه دیگری آقای Varshney و همکاران برای ساخت پروتئین کایمر از دُمین های ۲-۴ آنتی ژن محافظ و دُمین یک فاکتور کننده، دُمین یک را در انتهای آمینی قرار دادند [۲۷].

ابدوس و همکاران، برای تولید واکسن علیه سیاه زخم، از سه قطعه پروتئینی EFD1 (دومین انتهای آمینی فاکتور ادم)، LFD1 (دومین انتهای آمینی فاکتور کننده) و PAD4 (دومین انتهای کربوکسیلی آنتی ژن محافظ) به عنوان یک پروتئین کایمریک سه قسمتی استفاده نمودند و با نرم افزار بیوانفورماتیک، PAD4 را در انتهای کربوکسیلی پروتئین کایمریک حاصل قرار دادند. نتایج آن ها نشان داد که این حالت بهترین پایداری را دارد و II Instability Index پروتئین مورد نظر ۴۰/۷۳ محاسبه گردید، بنابراین تایید کننده پروتئین کایمر مطالعه ما نیز محسوب می گردد [۲۸].

نتایج ارزیابی آنتی بادی IgG به روش الایزای غیر مستقیم نشان داد که در تمام گروه های تزریقی، میزان آنتی بادی در هر مرحله ی خون گیری افزایش یافته است و با مقایسه ی نتایج بین گروه های تزریقی و شاهد، اختلاف معنی داری از لحاظ آماری وجود دارد.

افزایش تیترا آنتی بادی در گروه هایی که نانوذرات حاوی آنتی ژن کایمر را دریافت نموده بودند نشان می دهد که نانوذرات، توانسته اند به عنوان ادجوانت عمل کنند و با رهایش مناسب و طولانی مدت آنتی ژن و قرار دادن در معرض سیستم ایمنی، آنتی بادی بیش تری را تولید نموده اند. میانگین غلظت آنتی بادی تولیدی علیه پروتئین های کایمر به صورت بارگذاری شده نسبت به آزاد، در سطح خطای ۵ درصد اختلاف معنی داری را نشان می دهد.

هم چنین اختلاف تیترا آنتی بادی بین گروه های یک بار تزریق بارگذاری شده و دو بار تزریق بارگذاری شده و آنتی ژن آزاد، در سطح خطای پنج درصد معنی دار است و بیش ترین تیترا آنتی بادی، مربوط به دو بار تزریق بارگذاری شده است. هم چنین

نوکلئوتیدی سویه های مختلف باسیلوس آنتراسیس، نشان می دهد که تمام سویه ها از نظر توالی نوکلئوتیدی ژن *pag* و *lef* (ژن های مسئول تولید فاکتور کننده و آنتی ژن محافظ) هم چنین توالی اسید آمینه تولید شده، یکسان هستند. محققین به دنبال ساخت واکسن های مبتنی بر آنتی ژن محافظ نو ترکیب (rPA) برای سیاه زخم هستند. آنتی ژن محافظ یکی از پروتئین های مهم از سموم سه گانه سیاه زخم است که از ۷۳۵ اسید آمینه تشکیل می گردد که از چهار دُمین تشکیل شده است. آنتی ژن محافظ از طریق دُمین ۴ به گیرنده خود در سطح سلول میزبان اتصال می یابد و این دُمین شامل اکثر اپی توپ های حفاظتی PA است. دُمین ۴، دارای ۱۳۹ اسید آمینه از انتهای کربوکسیلی آنتی ژن محافظ (توالی اسید آمینه ای از ۵۹۶ تا ۷۳۵) را تشکیل می دهد [۱۹].

در مطالعات انجام شده برای ساخت آنتی ژن محافظ نو ترکیب یا پروتئین کایمر توالی بازی مختلفی از انتهای کربوکسیلی آنتی ژن محافظ انتخاب گردیده است از جمله Baillie و همکاران ۵۵۲ جفت باز [۲۰]، آقای Makam و همکاران ۴۱۱ جفت باز [۲۱] و رضایی و همکاران ۶۰۰ جفت باز [۲۲] انتهای کربوکسیلی آنتی ژن محافظ را مورد مطالعه قرار داده اند.

ماهیت سه گانه سم سیاه زخم، این انتظار را به وجود می آورد که قسمت های دیگر سم، مانند فاکتور کننده و PA نیز در تولید آنتی بادی های خشی کننده سم تاثیر داشته باشند. در مطالعات مختلف مشاهده شده است که تجویز هم زمان فاکتور کننده و PA، میزان آنتی بادی علیه PA در موش را افزایش می دهد و این اثر ادجوانتی فاکتور کننده مربوط به قسمت انتهای آمینی آن یعنی LFD1 است. این ناحیه در مواردی توسط محققین برای انتقال آنتی ژن های مختلف مورد استفاده قرار گرفته و مشاهده شده است که پاسخ های ایمنی مربوط به سلول های تی CD4⁺ و CD8⁺ را ایجاد می نماید [۲۳].

با بررسی مطالعات مشابه انجام شده در این مورد و با توجه به این که دُمین ۱ فاکتور کننده در قسمت انتهای آمینی پروتئین مذکور و PA4 به طور طبیعی در انتهای کربوکسیلی آنتی ژن محافظ قرار می گیرند، در نهایت پروتئین کایمریک LFD1-PA4 انتخاب گردید.

آقای Baillie و همکاران پروتئین کایمر از دُمین یک فاکتور کننده و دُمین ۴ آنتی ژن محافظ با سیلوس آنتراسیس طراحی کردند و دُمین ۴ آنتی ژن محافظ را در انتهای کربوکسیلی پروتئین کایمر قرار دادند [۲۰]. آقای Wu و همکاران در طراحی و ساخت پروتئین کایمر از قطعات پروتئینی دُمین یک فاکتور کننده و آنتی ژن محافظ ۶۳ کیلودالتون (PA63)، دُمین

<https://doi.org/10.1086/341902>

PMid:12228822

[3] Flick-Smith HC, Eyles JE, Hebdon R, Waters EL, Beedham RJ, Stagg TJ, Williamson ED. Mucosal or parenteral administration of microsphere-associated Bacillus anthracis protective antigen protects against anthrax infection in mice. *Infect Immun* 2002; 70: 2022-2028.

<https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1653-1656.2002>

<https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.2022-2028.2002>

PMid:11895967 PMCID:PMC127835

[4] Chichester JA, Musiyuchuk K, de la Rosa P, Horsey A, Stevenson N, Ugulava N, Yusibov, V. Immunogenicity of a subunit vaccine against Bacillus anthracis. *Vaccine* 2007; 25: 3111-3114.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.068>

PMid:17280756

[5] Hepburn MJ, Dyson EH, Simpson AJ, Brennen KE, Bailey N, Wilkinson L, Baillie LW. Immune response to two different dosing schedules of the anthrax vaccine precipitated (AVP) vaccine. *Vaccine* 2007; 25: 6089-6097.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.05.018>

PMid:17604880

[6] Wei Y, Wang Y, Kang A, Wang W, Ho SV, Gao J, Su Z. A novel sustained-release formulation of recombinant human growth hormone and its pharmacokinetic, pharmacodynamic and safety profiles. *Mol Pharm* 2012; 9: 2039-2048.

<https://doi.org/10.1021/mp300126t>

PMid:22663348

[7] Zhang Y, Wu X, Han Y, Mo F, Duan Y, Li S. Novel thymopentin release systems prepared from bioresorbable PLA-PEG-PLA hydrogels. *Int J Pharm* 2010; 386: 15-22.

<https://doi.org/10.1016/j.jipharm.2009.10.045>

PMid:19895878

[8] Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers* 2011; 3: 1377-1397.

<https://doi.org/10.3390/polym3031377>

PMid:22577513 PMCID:PMC3347861

[9] Des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Pr  at, V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release* 2006; 116: 1-27.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.08.013>

PMid:17050027

[10] Donati C, Rappuoli R. Reverse vaccinology in the 21st century: improvements over the original design. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1285: 115-132.

<https://doi.org/10.1111/nyas.12046>

PMid:23527566

[11] Moyle PM. Biotechnology approaches to produce potent, self-adjuncting antigen-adjunct fusion protein subunit vaccines. *Biotechnol Adv* 2017; 35: 375-389.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.005>

PMid:28288861

[12] Albrecht MT, Li H, Williamson ED, LeButt CS, Flick-Smith HC, Quinn CP, Groen H. Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against Bacillus anthracis infection and enhance endogenous immunity to anthrax. *Infect Immun* 2007; 75: 5425-5433.

<https://doi.org/10.1128/IAI.00261-07>

PMid:17646360 PMCID:PMC2168292

[13] Nguyen ML, Crowe SR, Kurella S, Teryzan S, Cao B, Ballard JD, Farris AD. Sequential B-cell epitopes of Bacillus anthracis lethal factor bind lethal toxin-neutralizing antibodies. *Infect Immun* 2009; 77: 162-169.

<https://doi.org/10.1128/IAI.00788-08>

PMid:18981257 PMCID:PMC2612257

[14] 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 (rhGH). *Scientific Rep* 2018; 8: 9854.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-28092-8>

PMid:29959339 PMCID:PMC6026132

[15] Singh N, Mandal AK, Ahmed Khan Z. Fabrication of PLA-PEG nanoparticles as delivery systems for improved stability and controlled release of catechin. *J Nanomaterials*

بین تزریق بارگذاری شده یک تزریق و آزاد، اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. این مطلب بیانگر این است که می‌توان با بارگذاری آنتی‌ژن کایمر در نانوذرات PLA-PEG و یک بار تزریق (به جای چهار تزریق) میزان آنتی‌بادی بیش‌تری تولید نمود.

با توجه به این‌که نانوذرات حاوی آنتی‌ژن کایمر توانسته‌اند با رهایش تدریجی و عرضه آن به سیستم ایمنی، میزان قابل قبولی آنتی‌بادی تولید نمایند، نتایج الیزا نشان داد که در گروه نانوذرات حاوی آنتی‌ژن کایمر، سطح بالاتری از آنتی‌بادی نسبت به آنتی‌ژن آزاد همراه ادجوانت تولید شده است.

در صنعت تولید واکسن، سیستم‌های سنتی آنتی‌ژن‌رسانی که میزان بارگیری پایینی دارند، موجب تخریب بخشی از آنتی‌ژن می‌شوند. پایداری کم، آزادسازی سریع آنتی‌ژن را به دنبال دارد و انتقال مقدار مورد نیاز آنتی‌ژن به بدن حیوان، نیازمند تکرار تزریق است. لذا با توجه به تخریب کم‌تر و حفاظت بیش‌تر فعالیت آنتی‌ژن در نانوذرات نسبت به استفاده از روش‌های سنتی و نیز تکرار تزریق کم‌تر، کاهش عوارض جانبی، هزینه کم‌تر و آهسته رهش بودن، استفاده از نانوذرات گزینه مناسبی برای جایگزین شدن با سیستم‌های سنتی است. از طرفی دیگر به‌کارگیری آنتی‌بادی به‌منظور ایجاد ایمنی غیرفعال، می‌تواند روشی مناسب برای مقابله موقت و سریع علیه موارد بیماری باشد. هم‌چنین توسعه استفاده از نانوذرات حاوی پروتئین نوترکیب کایمر، برای افرادی که بیش‌تر در معرض بیماری سیاه‌زخم هستند، می‌تواند با ایجاد ایمنی موثر، تأثیرات کشنده بیماری را به طور چشم‌گیری کاهش دهد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که دُمین چهار آنتی‌ژن محافظ و اول فاکتور کشنده با یک‌دیگر ادغام پذیرند و آنتی‌ژن فعالی را تولید می‌نماید. این آنتی‌ژن کایمر، فعال است و قادر به تحریک سیستم دفاعی حیوان آزمایشگاهی می‌باشد. هم‌چنین نانو حامل‌های حاوی آنتی‌ژن تولیدی با رهایش کنترل شده، می‌توانند سیستم ایمنی حیوان آزمایشگاهی را تحریک کنند.

تشکر و قدردانی

از تمامی اساتید، پژوهش‌گران و همکاران محترم در دانشگاه جامع امام حسین (ع)، که در به نتیجه رسیدن این تحقیق تلاش فراوان کردند، تشکر و سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

[1] Patocka J, Splino M. Anthrax toxin characterization. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2002; 45: 3-5.

<https://doi.org/10.14712/18059694.2019.49>

[2] Bartlett JG, Inglesby TV Jr, Borio L. Management of anthrax. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 851-858.

- [23] Price BM, Liner AL, Park S, Leppla SH, Mateczun A, Galloway DR. Protection against anthrax lethal toxin challenge by genetic immunization with a plasmid encoding the lethal factor protein. *Infect Immun* 2001; 69: 4509-4515. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4509-4515.2001> PMID:11401993 PMCID:PMC98526
- [24] Wu G, Hong Y, Guo A, Feng C, Cao S, Zhang CC, Liu Z. A chimeric protein that functions as both an anthrax dual-target antitoxin and a trivalent vaccine. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4750-4757. <https://doi.org/10.1128/AAC.00640-10> PMID:20713663 PMCID:PMC2976106
- [25] Makam SS, Kingston JJ, Harischandra MS, Batra HV. Protective antigen and extractable antigen 1 based chimeric protein confers protection against *Bacillus anthracis* in mouse model. *Mol Immunol* 2014; 59: 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.01.012> PMID:24513572
- [26] Shcherbinin DN, Esmagambetov IB, Noskov AN, Tutykhina IL, Shmarov MM, Logunov DY, Gintsburg AL. Protective immune response against *Bacillus anthracis* induced by intranasal introduction of a recombinant adenovirus expressing the protective antigen fused to the Fc-fragment of IgG2a. *Acta Natur* 2014; 6: 20. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-1-76-84> <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-76-84>
- [27] Varshney A, Puranik N, Kumar M, Goel AK. Immunogenicity of a chimeric protein of *Bacillus anthracis* protective antigen and lethal factor in murine model. *Int J Infect Dis* 2016; 45: 426. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.906> <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.907>
- [28] Abdous M, Hasannia S, Salmanian AH, Shahryar Arab S, Shali A, Alizadeh GA, Mohseni A. A new triple chimeric protein as a high immunogenic antigen against anthrax toxins: theoretical and experimental analyses. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2018; 1-7. <https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1510419> PMID:30621469
- 2017; 1-9. <https://doi.org/10.1155/2017/6907149>
- [16] Mosayebi G, Abtahi H, Ghazavi A, Zareinfar N. Design of enzyme-linked immunosorbent assay method for detection of anti-streptolysin-O antibodies on base of recombinant streptolysin-O. *Koomesh J* 2012; 13: 362-367. (Persian).
- [17] Brey RN. Molecular basis for improved anthrax vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 1266-1292. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.028> PMID:15935874
- [18] Bell M. DNA vaccine protects against anthrax. *Am Soc Microbiol Biodefense Res Meet Baltimore*. 2004.
- [19] McComb RC, Martchenko M. Neutralizing antibody and functional mapping of *Bacillus anthracis* protective antigen-the first step toward a rationally designed anthrax vaccine. *Vaccine* 2016; 34: 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.11.025> PMID:26611201
- [20] Baillie LW, Huwar TB, Moore S, Mellado-Sanchez G, Rodriguez L, Neeson BN, Altmann DM. An anthrax subunit vaccine candidate based on protective regions of *Bacillus anthracis* protective antigen and lethal factor. *Vaccine* 2010; 28: 6740-6748. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.075> PMID:20691267 PMCID:PMC3008506
- [21] Makam SS, Kingston JJ, Harischandra MS, Batra HV. Protective antigen and extractable antigen 1 based chimeric protein confers protection against *Bacillus anthracis* in mouse model. *Mol Immunol* 2014; 59: 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.01.012> PMID:24513572
- [22] Rezaee M, Honari H, Kooshk MR. Cloning, expression and purification of binding domains of lethal factor and protective antigen of *Bacillus anthracis* in *Escherichia coli* and evaluation of their related murine antibody. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 2445-2452. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3099-4> PMID:24430302

Antibody titers of PEG-PLA block copolymer nanosphere containing chimeric recombinant protein of protective antigen and lethal factor of *Bacillus anthracis*

Hossein Honari (Ph.D)*, Mohammadebrahim Minaei (Ph.D), Hossein Mirhaj (Ph.D), Seyyed Masih Etemad- Ayoubi (Ph.D)

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

* Corresponding author. +98 21 77105122 Honari.hosein@gmail.com

Received: 24 Apr 2020; Accepted: 7 Dec 2020

Introduction: To date, many vaccines have been developed for anthrax but not yet an ideal vaccine. In this study, chimeric protein containing domain 1 lethal factor and domain 4 protective antigens of *Bacillus anthracis* in copolymer nanocapsules were used to solve the problems caused by existing vaccines and to increase the efficiency of the proposed vaccine.

Materials and Methods: In this experimental study, dual solvent evaporation method was used to produce nanocapsules containing chimeric recombinant protein of protective antigen and lethal factor of *Bacillus anthracis*. Zeta potential of nanoparticles, nanoparticle loading efficiency, recombinant protein release pattern, potential effect of poly (lactic acid)- poly (ethylene glycol) nanoparticle (PLA-PEG) production on the viability of recombinant proteins were investigated. Mice were used as test and control samples for antibody production and immune response evaluation.

Results: The mean antibody titer produced against chimeric proteins loading was significantly different from that of free antigens. Correspondingly, the difference in antibody titer was significant between the groups of one and two times' injection of loading and free antigens and the most antibody titer was related to two times injections of loading antigens. In addition, there was a significant difference between one times injection of loading and the free antigens. This suggests that the loading chimeric antigen on PLA-PEG nanoparticles and one time injection (instead of four times injections) could produce more antibodies.

Conclusion: The results of this study showed that the domain 4 protective antigens and the domain 1 lethal factor of *Bacillus anthracis* could chimeric with each other and produced the active antigen. This chimeric antigen (LFD1-PA4) is active and able to inducing the animal's immune system. In addition, nanocarriers containing controlled release antigens can induce the immune system of the animal.

Keywords: Recombinant Fusion Proteins, Bacterial Antigens, *Bacillus Anthracis*, Vaccine, Anthrax