

تهیه و ارزیابی ویژگی های نانوذرات پلی لاکتیک-کو- گلیکولیک اسید حامل داروی Linrodostat mesylate تزئین شده با آنتی بادی مونوکلونال PDL-1

سمیه احمدی افشار¹، نوروز دلیرز^{2*}، ساناز شیخ زاده³، رحیم حب نقی⁴، یوهان گارسن⁵

1. دانشجوی دکترای ایمنی شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
2. استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)
3. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
4. دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
5. استاد، گروه ایمونوفارماکولوژی، دانشگاه اوترخت، اوترخت، هلند

نویسنده مسئول:

تلفن: 04432779552، کد پستی: 571531177، صندوق پستی: 165

Email: n.delirez@urmia.ac.ir

پذیرش: 1402/4/21

دریافت: 1401/11/21

چکیده

نانوتکنولوژی اثر مهمی خود بر ریزمحیط تومور را به طور عمده از راه تعدیل سازوکار سرکوب ایمنی و نیز خواص پاسخ ایمنی ضدتوموری نشان می دهد. موفقیت در این زمینه تا حد زیادی به خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات ساخته شده بستگی دارد. Linrodostat mesylate دارویی است که باعث کاهش تولید کینورنین از تریپتوفان می شود. تجمع کینورنین باعث اختلال در عملکرد سلول T افکتور و القا سلول های T تنظیمی سرکوب کننده سیستم ایمنی می شود. در نتیجه، این دارو می تواند به عنوان وسیله ای برای کنترل سرکوب سیستم ایمنی به شمار آید. هدف از پژوهش حاضر، تولید نانوذرات نشان دار شده با آنتی بادی مونوکلونال ضد PD-L1 حاوی داروی linrodostat mesylate با خصوصیات مطلوب و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها می باشد.

نانوذرات با استفاده از روش امولسیون دوگانه-تبخیر حلال تهیه شدند. اندازه و مورفولوژی ذرات با استفاده از روش میکروسکوپ FESEM و شاخص پراکندگی یکنواخت و پتانسیل زتای ذرات با روش DLS و نیز رهایش و بازده کپسولاسیون بررسی و ارزیابی شد.

نتایج نشان داد که نانوذرات حاصل پراکندگی یکنواخت، شکل کروی و سطح صاف دارند. شاخص پراکندگی ذرات در گروه نانوذرات حاوی linrodostat mesylate برابر با 0,6 و بعد از اتصال آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1 برابر با 0,24 بود. سایز نانوذرات حاوی linrodostat mesylate، 210,14 نانومتر و بعد از اتصال آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1 حدود 270,35 نانومتر تخمین زده شد. اتصال آنتی بادی مونوکلونال ضد

PDL-1 باعث کاهش در مقدار linrodostat mesylate انکپسوله شده شد. رهاسازی linrodostat mesylate دو فاز دارد که شامل یک فاز اولیه با شیب تند و مرحله بعد یک رهایش آرام و کنترل شده است. نتایج حاصل نشان داد که نانوذرات تولیدی به روش امولسیون دو گانه - تبخیر حلال حاوی داروی linrodostat mesylate تزئین شده با آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1 با خواص فیزیکی شیمیایی بسیار مناسبی برای استفاده به عنوان درمان ایمونوتراپی است.

واژه‌های کلیدی: ایمونوتراپی، سرطان، نانوذرات، linrodostat mesylate، PDL-1.

1- مقدمه

در حالی که در بیشتر بیماران سرطانی، تومور در مراحل اولیه با استفاده از ترکیبی از روش‌های متداول درمان سرطان از جمله جراحی و شیمی درمانی به طور مؤثر درمان می‌شود، با این حال مسئله متاستازها و بازگشت (عود) بیماری ناشی از سلول‌های بدخیم به جای مانده بعد از درمان، همچنان یک مشکل جدی در بحث درمان سرطان است. از طرفی این روش‌های متداول درمان سرطان علاوه بر تخریب سلول‌های سرطانی باعث تخریب بافت‌های سالم بدن نیز می‌شوند. از این رو باعث عوارض جانبی بسیار و کیفیت پایین زندگی در افراد مبتلا می‌شود. امروزه با توجه به این مشکلات، تمرکز عمده بر ایمونوتراپی به عنوان یک رویکرد درمانی جایگزین و کارآمد برای از بین بردن سلول‌های توموری است، چرا که پاسخ‌های درمانی القاشده در این روش درمانی برخلاف درمان‌های متداول، اختصاصیت و خاطره بر ضد تومور دارند. از این رو ایمونوتراپی می‌تواند پاسخ‌های بادوام بی سابقه‌ای را در بیماران سرطانی پیشرفته ایجاد کند [1:2].

تومور، بافت پیچیده‌ای است که نه تنها از سلول‌های توموری بلکه از سلول‌های استرومایی، سلول‌های التهابی، عروق و ماتریکس‌های خارج سلولی (ECM^1) تشکیل شده است که همه آنها با هم به عنوان ریزمحیط تومور (TME^2) تعریف می‌شوند. TME به طور معمول از

پرایمینگ مؤثر لنفوسیت جلوگیری می‌کند، نفوذ آنها را کاهش می‌دهد و سلول‌های مؤثر نفوذی را سرکوب می‌کند که منجر به شکست میزبان در پس زدن تومورها می‌شود [3:4].

از سویی اهداف جدیدی در ریزمحیط تومور کشف شده است که می‌تواند به هدایت و بهبود اقدام‌های مختلف درمان‌های سرطانی کمک کند، به ویژه ایمونوتراپی که با تقویت پاسخ‌های ایمنی ضد توموری میزبان کار می‌کند [5]. سلول‌های توموری می‌توانند با تحریک گیرنده‌های ایست بازرسی ایمنی³ که در سلول‌های T بیان می‌شود، از تخریب شدن به وسیله سیستم ایمنی جلوگیری و عملکرد لنفوسیت‌های T را مهار کنند. ایست بازرسی‌های ایمنی به مجموعه‌ای از مسیرها اشاره می‌کنند که می‌توانند فعالیت سلول‌های T را به عنوان سیگنال‌های هم بازدارنده یا هم تحریکی تنظیم کنند [6] و باعث محافظت از میزبان در برابر خودایمنی در شرایط عادی می‌شوند [7]. شواهد فزاینده نشان می‌دهد که تومورها از بسیاری از این مسیرها به عنوان سازوکارهای مهم برای فرار از پاسخ‌های ایمنی ضد تومور استفاده می‌کنند [8].

در میان آنها، مهارکننده‌هایی که پروتئین مرگ سلولی برنامه ریزی شده $PD-1^4$ و لیگاند آن، لیگاند PD-1 ($PD-L1$) را هدف قرار می‌دهند، چشمگیرترین اثربخشی را در آزمایش‌های بالینی نشان داده‌اند [9]. $PD-1$ به طور

3 Checkpoint inhibitor

4 -Programmed cell death protein 1

1 -Extracellular matrices

2 -Tumor microenvironment

عمده روی سلول‌های T فعال بیان می‌شود. اگرچه بیان PD-L1 در بافت‌های طبیعی محدود است، اما در برخی از سلول‌های تومور به میزان زیادی افزایش پیدا می‌کند [10]. اتصال PD-1 به PD-L1 باعث افزایش آپوپتوز سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن می‌شود و از این راه از بیماری‌های خودایمنی جلوگیری می‌کند. همچنین می‌تواند از نابودی سلول‌های سرطانی به وسیله سیستم ایمنی جلوگیری کند. نکته مهم این است که PD-L1 در محیط تومور نیز بیان می‌شود و در طیف وسیعی از سلول‌های تومور یافت می‌شود. لنفوسیت‌های نفوذیافته در تومور اغلب PD-1 را بیان می‌کنند و از این راه باعث کاهش پاسخ‌های سلول‌های T، پاسخ‌های ضدتوموری و شکست میزبان در رد تومور می‌شوند [11].

بازدارنده‌های ایست بازرسی ایمنی، آنتی‌بادی‌های مونوکلونالی هستند که با جلوگیری از درگیری این مولکول‌های ایست بازرسی، از سرکوب سیستم ایمنی جلوگیری می‌کنند. در نتیجه، باعث تقویت دوباره پاسخ ایمنی ضدتومور می‌شوند [12]. ایمونوتراپی سرطان با هدایت بازدارنده‌های ایست بازرسی ایمنی، اثربخشی طولانی‌مدت چشمگیری را در بیماران مبتلا به انواع سرطان نشان داده است [13].

مشابه PD-L1، بیان IDO1 نیز در محیط تومور به عنوان یک سازوکار جبرانی قوی که به مقاومت در برابر ایمنی ضدتومور کمک می‌کند، افزایش پیدا می‌کند و با بیماری پیشرفته و نتیجه بالینی ضعیف همراه است [14]. IDO1 آنزیم کلیدی و محدودکننده است که باعث کاتابولیسم تریپتوفان به کاتابولیت‌هایی از جمله کینورنین⁵ می‌شود. کاتابولیسم تریپتوفان به عنوان سازوکار قدرتمند تحمل ایمنی ذاتی و تطبیقی ثابت شده است که باعث جلوگیری از خودایمنی یا ایمونوپاتولوژی می‌شود. تخلیه موضعی تریپتوفان و تبدیل آن به کینورنین منجر به ایجاد

یک ریزمحیطی می‌شود که به طور عمیقی سرکوب‌کننده سیستم ایمنی است. به طور همزمان، کاهش تریپتوفان و تجمع کینورنین به ترتیب باعث القای آپوپتوز و اختلال در عملکرد سلول T افکتور و القا سلول‌های T تنظیمی سرکوب‌کننده سیستم ایمنی می‌شود. مشابه سایر ایست‌های بازرسی ایمنی، پیشنهاد می‌شود IDO1 اهداف مهمی برای مداخله ایمنی درمانی باشند. این امر با افزایش تلاش‌های گذشته برای مهار مسیر تریپتوفان به کینورنین به عنوان وسیله‌ای برای کنترل سرکوب سیستم ایمنی نشان داده شده است [15]. یکی از مهارکننده‌های قوی IDO1، Linrodostat mesylate است که باعث کاهش تولید کینورنین از تریپتوفان می‌شود [16].

با وجود تمام نکته‌های گفته‌شده از آنجایی که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مانند PDL-1 جزء داروهای گران‌قیمت می‌باشند و از سویی متأسفانه این آنتی‌بادی‌ها معایبی مانند حذف سریع دارند که منجر به نیمه عمر کوتاه و دوز بی‌اثر می‌شود. در نتیجه، می‌توان با فرموله کردن آنها در نانوذرات، معایب عمده آنها را به کمترین اندازه رساند چرا که با این کار دوز کمتری از آنتی‌بادی استفاده شده از تجزیه آنها به وسیله آنزیم‌ها در داخل بدن جلوگیری می‌شود [17]. به طور کلی کاربرد اصلی نانوتکنولوژی در تومورشناسی برای دارورسانی است. پژوهش‌های زیادی گواهی دارد نانوتکنولوژی با موفقیت برای طراحی سیستم‌های بسیاری استفاده می‌شود. از جمله مواردی مانند بهبود فارماکوکینتیک یک دارو و سمیت‌های مرتبط که کم شده‌اند. این سیستم‌ها عوارض جانبی داروها را محدود کرده و شانس سلامت بیمار افزایش پیدا می‌کند. همچنین به درمان‌ها اجازه می‌دهند که انتخابی‌تر باشند. به این ترتیب ارسال داروها به بافت‌های توموری خاص با دقت بیشتری انجام می‌شود. این روش‌ها شامل توسعه حامل‌هایی در اندازه نانو است که دارو را به هدف خود می‌رساند [18]. از مزایای دیگر

استفاده از نانوذرات برای دارورسانی این است که دارو را به سلول‌های دقیق شناسایی شده یا حتی مکان‌های درون سلولی تحویل می‌دهد بنابراین باعث کاهش در معرض سیستمیک قرارگرفتن داروی سیتوتوکسیک و کاهش عوارض جانبی دارو می‌شود [19]. مهارکننده‌های IDO در مصرف خوراکی با دوز بالا به بیمار خوراند می‌شوند که این موجب بروز یک سری عوارض جانبی مانند کم‌خونی، هیپرگلیسمی، عفونت و حالت تهوع در بیماران می‌شود. فرموله کردن این دارو در نانوذرات به دلیل استفاده از دوز پایین دارو می‌تواند بیماران را از عوارض جانبی دارو در امان نگاه دارد [20].

پیشرفت‌های پیشین در سیستم‌های نانوذرات برای ایمونوتراپی سرطان، گروه‌های متنوعی از سیستم تحویل را با کارکردهای سلولی و بیولوژیکی تعریف شده فراهم کرده است [21] که از میان این سیستم‌های تحویل، نانوذرات PLGA⁶ به علت دارابودن یک مجموعه خصوصیتی همانند زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری و حفاظت دارو از تخریب به وسیله آنزیم‌های پروتئولیتیک، رهایش مداوم و پایدار و از همه مهم‌تر دارابودن تأییدیه سازمان غذا و دارو و اداره پزشکی اروپا در سیستم‌های تحویل دارو به روش تزریقی، حامل‌های کارایی برای تحویل نانوذرات می‌باشند. سیستم تحویل برپایه نانوذرات یک روش امیدوارکننده برای افزایش کارایی تحویل آنتی‌ژن در ایمونوتراپی سرطان محسوب می‌شود و کارایی ایمونوتراپی را توسعه می‌دهد [22].

بالاین حال استفاده از نانوذرات PLGA به عنوان حامل آنتی‌ژن‌های توموری کمتر مطالعه شده است. روش امولسیون دوگانه - تبخیر حلال از معمول‌ترین روش‌ها برای تهیه نانوذرات داروهای محلول در آب مانند پپتیدها، پروتئین‌ها و واکسن‌ها مناسب می‌باشد [22].

با توجه به تأثیر ریزمحیط اطراف تومور بر سیستم ایمنی برای اولین بار در این پژوهش بر آن شدیم تا با طراحی نانوذرات PLGA نشان‌دار شده با آنتی بادی منوکلونال ضد PD-L1 حاوی مهارکننده آنزیم IDO (linrodostat mesylate) بتوان به صورت هدف‌دار این داروها را همزمان به سلول‌های توموری و سلول‌های نفوذپیدا کرده در محیط تومور تحویل داد. لازم به ذکر است که داروی Linrodostat mesylate تاکنون در هیچ مطالعه‌ای به صورت نانوذره بر ضد سرطان استفاده نشده است. اما برای اینکه تأثیر این نانوذرات به صورت مطلوبی القا شود، نیازمند فرمولاسیون مناسب این نانوذرات تزریقی است که از پارامترهای بسیار مهم برای فرمولاسیون نانوذرات، تولید نانوذرات با اندازه مطلوب و توزیع اندازه یکنواخت و همچنین کارایی انکپسولاسیون بالا و رهایش پیوسته می‌باشد. چرا که اندازه ذرات می‌تواند به طور مستقیم بر ثبات فیزیکی، جذب سلولی، انتشار بیولوژیکی نانوذرات و انتشار دارو از نانوذرات در داخل بدن تأثیر بگذارد. بنابراین، در این مطالعه سعی شده است تا برآماده‌سازی نانوذرات و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها از جمله اندازه، مورفولوژی ذرات، شاخص پراکندگی یکنواخت، رهایش و نیز بازده کپسولاسیون تمرکز شود در مطالعه بعدی به ارزیابی آثار درمانی این نانوذرات پرداخته شود.

2- روش کار

1-2 سنتز نانوذرات PLGA

در این مطالعه برای سنتز نانوذرات PLGA از روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال آب/روغن/آب (W1/O/W2) که به وسیله شیخ زاده و همکاران توضیح داده شد، استفاده شده است. این روش یکی از معمول‌ترین روش‌های ساخت نانوذرات به شمار می‌رود. نتیجه این روش (امولسیفیکاسیون یک محلول آلی پلیمری و یک محلول آبی) تشکیل پلیمرها به صورت قطره‌های

6 -Lactic-co-glycolic acid

کوچک است که در نهایت بعد از خشک شدن به صورت نانو ذرات جامد در می آیند.

به طور خلاصه در آغاز 1 میلی گرم داروی linrodostat mesylate به محلول PLGA حاوی 50 میلی گرم PLGA در 1 میلی لیتر دی کلرومتان⁷ (فاز آلی) اضافه شد. سپس سه بار به مدت 10 ثانیه روی یخ با دامنه 38 درصد فراصوت با دستگاه اولتراسوند سونیکه شد تا امولسیون آب در روغن (W/O) اولیه به دست آید. در مرحله بعد امولسیون حاصل به محلول 4 درصد پلی وینیل الکل (PVA)⁸ که فاز آبی دوم در این روش ساخت نانوذرات می باشد، اضافه شد. سپس به مدت 60 ثانیه دوباره به وسیله دستگاه اولتراسوند سونیکه شد. امولسیون حاصل (امولسیون ثانویه) به محلول PVA رقیق (0,1 درصد) اضافه شد و پس از آن به منظور تبخیر دی کلرومتان به مدت 5 ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد. پس از تبخیر دی کلرومتان، محلول حاصل در سرعت 20000 به مدت 40 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد برای رسوب نانوذرات سانتریفیوژ شد. سپس این رسوب نانوذرات به وسیله آب دیونیزه سه بار پیاپی شستشو شدند [23,24].

محلول 10 میلی گرم EDC¹⁰ اضافه شد و دوباره به مدت نیم ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد. در مرحله بعد 10 میلی گرم sulfo-NHS¹¹ اضافه شد و سوسپانسیون به مدت 2/5 ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد. بعد از گذشت این زمان محلول حاصل در سرعت 20000g به مدت نیم ساعت در دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. بعد از این مرحله با PBS شستشو انجام شد. رسوب نهایی در 950 میکرولیتر PBS (Phosphate Buffered Saline) حل شد و به آن 50 میکرولیتر آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1 (0,6 mg/ml) اضافه شد. محلول نهایی 4 تا 5 ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد و تا زمان انجام آزمایشها در دمای منفی 20 درجه سانتی گراد نگهداری شد.

3-2 خصوصیات فیزیکوشیمیایی NPs

ویژگی های نانوذرات تزئین شده با آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1 از نظر توزیع اندازه، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و مورفولوژی نانوذرات با استفاده از دستگاه های DLS و FESEM مطالعه شد [25: 26].

4-2 خصوصیات فیزیکوشیمیایی NPs

1-4-2 تعیین ساختار سه بعدی و ریخت شناسی نانوذرات

از FESEM (Nisshin EM. Co. Ltd., Tokyo, Japan) برای تعیین ساختار سه بعدی و مورفولوژی نانوذرات ساخته شده در این مطالعه استفاده شد.

2-4-2 تعیین اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا نانوذرات

2-2 اتصال آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1 به سطح نانوذرات PLGA

اتصال آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1 به سطح PLGA-NPs با استفاده از روشی که شیخ زاده و همکاران انجام دادند، انجام شد [25]. به طور خلاصه، رسوب نانوذرات PLGA حاصل در 10 میلی لیتر بافر MES⁹، PH:5 (0,1 مولار) حل شد و به مدت نیم ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس به این

10 -1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide
11 -Sulfo-N-hydroxysuccinimide

7 -Dichloromethane
8 -Polyvinyl alcohol
9 -2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

سوسپانسیون شدند. در فاصله‌های زمانی مشخص 2 میلی‌لیتر از نمونه برداشته شد و با بافر فسفات (PH:6.5) (27,28) تازه جایگزین شد. مقدار داروی آزادشده از نانوذرات به وسیله طیف‌سنجی UV-vis در طول موج‌های مشخصه آنها ارزیابی شد.

4- ارزیابی میزان اتصال آنتی‌بادی

از مایع رویی به دست آمده بعد از انکوباسیون نانوذرات با آنتی‌بادی برای سنجش میزان آنتی‌بادی متصل نشده استفاده شد. 5 میکرولیتر از مایع رویی با 25 میکرولیتر محلول A کیت Bio-Rad (محلول تارتارات مس قلیایی) ترکیب و وورتکس شد و سپس 200 میکرولیتر محلول B (معرف فولین رقیق) اضافه و در یک پلیت ته صاف به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. سپس با دستگاه نانودراپ میزان پروتئین موجود در مایع رویی از راه رسم منحنی استاندارد و OD به دست آمده از نمونه‌ها محاسبه شد.

5- آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA، نرم افزار SPSS، نسخه 24) و آزمون Tukey استفاده شد. تمامی داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش و حد معنادار بودن $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. تمامی تست‌ها سه بار تکرار شدند.

3- نتایج

3-1 بررسی اندازه و شاخص پراکندگی نانوذرات

به وسیله دستگاه DLS

سایز و شاخص پراکندگی نانوذرات تولیدی حاوی linrodostat mesylate تنها و نانوذرات حاوی هر دو linrodostat mesylate و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 به وسیله دستگاه DLS آنالیز شد. مشاهده شد که نانوذرات پراکندگی یکنواخت دارند. در گروه نانوذرات حاوی

اندازه، شاخص پراکندگی (PDI) و پتانسیل زتا (ZP) نانوذرات به وسیله ¹²DLS (Malvern Zetasizer, ZS, DLS Malvern, UK) تعیین شد. تمام اندازه‌گیری‌ها با سه بار تکرار ($n=3$) و در دمای اتاق انجام شد. نتایج نیز به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد.

اندازه‌گیری حرکت براونی ذرات در این روش با استفاده از تابش پرتوهای نور مرئی از یک منبع نور از جنس نئون هلیوم با طول موج 633 نانومتر و تجزیه و تحلیل نوسان‌های شدت نور متفرق شده در اثر برخورد پرتوهای نور با ذرات به دست آمد.

2-3-4-2 تعیین کارایی انکپسولاسیون

محتوای داروی linrodostat mesylate کپسوله شده در نانوذرات با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، 10 میلی گرم از داروی لودشده در نانوذره در 1 میلی لیتر دی کلرومتان و 2 میلی لیتر بافر فسفات (PH:6.5) [27؛ 28] حل شد. محلول در 10000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی جمع‌آوری شد. جذب در 265 نانومتر در یک اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-1700) برای تعیین محتوای دارو از یک نمودار استاندارد قرائت شد [29].

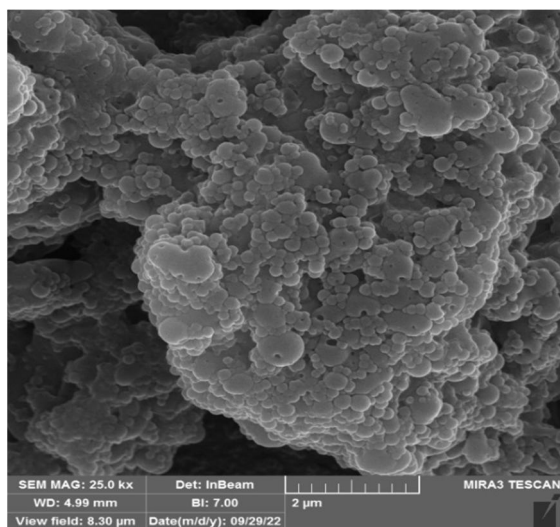
$$= \frac{\text{مقدار دارو انکپسوله شده}}{\text{مقدار دارو استفاده شده در تهیه نانوذرات}}$$

کارایی انکپسولاسیون 100

3-3 کینتیک رهایش دارو

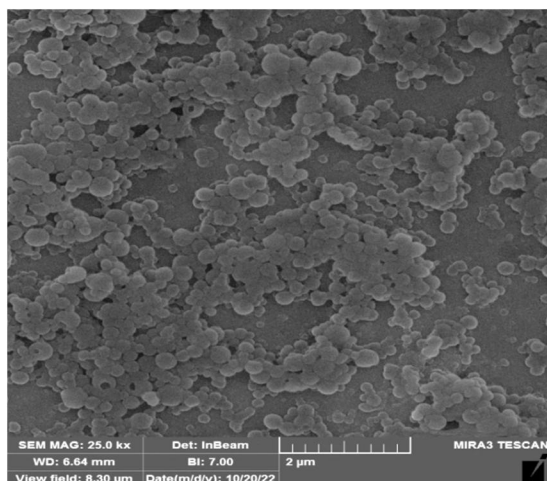
آزادسازی داروها از نانوذرات با استفاده از روش کیسه دیالیز تعیین شد [30]. نانوذرات حاوی دارو در کیسه دیالیز اضافه شد و در بافر فسفات 25 میلی لیتری (0,1 مولار) در یک ژاکت رهاسازی در دمای 37 درجه سانتی گراد در 100 rpm در داخل یک انکوباتور متحرک

می‌شود، تمامی ذرات کروی شکل با سطحی صاف بودند. با استفاده از نرم افزار Image J سایز ذرات ایدئال برای نانوذرات لودشده با linrodostat mesylate 210.14 نانومتر تخمین زده شد و بعد از اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 به نانوذرات سایز نانوذرات افزایش پیدا کرد و حدود 270.35 نانومتر تخمین زده شد.



شکل 3 نانوذرات حاوی linrodostat mesylate قبل از

اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1

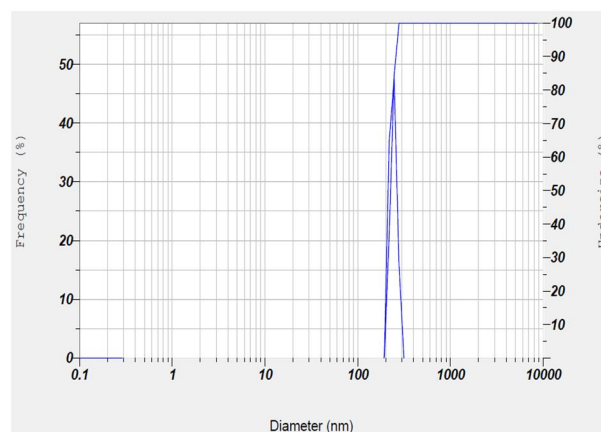


شکل 4 نانوذرات حاوی linrodostat mesylate بعد از

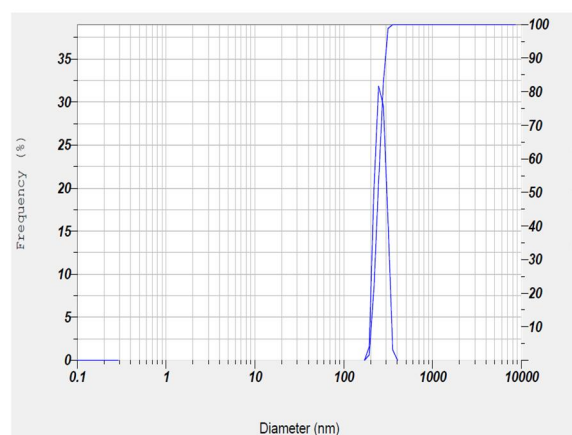
اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1

3-3 بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات تولیدی

linrodostat mesylate شاخص پراکندگی ذرات برابر با 0,06 (شکل 1) و در گروه نانوذرات حاوی linrodostat mesylate تزئین شده با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 برابر با 0,24 است (شکل 2) که نشان دهنده یکنواختی مناسب اندازه نانوذرات تولیدشده در هر دو گروه می‌باشد.



شکل 1 شاخص پراکندگی نانوذرات حاوی linrodostat mesylate قبل از اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1



شکل 1 شاخص پراکندگی نانوذرات حاوی linrodostat mesylate بعد از اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1

2-3 بررسی مورفولوژی و اندازه نانوذرات

تظاهرات مورفولوژیکی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) بررسی شد. همان‌طور که در شکل‌های 3 و 4 مشاهده

سایز نانوذرات تولیدی 236.9 ± 7.4 nm به دست آمد که بعد از اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 به 301.75 ± 2.6 nm افزایش پیدا کرد. شاخص پراکندگی ذرات (PDI)، نشان‌دهنده یکنواختی اندازه ذرات است که بین محدوده 0 (تک‌پراکنده) تا 1 (بسیار پراکنده) می‌باشد. هرچه عدد به‌دست‌آمده به 0 نزدیک‌تر باشد، نشان‌دهنده توزیع یکنواخت ذرات تولیدی است. همان‌طور که در جدول 1 مشاهده می‌شود PDI نانوذرات تولیدی حدود 0.06 ± 0.07 می‌باشد که نشان‌دهنده توزیع بسیار یکنواخت ذرات می‌باشد بعد از اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1، شاخص پراکندگی ذرات کمی افزایش یافت

(0.2 ± 0.24) اما همچنان در محدوده زیر 1 بود که نشان‌دهنده توزیع یکنواخت ذرات می‌باشد. بار سطحی ذرات (پتانسیل زتا) نانوذرات تولیدی حدود 10.4 ± 1.7 -mv است که بعد از اتصال PDL-1 به 8.1 ± 1.3 -mv تغییر کرد که از نظر آماری معنادار نبود ($p < 0/05$). اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 باعث کاهش در مقدار linrodostat mesylate انکپسوله‌شده شد. این کاهش را می‌توان به انتشار مقداری از linrodostat mesylate لودشده درون نانوذرات در فرایند اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 به نانوذرات که در محیط آبی انجام می‌شود، نسبت داد.

نوع نانوذرات	قطر متوسط ذرات (nm)	شاخص پراکندگی ذرات	پتانسیل زتا (mV)	کارایی انکپسولاسیون (%)	مقدار linrodostat mesylate لودشده به ازای هر میلی‌گرم نانوذره (ug/mg)	مقدار آنتی‌بادی متصل‌شده به ازای هر میلی‌گرم نانوذره (ug/mg)
LD-NP	236.9 ± 7.4^A	0.06 ± 0.07^A	-10.4 ± 1.7^A	85.1 ± 0.6^A	13.6 ± 0.4^A	-
LD-PDL1- NP	301.75 ± 2.6^B	0.24 ± 0.2^B	-8.1 ± 1.3^A	74.12 ± 1.4^B	11.8 ± 1.3^A	27.21 ± 0.3

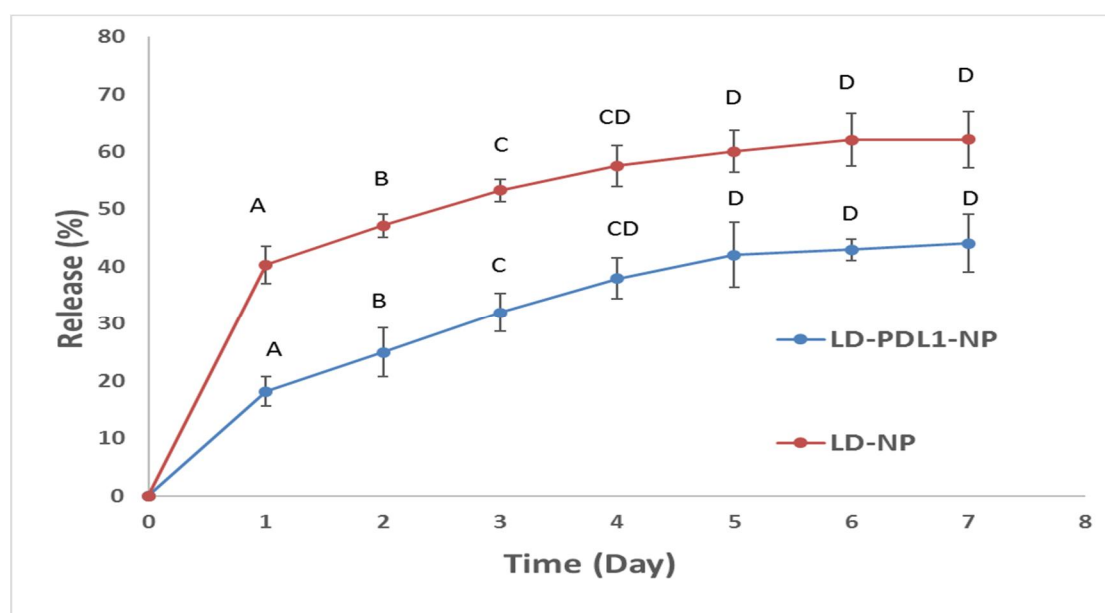
جدول 1 خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات ساخته‌شده، حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده معناداری در سطح ($p < 0/05$) است.

3-4 کینتیک رهایش دارو

برای تخمین مقدار رهایش دارو از نانوکپسول‌های PLGA مقدار آزادسازی در بازه زمانی هفت‌روزه درون بافر فسفات (PH:6.5) (27,28) اندازه‌گیری شد. رهاسازی linrodostat mesylate براساس نمودار 1 دوفازی بوده و یک فاز اولیه با شیب تند و مرحله بعد یک رهایش آرام و کنترل‌شده دارد.

پوشش این نانوذرات با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 منجر به نمایش یک پروفایل رهایش سه‌فازی در

شرایط آزمایشگاهی شد. به‌طور کلی می‌توان گفت پوشش نانوذرات با آنتی‌بادی منجر به تحویل دارو براساس یک پروفایل سه‌فازی می‌شود که مرحله اول به نام «رهاسازی انفجاری» به دنبال آن مرحله انتشار دوم که با فرایند سوم به نام مرحله فرسایش پایان می‌کند و می‌توان گفت که این روش می‌تواند تحویل و رهایش ماده لودشده را بهینه کند (شکل 5).



شکل 5 نمودار کینتیک رهائش دارو، حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده معناداری در سطح ($p < 0/05$) می‌باشد.

4- بحث

به‌رغم پیشرفت‌های گذشته در زمینه ایمونوتراپی، وجود مقاومت در برابر این روش درمانی کماکان یکی از چالش‌های اساسی می‌باشد. قرارگیری تومورها در ریزمحیطی پویا منجر به ایجاد مقاومت چندوجهی در برابر ایمونوتراپی می‌شود. ریزمحیط تومور، محیطی متشکل از سلول‌های بدخیم، اجزای ایمنی، رگ‌های خونی، ماتریکس خارج‌سلولی و مولکول‌های سیگنال‌دهنده است که به‌صورت جداگانه و ترکیبی بر حساسیت به ایمونوتراپی تأثیر می‌گذارند [31؛ 32]. بنابراین براساس با مطالعه موریانو-گروف و همکاران (2020) ما در ایمونوتراپی با دو رویکرد کلی روبه‌رو هستیم که شامل رویکرد مستقیم و غیرمستقیم است. رویکردهای مستقیم در درجه اول خود تومور را اصلاح می‌کنند درحالی‌که رویکردهای غیرمستقیم به‌طور عمده بر روی ریزمحیط عمل می‌کنند. این دو دسته از رویکردها به‌طور جدایی ناپذیری به هم مرتبط هستند و اعتقاد بر این است که ترکیب‌های منطقی این دو رویکرد و هدف‌گیری ریزمحیط تومور به همراه سلول درمانی، نسل

بعدی رویکردهای مبتنی بر ایمنی برای درمان سرطان را شامل می‌شود [31]. با توجه به این موضوع، در مطالعه حاضر توجه ویژه‌ای بر ریزمحیط اطراف تومور شده است. نانوذرات طراحی شده در این پژوهش حاوی داروی linrodostat mesylate و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 است و براساس نکات ذکرشده [31] پیش‌بینی می‌شود در صورت استفاده به‌تنهایی و یا همراه با نانوذراتی که سلول‌های سیستم ایمنی را در خون فعال می‌کنند، بتوان ریزمحیط را بر ضد تومور تغییر داد و اثر سینرژیستی با سایر روش‌های ایمونوتراپی ایجاد کرد. برای موفقیت در هر دو رویکرد ایمونوتراپی، لازم است که نانوذرات موردنظر به سلول‌های هدف در مکان و مقدار مناسب ارائه شود. به بیانی دیگر، موفقیت ایمونوتراپی نه‌تنها به ماهیت داروهای استفاده‌شده بلکه به سیستم تحویل نیز بستگی دارد. در همین راستا، امروزه از نانوذرات با خصوصیات فیزیکی و بیوشیمیایی تعریف‌شده به‌عنوان یک رویکرد قابل قبول از سیستم‌های تحویل دارو استفاده می‌کنند [33]. در این باره گزارش شده است که ایمونوتراپی برپایه نانوذرات PLGA می‌تواند انتشار پایدار

آنتی‌ژن را فراهم کند که برای القای پاسخ‌های ایمنی قوی بسیار مهم است [22].

عوامل مختلفی می‌توانند در کمیت و کیفیت ایمونوترایی برپایه نانوذرات تأثیر بگذارند که در این میان خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات از قبیل اندازه، شکل، روش‌های بارگذاری آنتی‌ژن و خواص سطحی (برای مثال بار سطحی) نقش مهمی در مسیر انتقال آنها برای تحویل به محل‌های تومور ایفا می‌کنند [34]. با توجه به این موضوع، دو هدف اصلی در این پژوهش شامل (الف) تهیه و ارزیابی خصوصیات نانوذرات حاوی داروی *linrodostat mesylate* و (ب) تزئین نانوذرات تولیدی با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 و ارزیابی خصوصیات نانوذرات بعد از اتصال آنتی‌بادی مورد توجه بودند. هدف اول با تولید نانوذرات PLGA به روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات حاصل به دست آمد که نتیجه این مرحله، تولید نانوذرات با میانگین اندازه 236.9 ± 7.4 nm، توزیع یکنواخت با سطوح کروی و صاف، کارایی انکپسولاسیون مناسب و یک الگوی رهایش آرام و پایدار بود. همچنین، هدف دوم با اتصال شیمیایی (کوالان) آنتی‌بادی به سطح نانوذرات تولیدی حاصل شد. نتیجه این مرحله اتصال موفقیت‌آمیز آنتی‌بادی به نانوذرات PLGA بود که نانوذرات با اندازه ذرات مناسب و کارایی انکپسولاسیون 74.12 ± 1.4 درصد به دست آمد. سطح صاف نانوذرات حذف کامل حلال از نانوذرات فرموله‌شده را نشان می‌دهد که این شکل کروی صاف بیانگر کیفیت خوب نانوذرات ساخته‌شده است [35].

در مطالعه حاضر، به‌طور خاص بر اندازه نانوذرات به‌عنوان عامل تقویت‌کننده ایمونوترایی تمرکز شده است. رگ‌های خونی اطراف تومور نشأت‌دار هستند. این ویژگی در عروق تومور منجر به نفوذ و احتباس نانوذرات در بستر تومور می‌شود. اندازه منافذ در عروق تومور بین 380

تا 780 نانومتر گزارش شده است. بنابراین، نانوذرات برای هدف قراردادن تومورها، باید اندازه‌ای کمتر از این میزان داشته باشند [36]. علاوه بر این، اندازه نانوذرات یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تعامل آنها با سلول‌های هدف است، به‌طوری‌که نانوذرات با اندازه بین 20-300 نانومتر به‌طور مؤثری به روش اندوسیتوز یا پینوسیتوز به‌وسیله سلول‌های هدف جذب شده و باعث آسانی القای پاسخ‌های مورد نظر می‌شوند [37]. سیلوا و همکاران در پژوهشی به مقایسه نانوذرت PLGA با اندازه 300 نانومتر و میکروذرات با اندازه 20 میکرومتر در شرایط آزمایشگاهی پرداختند. آنها به این نتیجه رسیدند که نانوذرات نسبت به میکروذرات به‌راحتی به‌وسیله سلول‌های سیستم ایمنی جذب شده و باعث افزایش پاسخ‌های این سلول‌ها می‌شوند [38]. به‌طور کلی می‌توان چنین بیان کرد که برای تمام اهداف عملی مربوط به سیستم‌های تحویل هدفمند، ذرات با اندازه کوچک مؤثرتر از ذرات با اندازه بزرگ در نظر گرفته می‌شوند [39]. این موضوع به این دلیل است که در مقایسه ذرات با اندازه بزرگ، ذرات کوچک در نفوذ به موانع بیولوژیکی، عبور از مویرگ‌ها پس از تزریق و دستیابی به ثبات در گردش خون کارآمدتر هستند. بنابراین در دارورسانی هدفمند، نانوذرات با قطر کمتر ترجیح داده می‌شوند [40].

صرف‌نظر از فرایندی که برای ساختن ذرات استفاده می‌شود، توجه دقیق به عوامل مهم مربوط به فرمولاسیون اهمیت دارد که بر عملکرد ایمونوترایی تأثیر می‌گذارد. کپسوله‌سازی دارو در نانوذرات PLGA نه تنها از تخریب آن در برابر آنزیم‌ها محافظت می‌کنند بلکه آن را به‌صورت هدفمند به سلول‌های موردنظر نیز می‌رسانند [41]. ترکیب فیزیکی و شیمیایی سازه‌های نانوذرات جزء عوامل مهمی است که روی حفاظت مواد محصورشده تأثیر می‌گذارد تا اطمینان حاصل شود که نانوذرات‌ها از انتشار زودهنگام و

تخریب دارو تا زمان رسیدن به سلول هدف جلوگیری می کنند [42].

روش تهیه نانوذرات در این مطالعه امولسیون دوگانه تبخیر حلال انتخاب شد تا اندازه ذرات کوچک و مناسب برداشت به وسیله سلول های هدف باشد. روش آماده سازی امولسیون دوگانه تبخیر حلال منجر به قطر ذراتی در محدوده 150 تا 300 نانومتر می شود [43]. در یک مطالعه مشابه، نانوذرات PLGA حاوی CpG با استفاده از روش تبخیر دوگانه حلال مهندسی شد و اندازه ذرات به دست آمده 200 تا 230 نانومتر گزارش شد که برای جذب ترجیحی سلول های ایمنی مطلوب بود [44]. در مطالعه دیگری گزارش شده است که ذرات با اندازه 500 نانومتر یا کمتر برای جذب به وسیله APC ها بهینه هستند [45].

نکته قابل توجه دیگر این است که اندازه ذرات به شدت وابسته به پارامترهای فرایند تهیه نانوذرات از جمله نوع و غلظت سورفکتانت استفاده شده است [46]. پلی وینیل الکل (PVA) رایج ترین امولسیفایر استفاده شده در فرمولاسیون نانوذرات PLGA است. مقداری از PVA با وجود شستشوی مکرر در ارتباط با نانوذرات باقی می ماند. PVA باقیمانده بر خواص دارویی مختلف نانوذرات مانند اندازه ذرات، پتانسیل زتا، شاخص پراکندگی چندگانه، آب گریزی سطح، بارگیری پروتئین و همچنین بر آزادسازی در شرایط آزمایشگاهی داروی محصور شده تأثیر می گذارد. نکته مهم این است که نانوذرات با مقدار بیشتری از PVA باقیمانده به رغم اندازه ذرات کوچک تر، جذب سلولی به نسبت کمتری داشتند. یکی از پارامترهای مهمی که بر مقدار باقیمانده PVA تأثیر می گذارد، غلظت PVA استفاده شده در امولسیون است [47]. غلظت های PVA استفاده شده در این مطالعه به ترتیب 4 و 0.1 درصد بود. در مطالعه سویدر و همکاران (2018) نانوذرات ساخته شده با 4 درصد PVA

و با اندازه 302 نانومتر پس از فراصوت بودند [48]. سلیم و همکاران (2020) نشان دادند که در صورت استفاده از 1 درصد PVA اندازه ذرات 250 نانومتری بودند در حالی که با 4 درصد PVA قطر نانوذرات کوچک تر و در حدود 150 نانومتر بودند. تفاوت در اندازه بین این فرمول ها شاید به دلیل انرژی سطحی کمتر با PVA در سطح نانوذرات و همچنین افزایش ویسکوزیته در طول تشکیل است که امکان تشکیل ذرات کوچک تر را فراهم می کند [49].

برای دنبال کردن رفتار نانوذرات در محلول آبی، توزیع اندازه و بار سطحی فرمولاسیون نانوذرات با استفاده از اندازه گیری های پراکندگی نور دینامیک (DLS) و پتانسیل زتا تجزیه و تحلیل شد. پتانسیل زتا که به بار سطحی بستگی دارد، برای پایداری نانوذرات در حالت سوسپانسیون مهم است و همچنین عامل اصلی در جذب اولیه نانوذرات بر غشای سلولی است. پس از جذب اولیه، میزان جذب اندوسیتوز به اندازه ذرات بستگی دارد. بنابراین پتانسیل زتا در کنار اندازه ذرات بر تأثیرگذاری نانوذرات تأثیر می گذارد [50]. بزرگی پتانسیل زتا نشانه ای از پایداری بالقوه سیستم کلوئیدی است. اگر همه ذرات معلق پتانسیل زتا منفی یا مثبت زیادی داشته باشند، تمایل به دفع یکدیگر دارند و هیچ تمایلی برای جمع شدن ذرات وجود نخواهد داشت [51]. از آنجایی که بیشتر غشاهای سلولی بار منفی دارند، پتانسیل زتا می تواند بر تمایل نانوذره به نفوذ در غشاها تأثیر بگذارد. نانوذراتی که پتانسیل زتا بیش از 30mV+ یا کمتر از 30mV- دارند، به عنوان یک سیستم تعلیق کلوئیدی پایدار در نظر گرفته می شوند که از تجمع نانوذرات جلوگیری می کند. در مطالعه حاضر نیز پتانسیل زتای نانوذرات تولیدی در این محدوده قرار دارد. در نتیجه از پایداری خوبی برخوردار است [52]. در مطالعه گاوند و همکاران نشان داده شده است که نانوذرات PLGA بدون سورفکتانت، پتانسیل

زتا منفی (-49 mV) را به دلیل وجود گروه‌های کربوکسیلیک انتهایی در PLGA نشان می‌دهند [53]. در مطالعه دیگر که به وسیله سلیم و همکاران (2020) انجام شد، نشان داده شد که پس از تبخیر حلال، اندازه ذرات به 141 nm نانومتر کاهش پیدا کرد و پتانسیل زتا خنثی باقی ماند ($-1,7$ میلی‌ولت) [49]. همین‌طور در مطالعه مارسلین و همکاران (2015) میانگین قطر نانوذرات بین 250 تا 300 نانومتر با شاخص پراکندگی $0,20$ بود [30]. در مطالعه فیفیس و همکاران اندازه نانوذرات تشکیل‌شده 232 نانومتر با شاخص پراکندگی $0,384$ گزارش شد که مشابه با مطالعه حاضر با استفاده از DLS اندازه‌گیری شد [54]. نتایج حاصل در بررسی حاضر نزدیک به مطالعات ذکرشده برابر با $301,75 \pm 2,6$ نانومتر و شاخص پراکندگی نانوذرات $0,24 \pm 0,2$ به دست آمد، از آنجایی‌که در مطالعه فیفیس و همکاران نشان داده شد که ذرات 232 نانومتری با شاخص پراکندگی $0,384$ قوی‌ترین پاسخ ایمنی را القا کرده‌اند، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات ساخته‌شده مطالعه حاضر از خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوبی برخوردار است.

رفتار رهاسازی دارو یک عامل مهم برای کاربرد نانوذرات پلیمری است که به‌طور مستقیم با پایداری دارو و نتایج درمانی و همچنین توسعه فرمولاسیون مرتبط است. در بیشتر موارد، رهاسازی سریع دارو از نانوذرات پلیمری به نام «رهاسازی انفجاری» در آغاز قابل مشاهده است. در مورد نانوذرات پلیمری، دارو به‌طور یکنواخت در ماتریکس نانوذرات توزیع/حل می‌شود و رهاسازی با انتشار یا فرسایش ماتریکس اتفاق می‌افتد. گزارش شده است که پروفایل آزادسازی داروها از نانوذرات پلیمری به ماهیت سیستم تحویل بستگی دارد. از آنجایی‌که آب‌دوستی نانوذرات PLGA نفوذ گسترده آب را به ماتریکس پلیمری امکان‌پذیر می‌کند، مقدار چشمگیری از دارو در روزهای اولیه انکوباسیون در بافر آبی رها

می‌شود. انفجار اولیه با افزایش تدریجی دنبال می‌شود و در روز 10 به 70 درصد می‌رسد که نشان‌دهنده یک فاز انتشار پایدار است [30]. براساس مطالعه حاضر رهاسازی linrodostat mesylate دوفازی است و یک فاز اولیه با شیب تند و مرحله بعد یک رهایش آرام و کنترل‌شده دارد. در مطالعه دیگرس نشان داده شد که آزادسازی داروی imatinib mesylate از نانوذرات به‌صورت دوفازی با فاز انفجار اولیه (40 درصد) و سپس فاز انتشار کندتر (60 درصد) کنترل‌شده با انتشار مشابه با مطالعه حاضر رخ داد [29]. انفجار اولیه را می‌توان به چسبندگی مولکول‌های دارو به سطح نانوذره نسبت داد. در مطالعه دیگر کینتیک آزادسازی آزمایشگاهی مشابه نانوذرات پلی‌اتیلن گلیکول-PLGA بارگذاری‌شده با فلورسئین ایزوتیوسیانات، تقریباً 40 درصد در روز 1 و انتشار پایدار در 28 روز آینده پیش‌تر نشان داده شده است [55].

نتایج حاصل نشان داد که ایمونوترابی مبتنی بر نانوذرات تولیدی به روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال حاوی داروی linrodostat mesylate و تزئین‌شده با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 به روش شیمیایی (کووالانسی) با خواص فیزیکوشیمیایی بسیار مناسبی برای استفاده جهت ایمونوترابی است و این دو روش به‌عنوان روش‌های مناسب برای تولید نانوذرات و اتصال سایر آنتی‌بادی‌ها و پروتئین‌ها به نانوذرات تولیدی پیشنهاد می‌شود. درنهایت می‌توان استفاده از این نانوذرات ساخته‌شده به‌صورت درون‌تن برای تحریک پاسخ‌های ایمنی ضدتومور در داخل ریزمحیط تومور به‌تنهایی یا به همراه سایر روش‌های ایمونوترابی محرک سلول‌های ایمنی برای انجام به سایر پژوهشگران پیشنهاد داد.

منابع

[1] Adusumilli PS, Cha E, Cornfeld M, Davis T, Diab A, Dubensky TW, et al. New Cancer Immunotherapy Agents in Development: A report from an associated program of the 31st Annual

J Exp Med. 2013;210(7):1389–402.

[15] Zhai L, Lauing KL, Chang AL, Dey M, Qian J, Cheng Y, et al. The role of IDO in brain tumor immunotherapy. J Neurooncol. 2015;123(3):395–403.

[16] Sonpavde G, Necchi A, Gupta S, Steinberg GD, Gschwend JE, Van Der Heijden MS, et al. ENERGIZE: A Phase III study of neoadjuvant chemotherapy alone or with nivolumab with/without linrodostat mesylate for muscle-invasive bladder cancer. Futur Oncol. 2019;16(2):4359–68.

[17] Wathoni N, Puluhulawa LE, Joni IM, Muchtaridi M, Mohammed AFA, Elamin KM, et al. Monoclonal antibody as a targeting mediator for nanoparticle targeted delivery system for lung cancer. Drug Deliv. 2022;29(1):2959–70.

[18] Yoo J, Park C, Yi G, Lee D, Koo H. Active targeting strategies using biological ligands for nanoparticle drug delivery systems. Cancers (Basel). 2019;11(5).

[19] Yu B, Tai HC, Xue W, Lee LJ, Lee RJ. Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. Mol Membr Biol. 2010;27(7):286–98.

[20] Le Naour J, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G, Vacchelli E. Trial watch: IDO inhibitors in cancer therapy. Oncoimmunology. 2020;9(1).

[21] Kanekiyo M, Wei CJ, Yassine HM, McTamney PM, Boyington JC, Whittle JRR, et al. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. Nature. 2013;499(7456):102–6.

[22] Alvi M, Yaqoob A, Rehman K, Shoaib SM, Akash MSH. PLGA-based nanoparticles for the treatment of cancer: current strategies and perspectives. AAPS Open. 2022;8(1).

[23] Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. J Control Release. 2003;90(3):261–80.

[24] Sheikhzadeh S, Delirez N, Hobbenaghi R. preparation and characterization of tumor cell lysate and poly-ic loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles and evaluation of their antitumor effects in mouse model of breast cancer. Stud Med Sci. 2018;29(8):584.

[25] Sheikhzadeh S, Delirez N, Hobbenaghi R. Mannosylated polylactic-co-glycolic acid (MN-PLGA) nanoparticles induce potent anti-tumor immunity in murine model of breast cancer. Biomed Pharmacother. 2021;142.

Meeting of the Society for Immunotherapy of Cancer, 2016. J Immunother Cancer. 2017;5(1).

[2] Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. Cell. 2017;168(4):707–23.

[3] Devaud C, John LB, Westwood JA, Darcy PK, Kershaw MH. Immune modulation of the tumor microenvironment for enhancing cancer immunotherapy. Oncoimmunology. 2013;2(8).

[4] Klemm F, Joyce JA. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. Trends Cell Biol. 2015;25(4):198–213.

[5] Pitt JM, Marabelle A, Eggermont A, Soria JC, Kroemer G, Zitvogel L. Targeting the tumor microenvironment: Removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy. Ann Oncol. 2016;27(8):1482–92.

[6] Drew M. Pardoll. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev cancer. 2016;97(11):252–64.

[7] Mohammadi P, Hesari M, Chalabi M, Salari F, Khademi F. An overview of immune checkpoint therapy in autoimmune diseases. Int Immunopharmacol. 2022;107.

[8] D.S. S, A. R. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: What's here, what's next? Curr Opin Immunol. 2015;33.

[9] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. N Engl J Med. 2012;366(26):2443–54.

[10] Zou W, Wolchok JD, Chen L, Weiping Z, Jedd D. W, Lieping C. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy. Sci Transl Med. 2016;8(328):1–34.

[11] Wang J, Yuan R, Song W, Sun J, Liu D, Li Z. PD-1, PD-L1 (B7-H1) and Tumor-Site Immune Modulation Therapy: The Historical Perspective. J Hematol Oncol. 2017;10(1).

[12] Himmel ME, Saibil SD, Saltman AP. Immune checkpoint inhibitors in cancer immunotherapy. Cmaj. 2020;192(24):E651.

[13] Couzin-Frankel J. Cancer immunotherapy. Science (80-). 2013;342(6165):1432–3.

[14] Holmgaard RB, Zamarin D, Munn DH, Wolchok JD, Allison JP. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4.

- [38] Silva AL, Rosalia RA, Varypataki E, Sibuea S, Ossendorp F, Jiskoot W. Poly-(lactic-co-glycolic-acid)-based particulate vaccines: Particle uptake by dendritic cells is a key parameter for immune activation. *Vaccine*. 2015;33(7):847–54.
- [39] Díez-Pascual AM. Surface Engineering of Nanomaterials with Polymers, Biomolecules, and Small Ligands for Nanomedicine. *Materials* (Basel). 2022;15(9).
- [40] Ahmad A, Khan F, Mishra RK, Khan R. Precision Cancer Nanotherapy: Evolving Role of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Active Targeting. *J Med Chem*. 2019;62(23):10475–96.
- [41] Hamdy S, Molavi O, Ma Z, Haddadi A, Alshamsan A, Gobti Z, et al. Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8⁺ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Vaccine*. 2008;26(39):5046–57.
- [42] Hamdy S, Haddadi A, Hung RW, Lavasanifar A. Targeting dendritic cells with nanoparticulate PLGA cancer vaccine formulations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(10–11):943–55.
- [43] Cao J, Choi JS, Oshi MA, Lee J, Hasan N, Kim J, et al. Development of PLGA micro- and nanorods with high capacity of surface ligand conjugation for enhanced targeted delivery. *Asian J Pharm Sci*. 2019;14(1):86–94.
- [44] Joshi VB, Geary SM, Salem AK. Biodegradable particles as vaccine delivery systems: Size matters. *AAPS J*. 2013;15(1):85–94.
- [45] Mathaes R, Winter G, Siahaan TJ, Besheer A, Engert J. Influence of particle size, an elongated particle geometry, and adjuvants on dendritic cell activation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;94:542–9.
- [46] Mohammadi-Samani S, Taghipour B. PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; Problems and approaches. *Pharm Dev Technol*. 2015;20(4):385–93.
- [47] Sahoo SK, Panyam J, Prabha S, Labhasetwar V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J Control Release*. 2002;82(1):105–14.
- [48] Swider E, Koshkina O, Tel J, Cruz LJ, de Vries IJM, Srinivas M. Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomater*. 2018;73:38–51.
- [49] Slimane M, Gaye I, Ghoul M, Chebil L. Mesoscale Modeling and Experimental Study of
- [26] Haddadi A, Hamdy S, Ghotbi Z, Samuel J, Lavasanifar A. Immunoadjuvant activity of the nanoparticles' surface modified with mannan. *Nanotechnology*. 2014;25(35).
- [27] Gatenby RA, Gawlinski ET, Gmitro AF, Kaylor B, Gillies RJ. Acid-mediated tumor invasion: A multidisciplinary study. *Cancer Res*. 2006;66(10):5216–23.
- [28] Chen M, Chen C, Shen Z, Zhang X, Chen Y, Lin F, et al. Extracellular pH is a biomarker enabling detection of breast cancer and liver cancer using CEST MRI. *Oncotarget*. 2017;8(28):45759–67.
- [29] Marslin G, Revina AM, Khandelwal VKM, Balakumar K, Prakash J, Franklin G, et al. Delivery as nanoparticles reduces imatinib mesylate-induced cardiotoxicity and improves anticancer activity. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:3163–70.
- [30] Rathee J, Kaur A, Kanwar R, Kaushik D, Kumar R, Salunke DB, et al. Polymeric Nanoparticles as a Promising Drug Delivery Platform for the Efficacious Delivery of Toll-Like Receptor 7/8 Agonist and IDO-Inhibitor. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2022;632.
- [31] Murciano-Goroff YR, Warner AB, Wolchok JD. The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations. *Cell Res*. 2020;30(6):507–19.
- [32] Kalbasi A, Ribas A. Antigen presentation keeps trending in immunotherapy resistance. *Clin Cancer Res*. 2018;24(14):3239–41.
- [33] Oyewumi MO, Kumar A, Cui Z. Nanomicroparticles as immune adjuvants: Correlating particle sizes and the resultant immune responses. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9(9):1095–107.
- [34] S. S, T.K.S. M, H.A.E. B, Y. C. Pharmaceutical aspects of intranasal delivery of vaccines using particulate systems. *J Pharm Sci*. 2009;98(3):812–43.
- [35] Koyande NP, Srivastava R, Padmakumar A, Rengan AK. Advances in Nanotechnology for Cancer Immunoprevention and Immunotherapy: A Review. *Vaccines*. 2022;10(10).
- [36] Barua S, Mitragotri S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today*. 2014;9(2):223–43.
- [37] Rice-Ficht AC, Arenas-Gamboa AM, Kahl-McDonagh MM, Ficht TA. Polymeric particles in vaccine delivery. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(1):106–12.

L, Davis SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release*. 1999;57(2):171–85.

[54] Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, et al. Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *J Immunol*. 2004;173(5):3148–54.

[55] Kimura S, Egashira K, Nakano K, Iwata E, Miyagawa M, Tsujimoto H, et al. Local delivery of imatinib mesylate (STI571)-incorporated nanoparticle ex vivo suppresses vein graft neointima formation. *Circulation*. 2008;118(14 Suppl).

Quercetin Organization as Nanoparticles in the Poly-lactic- co-glycolic Acid/Water System under Different Conditions. *Ind Eng Chem Res*. 2020;59(10):4809–16.

[50] Rasmussen MK, Pedersen JN, Marie R. Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. *Nat Commun*. 2020;11(1).

[51] Kirby BJ, Hasselbrink EF. Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers. *Electrophoresis*. 2004;25(2):203–13.

[52] Juttulapa M, Piriyaprasarth S, Srimornsak P. Effect of ph on stability of oil-in-water emulsions stabilized by pectin-zein complexes. *Adv Mater Res*. 2013;747:127–30.

[53] Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum

Preparation and characterization of anti PD-L1 monoclonal antibody decorated poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles containing linrodostat mesylate.

Somayeh Ahmadiashar ¹, Nowruz Delirez ^{2 *}, Sanaz Sheikhzadeh ³, Rahim Hobbenaghi ⁴, Garssen Johan ⁵

1 PhD Candidate of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

2* Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

3 Assistant Professor Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

4 Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

5 Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, Netherlands

Corresponding author:

Tel: +984432779552 -Post Code:571531177- Post Box: 165

Email: * n.delirez@urmia.ac.ir

Received: 2023/2/10

Accepted: 2023/07/12

Abstract:

nanotechnology based therapies mainly shows its inhibitory effect on the tumor microenvironment by modulating the immune suppression mechanism. Success in this field largely depends on the physicochemical characterization of nanoparticle vaccines. Linrodostat mesylate is a drug that reduces the production of kynurenine from tryptophan. Accumulation of kynurenine impairs effector T cell function and induces immunosuppressive regulatory T cells. Therefore, this drug can be considered a means of controlling suppression of the immune system. The goal of this study was to produce anti PD-L1 monoclonal antibody decorated nanoparticles containing linrodostat mesylate with desirable properties and to investigate their physicochemical characterization.

Nanoparticles were prepared using double emulsion-solvent evaporation method. Size and morphology of the particles were investigated using the FESEM microscope method. polydispersity index and zeta potential of the particles using were investigated the DLS method and also, release rate and encapsulation efficiency were investigated.

The research results showed that nanoparticles had a suitable uniform dispersion. In the group of nanoparticles containing linrodostat mesylate, the polydispersity index of particles was 0.06 and after the binding of anti- **PDL-1** monoclonal antibody was 0.24. All particles were spherical with a smooth surface. The ideal particle size for nanoparticles containing linrodostat mesylate was estimated to be 210.14 nm, and it was estimated to be about 270.35 nm after binding anti- **PDL-1** monoclonal antibody to nanoparticles. Binding of anti- **PDL-1** monoclonal antibody decreased the amount of encapsulated linrodostat mesylate. The

release of linrodostat mesylate was biphasic, it has an initial phase with a steep slope and the next phase is a slow and controlled release.

The results showed that the vaccine based on nanoparticles produced by the double emulsion-solvent-evaporation method containing linrodostat mesylate and decorated with anti-PDL-1 monoclonal antibody has very suitable physicochemical characterization to be used as an immunotherapy vaccine.

Key words: Immunotherapy, Cancer, Nanoparticles, linrodostat mesylate **.PDL-1**