

تهیه و ارزیابی ویژگی‌های نانوذرات پلی‌لاکتیک-کو- گلیکولیک‌اسید حامل داروی Linrodoctat mesylate تزئین شده با آنتی‌بادی مونوکلونال PDL-1

سمیه احمدی افشار^۱، نوروز دلیرژ^{۲*}، سانا زیخ زاده^۳، رحیم حب نقی^۴، یوهان گارسن^۵

۱. دانشجوی دکترای اینمنی‌شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نويسنده مسئول)

۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۴. دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۵. استاد، گروه ایمونوفارماکولوژی، دانشگاه اوترخت، اوترخت، هلند

نويسنده مسئول:

تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۹۵۵۲، کد پستی: ۵۷۱۵۳۱۱۷۷، صندوق پستی: ۱۶۵

Email:n.delirezh@urmia.ac.ir

دریافت: 1401/11/21 پذیرش: 1402/4/21

چکیده

نانوتکنولوژی اثر مهاری خود بر ریزمحیط تومور را به طور عمده از راه تعديل سازوکار سرکوب اینمنی و نیز خواص پاسخ اینمنی ضدتوموری نشان می‌دهد. موقفيت در این زمينه تا حد زیادی به خصوصیات فيزيکوشيميايی نانوذرات ساخته شده بستگی دارد. Linrodoctat mesylate دارويی است که باعث کاهش تولید كينورنین از تريپتوфан می‌شود. تجمع كينورنین باعث اختلال در عملکرد سلول T افکتور و القا سلول‌های T تنظيمي سرکوب‌کننده سیستم اینمنی می‌شود. درنتیجه، این دارو می‌تواند به عنوان وسیله‌ای برای کترول سرکوب سیستم اینمنی به شمار آید. هدف از پژوهش حاضر، تولید نانوذرات نشاندارشده با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PD-L1 حاوی داروی Linrodoctat mesylate با خصوصیات مطلوب و بررسی خصوصیات فيزيکوشيميايی آنها می‌باشد.

نانوذرات با استفاده از روش امولسیون دوگانه-تبغیر حلال تهیه شدند. اندازه و مورفو‌لوجی 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 Linrodoctat mesylate برابر با ۰,۶ و بعد از اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 برابر با ۰,۲۴ بود. سایز نانوذرات حاوی Linrodoctat mesylate، Linrodoctat mesylate حدود ۰,۱۴-۰,۲۱ نانومتر و بعد از اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 حدود ۰,۳۵-۰,۷۰ نانومتر تخمین زده شد. اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد

PDL-1 باعث کاهش در مقدار linrodoستat mesylate انکپسوله شده شد. رهاسازی

دو فاز دارد که شامل یک فاز اولیه با شبیه 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 linrodoستat mesylate ترئین شده با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 با خواص فیزیکوشیمیایی بسیار مناسبی برای استفاده به عنوان درمان ایمونوتراپی است.

.PDL-1، linrodoستat mesylate و ازه‌های کلیدی: ایمونوتراپی، سرطان، نانوذرات،

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

از سویی اهداف جدیدی در ریزمحيط تومور کشف شده است که می‌تواند به هدایت و بهبود اقدام‌های مختلف درمان‌های سرطانی کمک کند، بهویژه ایمونوتراپی که با تقویت پاسخ‌های ایمنی ضدتوموری میزان کار می‌کند [5]. سلول‌های توموری می‌توانند با تحريك گیرنده‌های ایست بازرسی ایمنی³ که در سلول‌های T بیان می‌شود، از تخریب شدن به وسیله سیستم ایمنی جلوگیری و عملکرد لنفوسيت‌های T را مهار کنند. ایست بازرسی‌های ایمنی به مجموعه‌ای از مسیرها اشاره می‌کند که می‌توانند فعالیت سلول‌های T را به عنوان سیگنال‌های هم‌بازدارنده یا هم تحریکی تنظیم کنند [6] و باعث محافظت از میزان 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 ضدتومور استفاده می‌کنند [8].

در میان آنها، مهارکننده‌هایی که پروتئین مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده⁴ (PD-L1⁴) و لیگاند آن، لیگاند 1 (PD-L1) را هدف قرار می‌دهند، چشمگیرترین اثربخشی را در آزمایش‌های بالینی نشان داده‌اند [9]. PD-1 به طور

-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 این‌رو باعث عوارض جانبی بسیار و کیفیت پایین زندگی در افراد مبتلا می‌شود. امروزه با توجه به این مشکلات، تمرکز عمله بر ایمونوتراپی به عنوان یک رویکرد درمانی جایگزین و کارامد برای ازبین‌بردن سلول‌های توموری است، چرا که پاسخ‌های درمانی القا شده در این روش درمانی برخلاف درمان‌های متداول، اختصاصیت و خاطره بر ضد تومور دارند. از این‌رو ایمونوتراپی می‌تواند پاسخ‌های بادام بی‌سابقه‌ای را در بیماران سرطانی پیش‌رفته ایجاد کند [2:1].

تومور، بافت پیچیده‌ای است که نه تنها از سلول‌های توموری بلکه از سلول‌های استرومایی، سلول‌های التهابی، عروق و ماتریکس‌های خارج‌سلولی (ECM¹) تشکیل شده است که همه آنها با هم به عنوان ریزمحيط تومور (TME²) تعریف می‌شوند. TME به طور معمول از

3 Checkpoint inhibitor

4 -Programmed cell death protein 1

1 -Extracellular matrices

2 -Tumor microenvironment

یک ریزمحیطی می‌شود که به طور عمیقی سرکوب‌کننده سیستم ایمنی است. به طور همزمان، کاهش تریپتوфан 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 تریپتوfan به کینورنین به عنوان وسیله‌ای برای کنترل سرکوب سیستم ایمنی نشان داده شده است [15]. یکی از مهارکنندهای قوی IDO1 Linrodotstat mesylate است که باعث کاهش تولید کینورنین از تریپتوfan می‌شود [16].

با وجود تمام نکته‌های گفته شده 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 بسیار می‌شود. درنتیجه، می‌توان با فرموله کردن آنها در نانوذرات، معایب عمدۀ 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 داروسانی است، پژوهش‌های زیادی گواهی دارد نانوتکنولوژی با موفقیت برای طراحی سیستم‌های بسیاری استفاده می‌شود. از جمله مواردی مانند بهبود فارماکوکیتیک 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 نانوست است که دارو را به هدف خود می‌رساند [18]. از مزایای دیگر

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 ۱ PD-L1 به ۱ PD 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. لنفوسيت‌های نفوذیافته در تومور اغلب ۱-PD را بیان می‌کنند و از این راه باعث کاهش پاسخ‌های سلول‌های T، پاسخ‌های ضدتوموری و شکست میزبان در رد تومور می‌شوند [11].

با زدارنده‌های ایست بازرسی ایمنی، آنتی‌بادی‌های مونوکلونالی هستند که با جلوگیری از درگیری این مولکول‌های ایست بازرسی، از سرکوب سیستم ایمنی جلوگیری می‌کنند. درنتیجه، باعث تقویت دوباره پاسخ ایمنی ضدتومور می‌شوند [12]. ایمونوتراپی سرطان با هدایت بازدارنده‌های ایست بازرسی ایمنی، اثربخشی طولانی مدت 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 تریپتوfan به کاتابولیت‌هایی از جمله کینورنین^۵ می‌شود. کاتابولیسم تریپتوfan به عنوان سازوکار قدرتمند تحمل ایمنی ذاتی و تطبیقی ثابت شده است که باعث جلوگیری از خودایمنی یا ایمونوپاتولوژی می‌شود. تخلیه موضعی تریپتوfan و تبدیل آن به کینورنین منجر به ایجاد

Kynurenine^۵

با توجه به تأثیر ریزمحیط اطراف تومور بر سیستم ایمنی برای اولین بار در این پژوهش بر آن شدیم تا با طراحی نانوذرات PLGA نشان دارشده با آنتی بادی منوکلونال ضد PD-L1 حاوی مهارکننده آنزیمIDO (linrodoestat mesylate) بتوان به صورت هدف‌دار این داروها را همزمان به سلول‌های توموری و سلول‌های نفوذپردازکرده در محیط Linrodoestat mesylate تاکنون در هیچ مطالعه‌ای به صورت نانوذرات 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 برآمده‌سازی نانوذرات و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنها از جمله اندازه، مورفولوژی ذرات، شاخص پراکندگی یکنواخت، رهایش و نیز بازده کپسولاسیون تمکرک شود در مطالعه بعدی به ارزیابی آثار درمانی این نانوذرات پرداخته شود.

2- روش کار

1-2 ستز 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

استفاده از نانوذرات برای دارو رسانی این است که دارو را به سلول‌های دقیق شناسایی شده یا حتی مکان‌های درون‌سلولی تحويل می‌دهد بنابراین باعث کاهش در معرض سیستمیک قرار گرفتن داروی سیتوکسیک و کاهش عوارض جانبی دارو می‌شود [19]. مهارکننده‌هایIDO در مصرف خوراکی با دوز بالا به بیمار خورانده می‌شوند که این موجب بروز یک سری عوارض جانبی مانند کم خونی، 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 تحويل را با کارکردهای سلولی و بیولوژیکی تعریف شده فراهم کرده است [21] که از میان این سیستم‌های تحويل، نانوذرات PLGA⁶ به علت دارابودن یک مجموعه خصوصیاتی همانند زیست تخریب پذیری، زیست‌سازگاری 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 تحويل دارو به روش تزریقی، حامل‌های کارایی برای تحويل نانوذرات می‌باشند. سیستم تحويل برپایه نانوذرات یک روش امیدوارکننده برای افزایش کارایی تحويل آنتیزن در ایمونوتراپی سرطان محسوب می‌شود و کارایی ایمونوتراپی را توسعه می‌دهد [22]. با این حال استفاده از نانوذرات PLGA به عنوان حامل آنتیزن‌های توموری کمتر مطالعه شده است. روش امولسیون دوگانه - تبخیر حلال از معمول‌ترین روش‌ها برای تهیه نانوذرات داروهای محلول در آب مانند پیتیدها، پروتئین‌ها و واکسن‌ها مناسب می‌باشد [22].

⁶-Lactic-co-glycolic acid

محلول ۱۰ میلی گرم EDC^{۱۰} اضافه شد و دوباره به مدت نیم ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد. در مرحله بعد ۱۰ میلی گرم sulfo-NHS^{۱۱} اضافه شد و سوپسانسیون به مدت ۲/۵ ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد. بعد از گذشت این زمان محلول حاصل در سرعت ۲۰۰۰۰ g به مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. بعد از این مرحله با PBS شستشو انجام شد. رسوب نهایی در ۹۵۰ میکرولیتر (Phosphate Buffered Saline) PBS حل شد و به آن ۵۰ میکرولیتر آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1 (PDL-1) ۰.۶ mg/ml اضافه شد. محلول نهایی ۴ تا ۵ ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

2-3 خصوصیات فیزیکوشیمیابی NPs

ویژگی‌های نانوذرات ترئین شده با آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1 از نظر توزیع اندازه، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و مورفولوژی نانوذرات با استفاده از دستگاه‌های DLS و FESEM مطالعه شد [۲۵: ۲۶].

4- خصوصیات فیزیکوشیمیابی NPs

1-4-2 تعیین ساختار سه‌بعدی و ریخت شناسی نانوذرات

از Nissin EM. Co. Ltd., Tokyo, (FESEM Japan) برای تعیین ساختار سه‌بعدی و مورفولوژی نانوذرات ساخته شده در این مطالعه استفاده شد. ۲-۴-۲ تعیین اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا نانوذرات

کوچک است که درنهایت بعد از خشک شدن به صورت نانوذرات جامد در می‌آیند.

به طور خلاصه در آغاز ۱ میلی گرم داروی linrodoxstat mesylate PLGA به محلول PLGA حاوی ۵۰ میلی گرم mesylate در ۱ میلی لیتر دی کلرومتان^۷ (فاز آلی) اضافه شد. سپس سه بار به مدت ۱۰ ثانیه روی یخ با دامنه ۳۸ 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 ۴ درصد پلی وینیل الکل (PVA^۸) که فاز آبی دوم در این روش ساخت نانوذرات می‌باشد، اضافه شد. سپس به مدت ۶۰ ثانیه دوباره به وسیله دستگاه اولتراسوند سونیکه شد. امولسیون حاصل (مولسیون ثانویه) به محلول PVA رقیق (۰,۱ درصد) اضافه شد و پس از آن به منظور تبخیر دی کلرومتان به مدت ۵ ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد. پس از تبخیر دی کلرومتان، محلول حاصل در سرعت ۲۰۰۰۰ g به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای رسوب نانوذرات سانتریفیوژ شد. سپس این رسوب نانوذرات به وسیله آب دیونیزه سه بار پیاپی شستشو شدند [۲۳: ۲۴].

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 روشنی که شیخ زاده و همکاران انجام دادند، انجام شد [۲۵]. به طور خلاصه، رسوب نانوذرات PLGA حاصل در ۱۰ میلی لیتر بافر MES^۹ (۰,۱ مولار) PH:۵ 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

سوپرپانسیون 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 به‌وسیله طیف‌سنجی UV-vis در طول موج‌های مشخصه آنها ارزیابی شد.

4- ارزیابی میزان اتصال آنتی‌بادی
از مایع رویی به‌دست‌آمده 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 نانودرایپ میزان پروتئین موجود در مایع رویی از راه رسم منحنی استاندارد و OD به‌دست‌آمده از نمونه‌ها محاسبه شد.

5- آنالیز آماری
برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA)، نرم‌افزار SPSS، نسخه 24 و آزمون Tukey استفاده شد. تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش و حد معناداربودن $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. تمامی تست‌ها سه بار تکرار شدند.

3- نتایج

1-3 بررسی اندازه و شاخص پراکندگی نانوذرات به‌وسیله دستگاه DLS

سایز و شاخص پراکندگی نانوذرات تولیدی حاوی PDL-1 به‌وسیله دستگاه DLS آنالیز شد. مشاهده شد که نانوذرات پراکندگی یکنواخت دارند. در گروه نانوذرات حاوی

اندازه، شاخص پراکندگی (PDI) و پتانسیل زتا (ZP) نانوذرات به‌وسیله Malvern Zetasizer, ZS, DLS¹² (Malvern, UK) تعیین شد. تمام اندازه‌گیری‌ها با سه بار تکرار (n=3) و در دمای اتاق انجام شد. نتایج نیز به صورت میانگین ± 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.

3-4-2 تعیین کارایی انکپسولاسیون

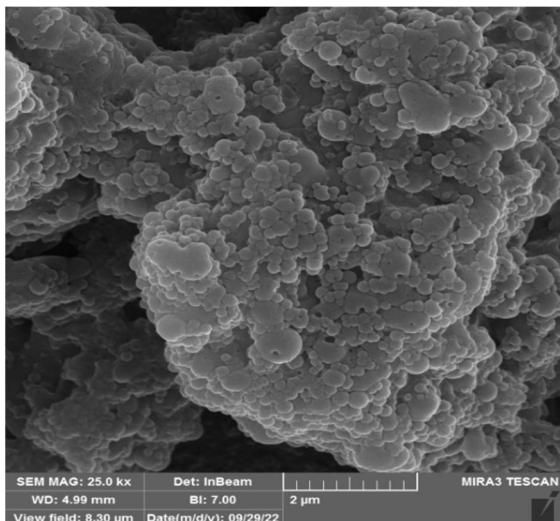
محتوای داروی linrodoestat mesylate کپسوله شده در نانوذرات با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. به‌طور خلاصه، 10 میلی‌گرم از داروی لودشده در نانوذره در 1 میلی‌لیتر دی‌کلرومتان و 2 میلی‌لیتر بافر فسفات (PH:6.5) [28] حل شد. محلول در 10000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی جمع‌آوری شد. جذب در 265 نانومتر در یک اسپکتروفتومتر Shimadzu (UV-1700) برای تعیین محتوای دارو از یک نمودار استاندارد قرائت شد [29].

$$\frac{\text{مقدار دارو انکپسوله شده}}{\text{مقدار دارو استفاده شده در تهیه نانوذرات}} = \text{کارایی انکپسولاسیون 100}$$

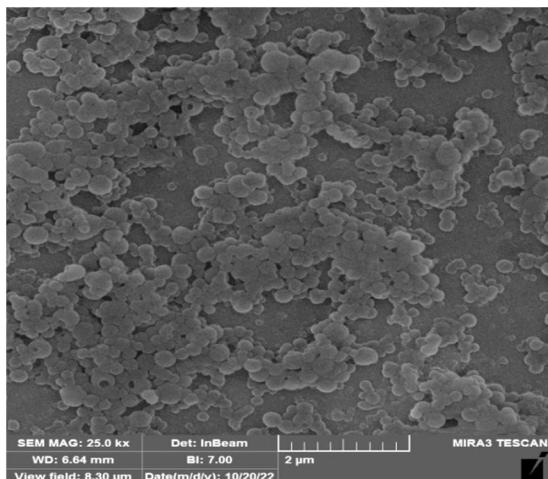
3- کیتیک رهایش دارو

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 میلی‌لیتری (0,1 مولار) در یک ژاکت رهاسازی در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در 100 rpm در داخل یک انکوباتور متحرک

می شود، تمامی ذرات کروی شکل با سطحی صاف بودند. با استفاده از نرم افزار Image J سایز ذرات ایدئال برای ۲۱۰.۱۴ linrodoestat mesylate با نانوذرات لودشده با نانومتر تخمین زده شد و بعد از اتصال آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1 به نانوذرات سایز نانوذرات افزایش پیدا کرد و حدود ۲۷۰.۳۵ نانومتر تخمین زده شد.



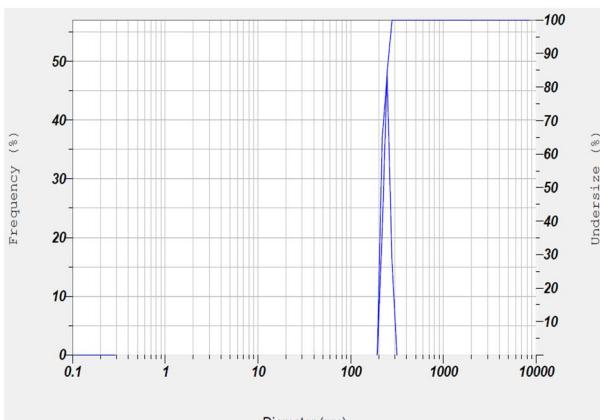
شکل ۳ نانوذرات حاوی linrodoestat mesylate قبل از اتصال آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1



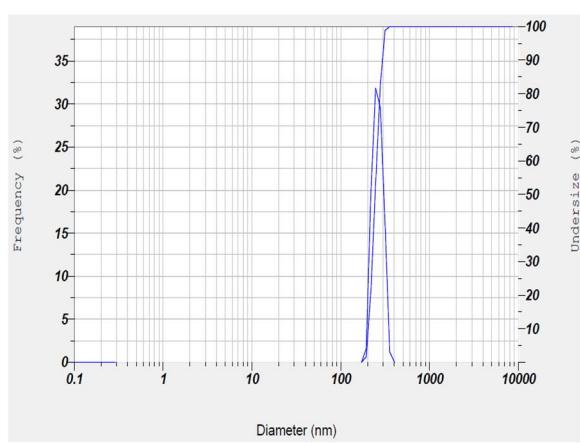
شکل ۴ نانوذرات حاوی linrodoestat mesylate بعد از اتصال آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1

3-3 بررسی خصوصیات فیزیکو شیمیایی نانوذرات تولیدی

linrodoestat mesylate pراکنده شاخص pراکنده ذرات برابر با ۰.۰۶ (شکل ۱) و در گروه نانوذرات حاوی PDL-1 ترین شده با آنتی بادی مونوکلونال ضد mesylate برابر با ۰.۲۴ است (شکل ۲) که نشان دهنده یکنواختی مناسب اندازه نانوذرات تولیدشده در هر دو گروه می باشد.



شکل ۱ شاخص pراکنده نانوذرات حاوی mesylate قبل از اتصال آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1



شکل ۱ شاخص pراکنده نانوذرات حاوی mesylate بعد از اتصال آنتی بادی مونوکلونال ضد PDL-1

2-3 بررسی مورفولوژی و اندازه نانوذرات ظاهرات مورفولوژیکی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) بررسی شد. همان طور که در شکل های ۳ و ۴ مشاهده

(0.24 \pm 0.2) اما همچنان در محدوده زیر 1 بود که نشان‌دهنده توزیع یکنواخت ذرات می‌باشد. بار سطحی ذرات (پتانسیل زتا) نانوذرات تولیدی حدود 1.7 \pm 10.4 mv است که بعد از اتصال PDL-1 به 1.3 \pm 8.1 mv تغییر کرد که از نظر آماری معنادار نبود ($p<0.05$).

اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 باعث کاهش در مقدار linrodoestat mesylate انکپسوله شده شد. این linrodoestat کاهش را می‌توان به انتشار مقداری از mesylate لودشده درون نانوذرات در فرایند اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 به نانوذرات که در محیط آبی انجام می‌شود، نسبت داد.

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

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

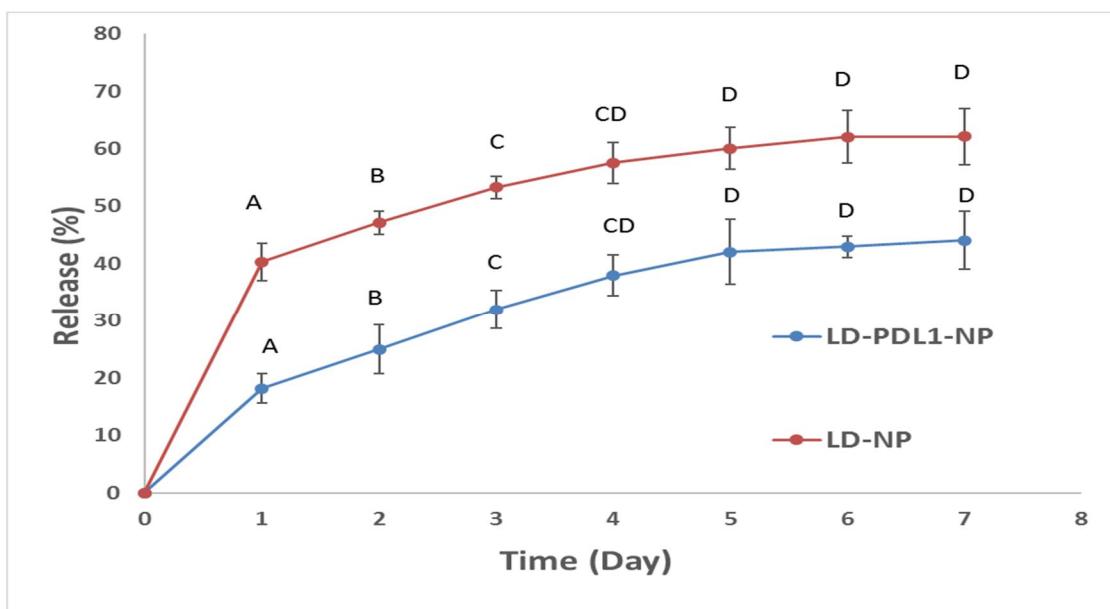
جدول 1 خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات ساخته شده، حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده معناداری در سطح ($p<0.05$) است.

شرایط آزمایشگاهی شد. به‌طور کلی می‌توان گفت پوشش نانوذرات با آنتی‌بادی منجر به تحويل 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 پیدا می‌کند و می‌توان گفت که این روش می‌تواند تحويل و رهایش ماده لودشده را بهینه کند (شکل 5).

4-3 کیتیک رهایش دارو

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

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



شکل 5 نمودار کیتیک رهایش دارو، حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده معناداری در سطح ($p<0.05$) می‌باشد.

بعدی رویکردهای مبتنی بر اینمنی برای درمان سرطان را شامل می‌شود [31]. با توجه به این موضوع، در مطالعه حاضر توجه ویژه‌ای بر ریزمحيط اطراف تومور شده است. نانوذرات طراحی شده در این پژوهش حاوی داروی linrodoestat mesylate و آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 است و براساس نکات ذکر شده [31] پیش‌بینی می‌شود در صورت استفاده به‌نهایی و یا همراه با نانوذراتی که سلول‌های سیستم ایمنی را در خون فعال می‌کنند، بتوان ریزمحيط را بر ضد تومور تغییر داد و اثر سینتریسمی با سایر روش‌های ایمونوتراپی ایجاد کرد. برای موفقیت در هر دو رویکرد ایمونوتراپی، لازم است که نانوذرات مورد نظر به سلول‌های هدف در مکان و مقدار مناسب ارائه شود. به بیانی دیگر، موفقیت ایمونوتراپی نه تنها به ماهیت داروهای استفاده شده بلکه به سیستم تحويل نیز بستگی دارد. در همین راستا، امروزه از نانوذرات با خصوصیات فیزیکی و بیوشیمیابی تعریف شده به عنوان یک رویکرد قابل قبول از سیستم‌های تحويل دارو استفاده می‌کنند [33]. در این باره گزارش شده است که ایمونوتراپی برپایه نانوذرات PLGA می‌تواند انتشار پایدار

4- بحث

به رغم پیشرفت‌های گذشته در زمینه ایمونوتراپی، وجود مقاومت در برابر این روش درمانی کماکان یکی از چالش‌های اساسی می‌باشد. قرارگیری تومورها در ریزمحيطی پویا منجر به ایجاد مقاومت چندوجهی در برابر ایمونوتراپی می‌شود. ریزمحيط تومور، محیطی متشكل از سلول‌های بدخیم، اجزای ایمنی، رگ‌های خونی، ماتریکس خارج‌سلولی و مولکول‌های سیگنال‌دهنده است که به صورت جداگانه و ترکیبی بر حساسیت به ایمونوتراپی تأثیر می‌گذارند [32]. بنابراین براساس با مطالعه مورسیانو-گروف و همکاران (2020) ما در ایمونوتراپی با دو رویکرد کلی رویه‌رو هستیم که شامل رویکرد مستقیم و غیرمستقیم است. رویکردهای مستقیم در درجه اول خود تومور را اصلاح می‌کنند در حالی که رویکردهای غیرمستقیم به‌طور عمده بر روی ریزمحيط 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 ریزمحيط تومور به همراه سلول درمانی، نسل

تا 780 نانومتر گزارش شده است. بنابراین، نانوذرات برای هدف قراردادن تومورها، باید اندازه‌ای کمتر از این میزان داشته باشند [36]. علاوه‌بر این، اندازه نانوذرات یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تعامل آنها با سلول‌های هدف است، به طوری که 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]. سیلووا 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 به راحتی به‌وسیله سلول‌های سیستم ایمنی جذب شده و باعث افزایش پاسخ‌های این سلول‌ها می‌شوند [38]. به طور کلی می‌توان چنین بیان کرد که برای تمام اهداف عملی مربوط به سیستم‌های تحويل 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 ایمونوتراپی تأثیر می‌گذارد. کپسوله‌سازی دارو در نانوذرات PLGA نه تنها از تخریب آن در برابر آنزیم‌ها محافظت می‌کند بلکه آن را به صورت 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

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

عوامل مختلفی می‌توانند در کمیت و کیفیت ایمونوتراپی برپایه نانوذرات تأثیر بگذارند که در این میان خواص فیزیکوشیمیایی نانوذرات از قبیل اندازه، شکل، روش‌های بارگذاری آنچه زن و خواص سطحی (برای مثال بار سطحی) نقش مهمی در مسیر انتقال آنها برای تحويل به محل‌های تومور ایفا می‌کنند [34]. با توجه به این موضوع، دو هدف اصلی در این پژوهش شامل (الف) تھیه و ارزیابی خصوصیات نانوذرات حاوی داروی آنچه بادی مونوکلونال ضد 1-PDL و ارزیابی خصوصیات نانوذرات بعد از اتصال آنچه بادی 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 $236.9 \pm 7.4 \text{ nm}$ 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) آنچه بادی به سطح نانوذرات تولیدی حاصل شد. نتیجه این مرحله اتصال موفقیت‌آمیز آنچه بادی به نانوذرات PLGA بود که نانوذرات با اندازه ذرات مناسب و کارایی انکپسولاسیون 1.4 ± 74.12 درصد به دست آمد. سطح صاف نانوذرات حذف کامل حلال از نانوذرات فرموله شده را نشان می‌دهد که این شکل کروی صاف بیانگر کیفیت خوب نانوذرات ساخته شده است [35].

در مطالعه حاضر، به طور خاص بر اندازه نانوذرات به عنوان عامل تقویت‌کننده ایمونوتراپی تمرکز شده است. رگ‌های خونی اطراف تومور نشت‌دار هستند. این ویژگی در عروق تومور منجر به نفوذ و احتباس نانوذرات در بستر تومور می‌شود. اندازه منفذ در عروق تومور بین 380

و با اندازه ۳۰۲ نانومتر پس از فرآصوت بودند [48]. سلیمن و همکاران (2020) نشان دادند که در صورت استفاده از ۱ درصد PVA اندازه ذرات ۲۵۰ نانومتری بودند درحالی که با ۴ درصد PVA قطر نانوذرات کوچکتر و در حدود ۱۵۰ نانومتر بودند. تفاوت در اندازه بین این فرمولها شاید به دلیل انرژی سطحی کمتر با PVA در سطح نانوذرات و همچنین افزایش ویسکوزیته در طول تشکیل است که امکان تشکیل ذرات کوچکتر را فراهم می کند [49].

برای دنبال کردن رفتار نانوذرات در محلول آبی، توزیع اندازه و بار سطحی فرمولاسیون نانوذرات با استفاده از اندازه‌گیری‌های پراکنده‌گی 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 درکنار اندازه ذرات بر تأثیرگذاری نانوذرات تأثیر می گذارد [50]. بزرگی پتانسیل زتا نشانه‌ای 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 می‌تواند بر تمایل نانوذره به نفوذ در غشاهای تأثیر بگذارد. نانوذراتی که پتانسیل زتا بیش از $+30mV$ یا کمتر از $-30mV$ دارند، به عنوان یک سیستم تعليق کلوئیدی پایدار در نظر گرفته می‌شوند که از تجمع نانوذرات جلوگیری می‌کند. در مطالعه حاضر نیز پتانسیل زتا نانوذرات تولیدی در این محدوده قرار دارد. درنتیجه از پایداری خوبی برخوردار است [52]. در مطالعه گاوندر و همکاران نشان داده شده است که نانوذرات PLGA بدون سورفاکtant، پتانسیل

تخربی دارو تا زمان رسیدن به سلول هدف جلوگیری می‌کنند [42].

روش تهیه نانوذرات در این مطالعه امولسیون دوگانه تبخیر حلال انتخاب شد تا اندازه ذرات کوچک و مناسب برداشت به وسیله سلول‌های هدف باشد. روش آماده‌سازی امولسیون دوگانه تبخیر حلال منجر به قطر ذراتی در محدوده ۱۵۰ تا ۳۰۰ نانومتر می‌شود [43]. در یک مطالعه مشابه، نانوذرات PLGA حاوی CpG با استفاده از روش تبخیر دوگانه حلال مهندسی شد و اندازه ذرات به دست آمده ۲۰۰ تا ۲۳۰ نانومتر گزارش شد که برای جذب ترجیحی سلول‌های ایمنی مطلوب بود [44]. در مطالعه دیگری گزارش شده است که ذرات با اندازه ۵۰۰ نانومتر یا کمتر برای جذب به وسیله APC‌ها 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 سورفاکtant استفاده شده است [46]. پلی‌وینیل کل (PVA) رایج‌ترین امولسیون‌گیر استفاده شده در فرمولاسیون نانوذرات PLGA است. مقداری از PVA با وجود شستشوی مکرر در ارتباط با نانوذرات باقی می‌ماند. PVA باقیمانده بر خواص دارویی مختلف نانوذرات مانند اندازه ذرات، پتانسیل زتا، شاخص پراکنده‌گی چندگانه، آب‌گریزی سطح، بارگیری پرتوئین و همچنین بر آزادسازی در شرایط آزمایشگاهی داروی محصور شده تأثیر می‌گذارد. نکته مهم این است که نانوذرات با مقدار بیشتری از PVA باقیمانده به رغم اندازه ذرات کوچک‌تر، جذب سلولی به نسبت کمتری داشتند. یکی از پارامترهای مهمی که بر مقدار باقیمانده PVA تأثیر می‌گذارد، غلظت PVA استفاده شده در امولسیون است [47]. غلظت‌های PVA استفاده شده در این مطالعه به ترتیب ۴ و ۰,۱ درصد بود. در مطالعه سویدر و همکاران (2018) نانوذرات ساخته شده با ۴ درصد PVA

می‌شود. انفجار اولیه با افزایش تدریجی دنبال می‌شود و در روز 10 به 70 درصد می‌رسد که نشان دهنده یک فاز انتشار پایدار است [30]. براساس مطالعه حاضر رهاسازی linrodoestat mesylate دوفازی است و یک فاز اولیه با شبیه تندر و مرحله بعد یک رهایش آرام و کنترل شده دارد. در مطالعه دیگرس نشان داده شد که آزادسازی داروی imatinib mesylate از نانوذرات به صورت دو فازی با فاز انفجار اولیه (40 درصد) و سپس فاز انتشار کندر (60 درصد) کنترل شده 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 کیتیک آزادسازی آزمایشگاهی مشابه نانوذرات پلی‌اتیلن گلیکول-PLGA بارگذاری شده با فلوروسئین ایزوتوپیسانات، تقریباً 40 درصد در روز 1 و انتشار پایدار در 28 روز آینده پیش‌تر نشان داده شده است [55].

نتایج حاصل نشان داد که ایمونوتراپی مبتنی بر نانوذرات تولیدی به روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال حاوی داروی linrodoestat mesylate و تزئین شده با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد PDL-1 به روش شیمیایی (کواوالانسی) با خواص فیزیکوشیمیایی بسیار مناسبی برای استفاده جهت ایمونوتراپی است و این دو روش به عنوان روش‌های مناسب برای تولید نانوذرات و اتصال سایر آنتی‌بادی‌ها و پروتئین‌ها به نانوذرات تولیدی پیشنهاد می‌شود. درنهایت می‌توان استفاده از این نانوذرات ساخته شده به صورت درون‌تن برای تحریک پاسخ‌های ایمنی ضدتومور در داخل ریزمحیط تومور به تنها یا به همراه سایر روش‌های ایمونوتراپی محرك 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

زتا منفی (-49 mV) را به دلیل وجود گروه‌های کربوکسیلیک انتهایی در PLGA نشان می‌دهند [53]. در مطالعه دیگر که به وسیله سلیمان و همکاران (2020) انجام شد، نشان داده شد که پس از تبخیر حلال، اندازه ذرات به 141 نانومتر کاهش پیدا کرد و پتانسیل زتا خنثی باقی ماند (1.7- میلی ولت) [49]. همین طور 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 تشکیل شده 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 ± 2.6 نانومتر و شاخص پراکندگی نانوذرات 0.24 ± 0.2 به دست آمد، از آنجایی که در مطالعه فیفیس و همکاران نشان داده شد که ذرات 232 نانومتری با شاخص پراکنگی 0,384 قوی‌ترین پاسخ ایمنی را القا کرده‌اند، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات ساخته شده مطالعه حاضر از خصوصیات فیزیکوشیمیایی مطلوبی برخوردار است.

رفتار رهاسازی دارو یک عامل مهم برای کاربرد نانوذرات پلیمری است که به طور 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 به طور یکنواخت در ماتریکس نانوذرات توزیع / حل می‌شود و رهاسازی با انتشار یا فرسایش ماتریکس اتفاق می‌افتد. گزارش شده با انتشار یا فرسایش ماتریکس اتفاق می‌افتد. گزارش شده است که پروفایل آزادسازی داروها از نانوذرات پلیمری به ماهیت سیستم تحويل بستگی دارد. از آنجایی که آب‌دوستی نانوذرات PLGA نفوذ گسترده آب را به ماتریکس پلیمری امکان‌پذیر می‌کند، مقدار چشمگیری از دارو در روزهای اولیه انکوباسیون در بافر آبی رها

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 lenrostat mesylate for muscle-invasive bladder cancer. Future 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, Delirezh 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, Delirezh 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-Lieskov 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, Eggertmont 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] Holmgård 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 (ST1571)-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, Piriayaprasarth S, Sriamornsak 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 linrodoestat mesylate.

Somayeh Ahmadiafshar¹, Nowruz Delirezh^{2 *}, Sanaz Sheikhzadeh³, Rahim Hobbenaghi⁴, Garssen Johan⁵

**1PhD 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)**

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

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

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

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

Email: * n.delirezh@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. Linrodoestat mesylate is a drug that reduces the production of kynurene from tryptophan. Accumulation of kynurene 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 linrodoestat 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 linrodoestat 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 linrodoestat 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 linrodoestat 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**