

سرازوم-آنتی بادی: یک نانوحامل هوشمند برای اهداف تشخیصی و تحویلی

مریم وصال^۱، زهرا واعظی^{۲*}، عبدالله الهوردی^{۱*}، حسین نادری منش^۱

۱-گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲-گروه مواد زیست فعال، دانشکده علوم و فناوری های بین رشته ای، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

a-allahverdi@modares.ac.ir, Zahra.vaezi@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۳

دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۶

چکیده

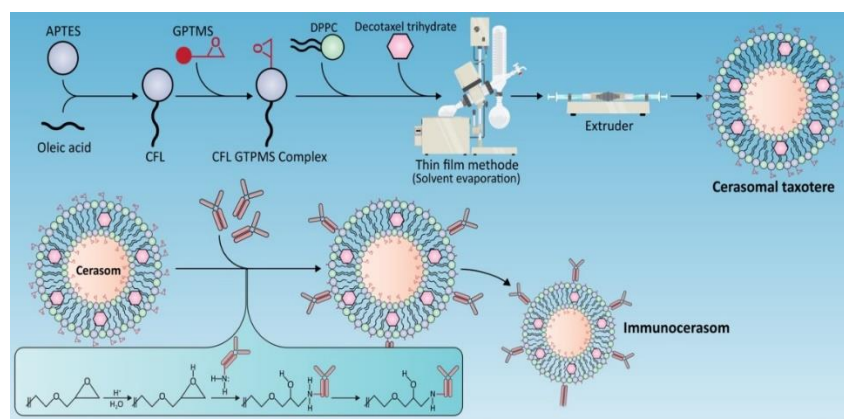
در سال های اخیر، سیستم های دارورسانی هدفمند به عنوان یک رویکرد امیدوارکننده برای افزایش اثربخشی و به حداقل رساندن عوارض جانبی عوامل درمانی ظهور کرده اند. سرازوم ها نوع خاصی از لیپوزوم ها با شبکه های سیلوکسان کووالانسی روی سطح هستند که ثبات مورفولوژیکی فوق العاده ای را در عین حفظ تمام صفات مفید لیپوزوم ها ارائه می دهند. سرازوم ها، به دلیل زیست سازگاری، پایداری، رهايش قابل کنترل و ذخیره سازی طولانی مدت بستری منحصر به فرد برای محصور کردن و تحویل دارو ارائه می کنند. در این پژوهش سعی شده سطح سرازوم ها مهندسی شود تا باعث افزایش گزینش پذیری و کارایی دارورسانی شود. به صورتی که آنتی بادی هرسپتین روی سطح سرازوم نشانده شده و امکان هدف گیری دقیق سلول های HER²⁺ را فراهم کند. سپس، خصوصیات فیزیکوشیمیایی سرازوم های عاملدار شده با آنتی بادی، از جمله سایز و بار سطحی به ترتیب در حدود $229 \pm 15/6$ نانومتر با پتانسیل زتای $13/5 \pm 1/2$ میلی ولت به دست آمد. نتایج طیف IR و فلورسانس نشان داد آنتی بادی با موفقیت به سطح سرازوم با راندمان اتصال ۶۴ درصد متصل شد. این نتایج مکانیسم های اساسی حاکم بر سنتز ایمنوسرازوم ها را اثبات کرده و رویکرد ارزشمندی را برای پیشرفت های آینده در سیستم های دارورسانی هدفمند ارائه می دهد.

کلید واژگان: سرازوم، آنتی بادی، دارورسانی هدفمند، سرطان سینه

۱- مقدمه

سرطان سینه، یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان است که نیازمند رویکردهای درمانی نوآورانه برای افزایش اثربخشی درمان و کاهش عوارض جانبی است. در این میان، سرطان پستان HER^2 مثبت، که با بیان بیش از حد گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (HER^{2+}) مشخص می‌شود، به دلیل ماهیت تهاجمی آن و پیش‌آگهی ضعیف‌تر و همچنین غلبه بر سیستم ایمنی نیاز به رویکردهای درمانی هدفمند دارد. استفاده از روش‌های شیمی درمانی سنتی، با وجود اینکه که تا حدی مؤثر می‌باشد، اغلب منجر به اثرات نامطلوب بر بافت‌های سالم می‌شود [۱]. با درک این چالش، محققان در تلاش هستند پتانسیل سیستم‌های دارورسانی هدفمند را برای درمان سرطان سینه به‌کارگیرند. هرسپتین، یک آنتی‌بادی مونوکلونال بوده که گیرنده‌های HER^{2+} را به‌طور اختصاصی مورد هدف قرار می‌دهد [۲]. مطالعات قبلی به‌طور گسترده، استفاده همزمان از هرسپتین با داروی شیمی درمانی مانند دوستاکسل را بررسی کرده‌اند. این مطالعات پایه و اساس درمان‌های هدفمند در سرطان پستان HER^2 مثبت هستند، زیرا داروها عدم انتقال هدفمند

آن‌ها به سلول‌های مورد نظر است به گونه‌ای که درصد زیادی از این ترکیبات توسط سیستم ایمنی حذف می‌شوند یا توسط دیگر سلول‌ها غیر هدف جذب می‌شوند. برای حل این مشکل استفاده از نانوحامل‌های پایدار و زیست‌سازگار همچون لیپوزوم پیشنهاد شده است [۳]. از طرفی ناپایداری لیپوزوم‌ها می‌تواند منجر به پاکسازی سریع آن‌ها از گردش خون قبل از رسیدن به هدف شوند [۴]. بنابراین، یک نوع نانو هیبرید لیپوزوم آلی- معدنی به نام سرازوم به‌عنوان یک سیستم جدید دارورسانی با شبکه‌های غیرآلی پلی‌ارگانوسیلوکسان در سطح آن معرفی شد [۵]. سطح سیلوکسان می‌تواند ثبات سرازوم‌ها را در محیطی قلیایی (خون) به‌طور قابل توجهی بهبود بدهد و رهایش داروهای آب‌دوست و آب‌گریز کپسوله شده قابل کنترل باشد. همچنین، این سطحی سیلوکسانی کاندیدای ایده‌آل برای درمان‌های هدفمند ایجاد می‌کند [۶]. هدف این مطالعه، دستیابی به روش بهینه برای مهندسی سطح سرازوم‌ها برای اتصال آنتی‌بادی هرسپتین بوده و سپس ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی این اتصال بررسی شد. شکل ۱، شماتیک ایمونوسرازوم سنتز شده و مطالعات انجام شده روی آن را نشان می‌دهد.



شکل ۱ شماتیک سنتز نانو حامل سرازوم عامل‌دار شده با آنتی‌بادی

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد

زمان داده تا استر فعال شود. در ادامه ۵۰۰ میلی‌لیتر تری اتوکسی سیلان (APTES) در ۳ میلی‌لیتر دی کرو متان حل شد و به ترکیب استر فعال اضافه شد. این ترکیب برای تشکیل CFL ۲۴ ساعت روی همزن قرار داده شد (شکل ۲). واکنش با جداسازی ترکیبات آزاد توسط سانتریفیوژ و خشک کردن نمونه به پایان میرسد [۶،۷].

۲-۳ سنتز اتصال CFL-GPTMS

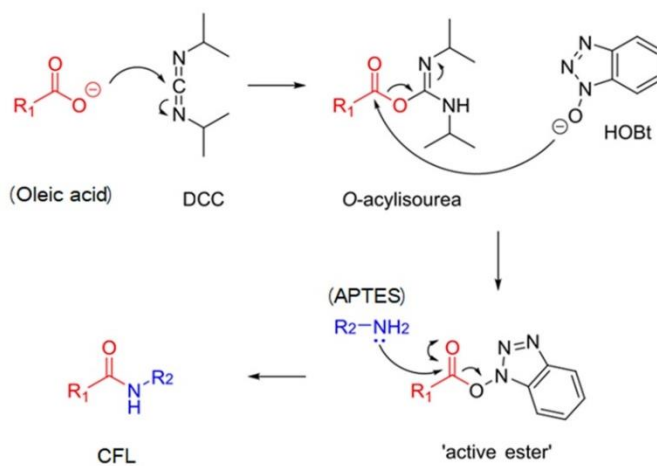
مقدار ۱۰ میلی‌گرم از CFL سنتز شده در مرحله قبلی را در ۲۰ میلی‌لیتر تولوئن حل کرده و به مدت ۲ ساعت تحت رفلکس در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد روی همزن قرار می‌دهیم. سپس، ۶ میلی‌لیتر از گلیسیدوکسی پروپیل تری‌متوکسی سیلان (GPTMS) به ترکیب قبلی افزوده ۱۲ ساعت روی همزن در همان دما قرار می‌گیرد. سه مرتبه با متانول شستشو داده تا GPTMS های متصل نشده جدا شوند در ادامه برای ۲۴ ساعت در آن خلأ با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته تا خشک شود (شکل ۳) [۸-۱۰].

اسید اولئیک، ۳-آمینو پروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES)، دی پالمیتویل فسفاتیدیل کولین (DPPC)، دی سیکلو هگزیل کربودی ایمید (DCC)، هیدروکسی بنزوتریازول (HOBt)، ۳-گلیسیدوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان (GPTMS)، دی کلرومتان، اتانول، متانول، کلروفرم، هیدروکلریک اسید، پتاسیم برماید، تولوئن، استیک اسید. آنتی‌بادی هر سپتین (جرم ملکولی ۱۴۵۵۳۱،۵ گرم بر مول) از شرکت Roche و آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار Alexa fluor 488 از Elabscience تهیه شد.

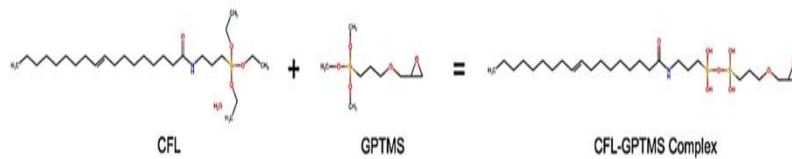
۲-۲ سنتز لیپیدهای تشکیل دهنده سرازوم (Cerasome)

CFL (-forming lipid)

در ابتدا برای سنتز لیپیدهای تشکیل دهنده سرازوم، ۱۰ mg دی سیکلو هگزیل کربودی ایمید (DCC) را در ۲ میلی‌لیتر دی کلرومتان حل کرده و ۳۰۰ میلی‌لیتر اولئیک اسید را قطره قطره به آن اضافه و ۱۰ دقیقه روی همزن قرار می‌دهیم. سپس، ۷ میلی‌گرم هیدروکسی بنزوتریازول (HOBt) را در ۱ میلی‌لیتر دی کلرومتان حل کرده و قطره قطره به مواد قبلی اضافه می‌کنیم. ۲۰ دقیقه



شکل ۲ تصویر شماتیک سنتز CFL)



شکل ۳ واکنش شیمیایی اتصال CFL به GPTMS

شرایط اسیدی افزوده شد و روی شیکر الکلنگی یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از آن برای جداسازی آنتی‌بادی‌های متصل نشده به سرازوم از سانترفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۲ دقیقه استفاده شد [۱۳،۱۱].

۲-۵ مشخصه‌یابی کمپلکس سنتز شده

برای بررسی خواص فیزیکوشیمیایی کمپلکس CFL-GPTMS سنتز شده و اتصال آنتی‌بادی به GPTMS از آزمون‌های مختلف استفاده شد. طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز گروه‌های عاملی به وجود آمده در واکنش شیمیایی را مشخص کرد که با دستگاه FTIR Jasco Japan در محدوده ۱-۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm⁻¹ انجام شد. اندازه ذرات و پتانسیل زتای نمونه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زاویه‌ی پراش ۱۷۳ درجه سانتی‌گراد با دستگاه Nanozeta Sizer بررسی شد. مورفولوژی سطح سرازوم قبل و بعد از اتصال به آنتی‌بادی برای تایید تشکیل موفقیت‌آمیز آنها و همچنین مقایسه با سرازوم‌های عامل‌دار شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) بررسی شد. ابتدا محلول حاوی سرازوم‌ها روی لام قرار گرفت و پس از خشک شدن با یک لایه نازک (حدود ۱۰ نانومتر) از طلا پوشانده و توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی مشاهده شد.

۲-۶ بررسی پایداری طولانی مدت سرازوم

پایداری ساختار غشای سرازومی در مدت زمان ۱۰۰ روز با اندازه‌گیری سایز سرازوم‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد.

۴-۲ سنتز سرازوم و اتصال آنتی‌بادی به سطح آن

برای باز شدن رینگ اپوکسی GPTMS از pH های مختلف اسیدی و بازی استفاده شد [۱۱] GPTMS اضافه شده به آب با نسبت ۵ درصد (حجمی / حجمی) به pH=5 و pH=9 رسانده شد و آنتی‌بادی با نسبت ۱:۵۰ به آن اضافه شد و محلول به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر الکلنگی قرار گرفت. سپس، این محلول سانترفیوژ شد و محلول پایینی برای بررسی اتصال آنتی‌بادی به GPTMS ارزیابی شد. از آنجایی‌که، نتایج FT-IR شرایط اسیدی را بهینه نشان داد در ادامه برای سنتز سرازوم‌ها از pH=5 استفاده شد. برای سنتز سرازوم با روش هیدراتاسیون لایه نازک از نسبت ۱:۱ از DPPC و CFL-GPTMS استفاده شد [۴]. برای ایجاد شرایط اسیدی و باز شدن رینگ اپوکسی، CFL-GPTMS در محلول متانول با pH=5 حل شد. سپس، به آن مقدار مشخص DPPC و کلروفرم اضافه شد و در روتاری با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا لایه‌ای نازک تشکیل شود. سپس، برای تشکیل سرازوم‌های چند لایه‌ای ۱ سی‌سی بافر فسفات به آن اضافه شد. با چند بار عمل انجماد و ذوب، بافر به لایه‌های فشرده سرازوم‌های چند لایه‌ای نفوذ کرده و سبب جدایی آنها می‌شود و برای یک‌دست شدن سایز سرازوم‌های تک‌لایه، از اکسترودر با فیلتر ۱۰۰ نانومتر استفاده می‌شود [۱۲]. مطالعات ما بر روی واکنش‌پذیری در محیط‌های آلی گلیسیدیل سیلان‌ها متمرکز بوده و بعد از سنتز سرازوم حاوی (GPTMS) که عملکرد اپوکسی واکنشی ویژه‌ای نسبت به هسته دوست‌های R-NH₂ دارد، آنتی‌بادی هرسپتین با نسبت ۱:۵۰ به سرازوم سنتز شده در

۷-۲ بررسی میزان اتصال آنتی بادی به سرازوم

روش برادفورد، به عنوان یک روش تحلیلی طیف سنجی، برای اندازه گیری غیر مستقیم غلظت پروتئین چسبیده بر روی سطح سرازوم استفاده شده است. سنجش پروتئین متصل به رنگ بر اساس اتصال مولکول های پروتئین به رنگ کوماسی در شرایط اسیدی است. اتصال پروتئین به رنگ باعث تغییر طیفی شده است، رنگ از قهوه ای ($\lambda_{max}=465$ نانومتر) به آبی ($\lambda_{max}=610$ نانومتر) تغییر می کند. تغییر در چگالی رنگ در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شده است که متناسب با غلظت پروتئین است. اسیدهای آمینه پایه، آرژنین، لیزین و هیستیدین نقش مهمی در تشکیل کمپلکس های رنگ-پروتئین دارند. پروتئین های کوچک، کمتر از ۳ کیلو دالتون و اسیدهای آمینه معمولاً هیچ تغییر رنگی ایجاد نمی کنند. برای تعیین مقدار آنتی بادی متصل شده به سرازوم، غلظت های مختلف ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰ از آنتی بادی به سرازوم متصل شد و پس از واکنش اتصال، سرازوم های باقیمانده در قسمت فیلتر آمیکون سه بار با بافر فسفات شسته شد تا آنتی بادی هایی که متصل نشده اند جدا شوند، ۲۵۰ میکرولیتر از معرف بردفورد را به ۵ میکرولیتر از نمونه اضافه و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط جذب با استفاده از ابزار (UV-Visible Shimadzu، ژاپن) در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج با منحنی استاندارد محلول mAb در محدوده غلظت ۱۵-۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر مقایسه و غلظت آنتی بادی متصل شده به سطح سرازوم تعیین مقدار شد [۱۴، ۱۵].

۸-۲ تایید اتصال آنتی بادی با استفاده از آنتی بادی

ثانویه نشان دار

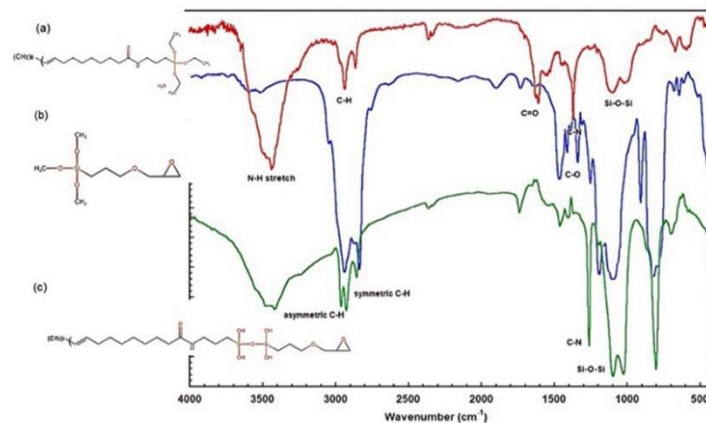
برای تایید اتصال آنتی بادی هرسپتین به نانوحامل سرازوم از آنتی بادی ثانویه فلورسنت استفاده شد. آنتی بادی ثانویه

Alexa Fluor 488 با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ایمنوسرازوم تنها (DPPC:CFL-GPTMS) و اتصال یافته به آنتی بادی اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد روی شیکر الاکلنگی قرار گرفت. برای جداسازی آنتی بادی های متصل نشده از سانترفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۲ دقیقه استفاد شد. سپس، سه بار سرازوم ها را با بافر فسفات شسته شد و روی لام ریخته شد و با میکروسکوپ فلورسنت Olympus IX81 تصویر برداری شد.

۳ نتایج و بحث

۱-۳ سنتز لپید و تشکیل سرازوم

سرازوم ها، لیپوزوم هایی با شبکه های سیلوکسان کووالانسی روی سطح هستند که ثبات مورفولوژیکی فوق العاده ای را در عین حفظ تمام مزایای لیپوزوم ها فراهم می کنند. در این مطالعه از سرازوم هایی با ترکیب ۱:۱ از CFL متصل به GPTMS به همراه فسفولیپید DPPC استفاده شد. ساختار CFL از اسید اولئیک که یک زنجیره آلکیل ۱۶ کربنه در دم آبگریز و APTES که یک شبکه سیلوکسان در سر آبدوست است، تشکیل شده است. وجود اسید اولئیک سبب انعطاف پذیری عملکردی CFL می شود. در حالی که، APTES با گروه سیلانول خود باعث پایداری می شود. اتصال GPTMS به عنوان لینکر برای کمک به اتصال آنتی بادی به سطح سرازوم با تأیید اتصال آنالیز FTIR انجام شد (شکل ۴). همانطور که در شکل ۴ طیف FT-IR نشان داده شده در CFL (a)، باند کششی C-N، C=O، C-H، N-H، به ترتیب در 1400 cm^{-1} ، 1600 cm^{-1} ، 3000 cm^{-1} ، 3400 cm^{-1} اتصال پیوند آمیدی اسید اولئیک و APTES و پیک های مرتبط با متیل در ساختار آن و در حدود 1000 cm^{-1} ارتعاشات کششی در پیوندهای Si-O-C مشاهده شدند [۴].



شکل ۴ آنالیز اسپکتروسکوپی FT-IR، (a) پیوند آمیدی و شبکه سیلوکسان لیپید CFL، (b) حلقه اپوکسی در GPTMS و (c) اتصال دو ترکیب با شبکه سیلوکسان قوی‌تر برای آنتی‌بادی

مصرف تمام Si-OH برای تشکیل پیوند Si-O-Si بوده است [۹].

۳-۲ بررسی پایداری در بلندمدت سرازوم

پایداری حامل در انتقال دارو بسیار حائز اهمیت است. پایداری بیشتر سرازوم‌ها در مقایسه با لیپوزوم‌ها به علت وجود سیلیس در سطح آنها است که باعث افزایش مدت زمان رهایش داروی محصور از حامل می‌شود. این قابلیت رهایش پایدار می‌تواند اثر درمانی داروها را طولانی کرده و دفعات تجویز را کاهش دهد. سرازوم‌ها می‌توانند داروهایی که نامحلول و یا کم محلول در آب هستند را کپسوله کنند و حلالیت آنها را بهبود بدهند. این امر به‌ویژه برای داروهایی که تجویز آنها در شکل اصلی خود دشوار است، از اهمیت بسیاری برخوردار است. کپسوله شدن دارو در داخل نانوحامل، دارو را از تخریب ناشی از آنزیم‌ها یا شرایط محیطی سخت محافظت می‌کند. این محافظت باعث افزایش پایداری و ماندگاری داروهای حساس می‌شود. با کپسوله کردن داروها در سرازوم، تعامل آنها با سلول‌های سالم به حداقل می‌رسد و سمیت کلی را کاهش می‌دهد. این امر به‌ویژه برای عوامل شیمی درمانی که می‌تواند عوارض جانبی شدیدی داشته باشد،

در GPTMS (b) در حدود 3000 cm^{-1} پیک مرتبط با ارتعاشات کششی پیوند C-H متعلق به گروه‌های متیل دیده شد و در $1250-1000 \text{ cm}^{-1}$ پیک‌های مرتبط با پیوندهای Si-O وجود دارند و پیک‌های مرتبط با گروه اپوکسی (C-O-C) در GPTMS در $1733, 1465, 1341$ مشاهده شدند [۱۶]. هنگامی که APTES از CFL و GPTMS در طی واکنش متراکم شدن به یکدیگر متصل می‌شوند چندین تغییر از نظر گروه‌های عاملی رخ می‌دهد (c).

گروه‌های سیلانول متراکم می‌شوند و پیوندهای Si-O-Si ایجاد می‌کنند پیک که در 1050 cm^{-1} ظاهر شده است نشان دهنده کشش نامتقارن پیوند Si-O-Si است. پیک مشاهده شده در 1790 cm^{-1} نشان دهنده تبدیل گروه‌های Si-OEt به Si-OH و پیوند Si-O-Si بیشتر به دلیل پیوند متقابل است. همچنین، پیک‌های مرتبط با گروه اپوکسی در نهایت حفظ شدند و نشان می‌دهد در طی فرایند سنتز حلقه اپوکسی باز نشده است [۱۶]. برای پوشش APTES با GPTMS، پیک 790 cm^{-1} و 880 cm^{-1} به ترتیب با Si-O-C (متقارن) و Si-OH مطابقت دارد. شدت پیک Si-OH برای پوشش با نسبت ۱:۱ حداکثر بود که نشان دهنده

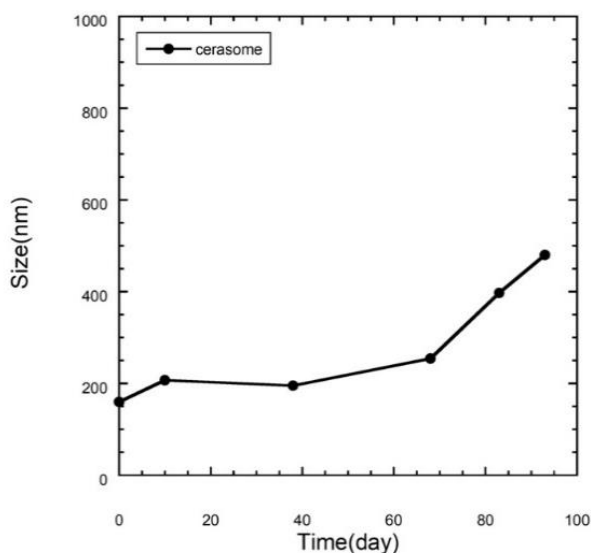
در حالی که، در شرایط بازی حمله نوکلئوفیلی توسط NH_2 آنتی بادی به حلقه اپوکسی (در کربن اتم C-N) انجام می شود و منجر به انتقال پروتون به آلکوکسی (-RO) می شود و الکل ختنی در پیوند آنتی بادی در زنجیره انتهایی ایجاد می شود. شکل ۶، باز شدن حلقه اپوکسی را در شرایط اسیدی و بازی نشان می دهد [۱۱]. با توجه به کدر شدن محلول در شرایط بازی پس از چند روز برای ادامه پروژه از حالت اسیدی استفاده شد.

برای تأیید اتصال لینکر GPTMS به آنتی بادی، طیف FT-IR آنتی بادی طبیعی و در اتصال با لینکر در pH های اسیدی و بازی بررسی شد. همانطور که در (شکل ۷) مشاهده می شود، پیک های مشخصه مربوط به کشش در 1648 cm^{-1} (C-O) و خمش N-H در 1540 cm^{-1} نشان دهنده پیوندهای آمیدی بین گروه های اپوکسی GPTMS و گروه آمینه انتهایی آنتی بادی می باشد. پیک های مشاهده شده در حدود 2830 cm^{-1} به کشش N-CH₂ نسبت داده می شود. نوارهای اطراف 1190 و 1077 cm^{-1} به دلیل کشش C-N است [۲۰-۱۷].

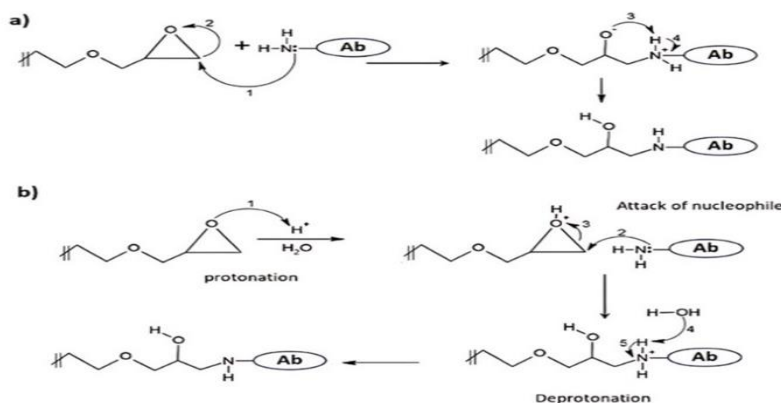
مهم است. برای بررسی پایداری سرازومها در مدت ۱۰۰ روز سایز ذرات حامل با روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS) اندازه گیری شد. نتایج نشان می دهد در طول ۶۵ روز سایز تقریباً ثابت است و پس از آن افزایش می یابد که نشان می دهد سرازوم سنتز شده پایداری قابل قبولی در مقابل دیگر نانوحاملها دارد (شکل ۵).

۳-۳ اتصال آنتی بادی به GPTMS

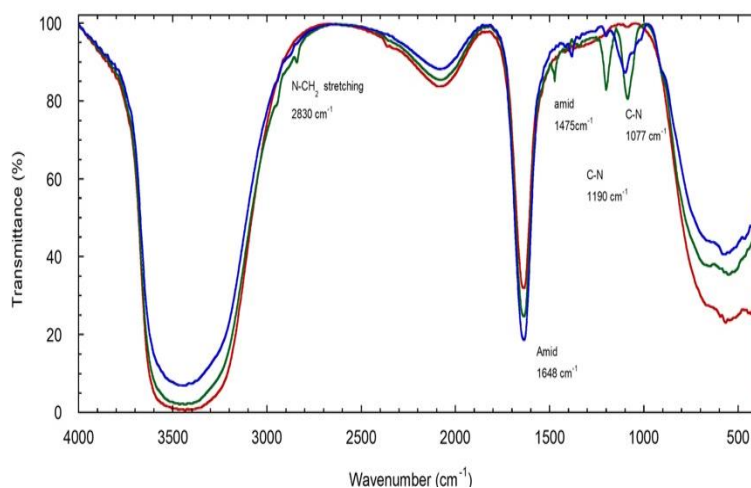
برای اتصال پیوند شیمیایی بین لیپیدهای سازنده سرازوم با گروه های NH_2 موجود در Fc آنتی بادی، می توان از لینکر GPTMS استفاده کرد. در این روش، ابتدا باید حلقه اپوکسی موجود در این لینکر باز شود که با تغییر pH به سمت اسیدی یا بازی، امکان پذیر می شود و سپس آنتی بادی از سمت گروه آمینی به حلقه اپوکسی باز شده متصل می شود. باز شدن حلقه در شرایط اسیدی در دو مرحله انجام می شود. ابتدا حلقه اپوکسی توسط H^+ پروتونه می شود. در مرحله بعد حمله نوکلئوفیلی از NH_2 آنتی بادی به اتم کربن-اکسیژن در حلقه اپوکسی رخ می دهد، حلقه باز شده و آنتی بادی به سطح متصل می شود.



شکل ۵ نمودار پایداری سرازومها در مدت زمان معین



شکل ۶ اتصال آنتی‌بادی از طریق باز شدن حلقه اپوکسی GPTMS در شرایط (a) بازی و (b) اسیدی [۱۱].



شکل ۷ طیف‌های FT-IR اتصال آنتی‌بادی به GPTMS در شرایط اسیدی و بازی

۳-۴ مشخصه‌یابی فیزیکوشیمیایی سرازوم-آنتی‌بادی

مطالعه قطر هیدرودینامیکی و پتانسیل زتای نانو حامل های سنتز شده به روش پراکنندگی دینامیکی نور (DLS)، می‌تواند اثبات کننده اتصال آنتی‌بادی به سطح آنها باشد. سرازوم حاوی APTES پتانسیل زتای منفی تری نسبت به لپیوزوم دارد، زیرا در لپیوزوم بار الکتریکی خنثی فسفولیپید DPPC بار کمی روی سطح ایجاد می‌کند. در مقابل سرازوم‌ها دارای پتانسیل زتا -23 میلی‌ولت بودند که نشان می‌دهد قسمت‌های تری‌اتوکسی سیلان CFL، هیدرولیز شده و دارای بار منفی تری هستند [۴]. همچنین، سایز این نانوذرات در حدود 150 نانومتر اندازه

گیری شد. در حالی که افزودن گروه سیلان GPTMS به علت خنثی بودن رینگ اپوکسی قرار گرفته در سطح سرازوم، پتانسیل زتای مثبت تری را نسبت به سرازوم سنتز شده با CFL ایجاد می‌کند. پتانسیل زتا در این حالت از 23 میلی‌ولت به 9 میلی‌ولت و سایز ذرات به 175 نانومتر خواهد رسید. به طوری که اندازه نانو حامل سرازوم در نسبت مولی (DPPC:CFL-GPTMS 1:1) در حدود $160 \pm 16/2$ نانومتر با پتانسیل زتای $9 \pm 1/3$ میلی‌ولت با شاخص پراکنندگی $0/259$ به دست آمد (شکل ۸).

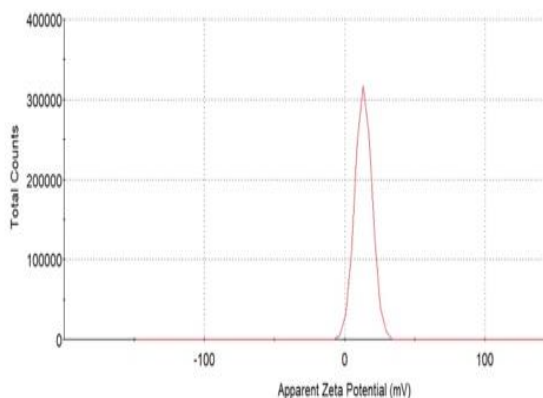
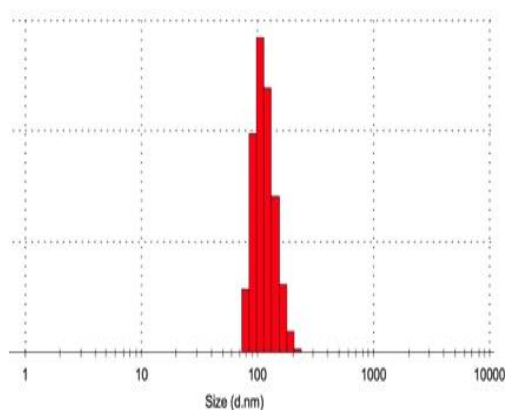
در ادامه پس از اتصال آنتی‌بادی به سطح سرازوم، سایز در حدود 60 نانومتر افزایش یافته [۲۱] و پتانسیل زتا به

متوسط هستند. تصاویر گرفته شده پس از اتصال آنتی بادی نشان می دهد که طی فرایند اتصال با تغییر pH سرازوم دچار از هم گسستگی نشده است و همچنان غشا دولایه به صورت محصور مشاهده می شود. اکثر سرازوم ها به صورت تکی هستند و تعدادی به صورت متصل به یکدیگر دیده می شوند که احتمالاً به علت نیروهای مویرگی (capillary force) در هنگام خشک شدن ایجاد شده اند [۲۲] (شکل ۹).

سمت مثبت تر شدن میل کرد که این افزایش سایز نشان دهنده اتصال آنتی بادی به سطح سرازوم است. تغییر پتانسیل زتا به علت تغییر در pH محیط به سمت اسیدی شدن بوده است (جدول ۱).

۳-۵. بررسی مورفولوژی سطح سرازوم

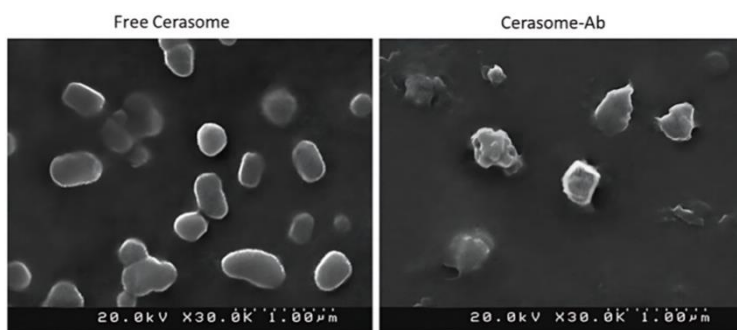
تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدان (FE-SEM) قبل از اتصال آنتی بادی نشان می دهد که سرازوم ها با یک غشا خود آرایبی شده و محصور تشکیل شده اند که کروی، دارای سطح یکنواخت و صاف با سایز کمتر از ۲۰۰ نانومتر هستند و دارای پراکنندگی



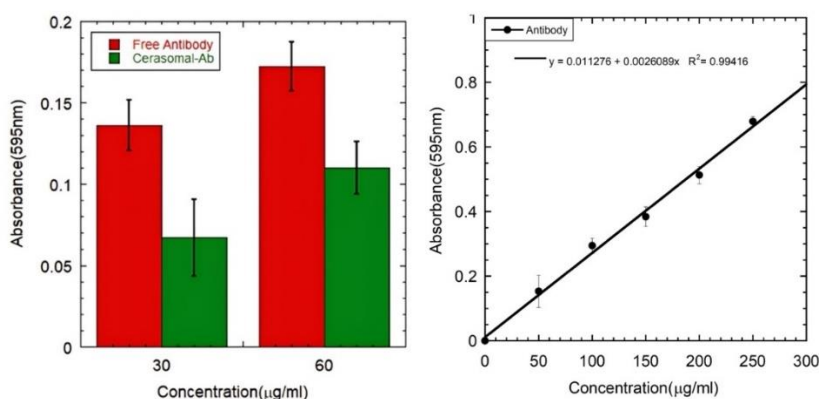
شکل ۸ نمودار سایز و پتانسیل زتا نانوحامل سرازوم قبل از اتصال آنتی بادی (این آزمایش شش بار تکرار شد)

جدول ۱ پتانسیل زتا و سایز نانوحامل سرازوم (DPPC: CFL-GPTMS 1:1) قبل و بعد از اتصال آنتی بادی

	قبل از اضافه کردن آنتی بادی	پس از اضافه کردن آنتی بادی
سایز (nm)	۱۶۰±۱۶۰	۱۵۶±۲۲۹
پتانسیل زتا (mV)	-۹±۱۳	۱۳/۵±۱/۲
شاخص پراکنندگی	۰/۰۲±۰/۲۵۹	۰/۰۲۴±۰/۳۵۱



شکل ۹ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدان (FE-SEM) از سرازوم سنتز شده قبل و بعد از اتصال آنتی‌بادی



شکل ۱۰ الف) منحنی کالیبراسیون آنتی‌بادی با معادله رگرسیون خطی $y = 0.02012 + 0.002560x$. ب) جذب آنتی‌بادی آزاد و متصل شده به سرازوم برای تعیین درصد اتصال آنتی‌بادی

بالاتر آنتی‌بادی‌ها منجر به درصد بیشتری از اتصال به سرازوم‌ها می‌شود. بازده اتصال مشاهده شده که در شکل ۱۰ به آن اشاره شده است با گزارش‌های منتشر شده قبلی مطابقت دارد. بنابراین، می‌توان استنباط کرد که آنتی‌بادی‌ها به‌طور موثری به سطوح نانوذرات در غلظت‌های آزمایش شده متصل شده‌اند و به سطح اتصال مناسب برای کاربردهای مورد نظر دست می‌یابند (شکل ۱۰) [۲۳].

۳-۷ اطمینان از اتصال آنتی‌بادی به سطح سرازوم

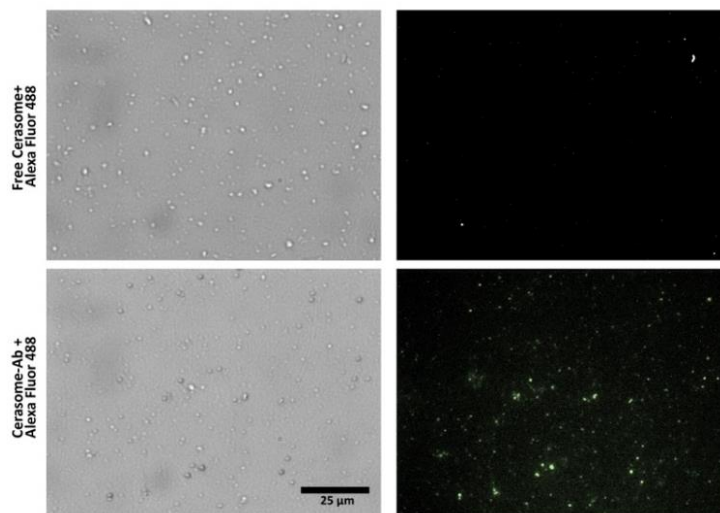
از آنتی‌بادی فلورسنت برای تأیید اتصال موفقیت‌آمیز آنتی‌بادی به سطح سرازوم استفاده شد. پس از اتصال آنتی‌بادی ثانویه Alexa Fluor488 به هرسپتین در عکس میکروسکوپ فلورسانس شکل ۱۰ مشاهده شد. شکل اول

۳-۶ میزان اتصال آنتی‌بادی به سرازوم

مقدار آنتی‌بادی متصل به سطح سرازوم‌ها با استفاده از روش برادفورد، که معمولاً برای کمی‌سازی پروتئین استفاده می‌شود، ارزیابی شد. برای این آزمایش، دو نسبت مختلف سرازوم‌ها به آنتی‌بادی‌ها آزمایش شد: ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰ در حالت اول با نسبت ۱:۵۰ از غلظت اولیه آنتی‌بادی ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از جذب نشان داد که نسبت آنتی‌بادی متصل به سرازوم به آنتی‌بادی استفاده شده تقریباً ۶۴ درصد محاسبه شد. در نسبت ۱:۱۰۰ با غلظت اولیه آنتی‌بادی ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تقریباً ۴۶ درصد راندمان اتصال را به همراه داشت. این یافته‌ها نشان می‌دهد که غلظت اولیه

تشخیصی را نشان نمی‌دهند. پس از اتصال آنتی‌بادی ثانویه سیگنال‌های نور سبز نشان می‌دهد که آنتی‌بادی فلورسنت ثانویه با موفقیت روی سرازوم تثبیت شده‌اند (شکل ۱۱) [۲۲].

ایمنوسرازومی است که با سایز بزرگتر نسبت به حالت عادی و با روش لایه نازک و اولتراسونیک سنتز شده تا سایز آن به گونه‌ای باشد که در محدوده حد تفکیک میکروسکوپ نوری باشد. سرازوم‌ها در اندازه ۱ میکرون به وضوح دیده می‌شوند و هیچ سیگنال فلورسانس قابل



شکل ۱۱ سرازوم‌های تنها و حاوی آنتی‌بادی پس از اتصال آنتی‌بادی ثانویه

مقایسه با پگیله‌سازی که شامل اتصال یک پلیمر به آنتی‌بادی است، پیوند GPTMS معمولاً مولکول‌های کوچک تری را شامل می‌شود و می‌تواند منجر به کاهش ایمنی زایی شود. این موضوع در کاربردهای درمانی که به حداقل رساندن پاسخ‌های ایمنی و اثربخشی مفید است. پیوند GPTMS به‌طور کلی با طیف گسترده‌ای از آنتی‌بادی‌ها و فرمولاسیون‌های لیپوزوم سازگار است و آن را برای کاربردهای مختلف در دارورسانی، تشخیص و درمان مناسب می‌کند [۱۰].

روش پگیله کردن دارای محدودیت‌هایی مانند تغییر بالقوه خواص اتصال آنتی‌بادی، تنوع در محل‌های اتصال و پیچیدگی در فرایندهای خالص‌سازی می‌باشد. علاوه بر این، این روش‌ها ممکن است همان سطح ثبات، کنترل جهت‌گیری و تطبیق‌پذیری را به‌عنوان پیوند GPTMS

۴- بحث

استفاده از لینکری مانند ۳-گلایسیدوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان-GPTMS برای اتصال آنتی‌بادی به سطح لیپوزوم مزایای متعددی را در مقایسه با پگیله کردن (پلی اتیلن گلیکول) یا فعال کردن آنتی‌بادی با استفاده از معرف‌هایی مانند Traut دارد. معرف Traut شامل یک گروه ایمیدواستر است که با آمین‌های اولیه در پروتئین‌ها واکنش می‌دهد و ترکیبات افزایشی تیول پایدار را تشکیل می‌دهد [۲۴]. گروه سیلانی GPTMS با دارا بودن حلقه اپوکسی یک پیوند کووالانسی پایدار بین آنتی‌بادی و سطح لیپوزوم ایجاد می‌کند. این پیوند باعث می‌شود که آنتی‌بادی در طول ذخیره‌سازی، جابه‌جایی و در شرایط فیزیولوژیکی مختلف به سطح چسبیده باقی بماند و در نتیجه مجموعه آنتی‌بادی-سرازوم را حفظ می‌کند. در

سرازوم به‌علت وجود سیلیس در سطح آن، باعث پایداری بیشتر و افزایش مدت زمان رهایش دارو می‌شود. عملکرد زیستی سرازوم‌ها با بررسی حضور آنتی‌بادی‌ها بر روی سطح سرازوم استفاده از میکروسکوپ فلورسانس و انجام تست بردفورد تأیید شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی، هیچ تغییر آشکاری در اندازه و شکل سرازوم‌های عامل‌دار در مقایسه با نمونه‌های اصلاح‌نشده نشان نداد، که نشان‌دهنده یکپارچگی سرازوم‌های عامل‌دار است. این روش عملکردی، به‌طور کلی، به استفاده از نوع خاصی از آنتی‌بادی‌ها محدود نمی‌شود. بنابراین، روشی که در اینجا توضیح داده شده است می‌تواند برای ایجاد سرازوم‌های عامل‌دار و متناسب با هر نوع سلول هدف با تثبیت آنتی‌بادی‌های ضد گیرنده مناسب استفاده شود.

۶- منابع

- [1] Debien V, De Caluwé A, Wang X, Piccart-Gebhart M, Tuohy VK, Romano E, et al. Immunotherapy in breast cancer: an overview of current strategies and perspectives | npj Breast Cancer. npj Breast Cancer. 2023 Feb 13;9(1):7.
- [2] Nolan E, Lindeman GJ, Visvader JE. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. Cell. 2023 Apr 13;186(8):1708-28
- [3] Vaezi Z, Sedghi M, Ghorbani M, Shojaeilangari S, Allahverdi A, Naderi-Manesh H. Investigation of the programmed cell death by encapsulated cytoskeleton drug liposomes using a microfluidic platform. Microfluid Nanofluid. 2020 Jun 4;24(7):48.
- [4] Mortazavi SMR, Vaezi Z, Mahdavian R, Barzegar M, Naderi-Manesh H. A novel cerasomal gallic acid as a non-ulcerogenic agent with an improved anti-inflammatory potential. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2023 Sep 1;86:104610.
- [5] Bahri S, Abdollahizad E, Mahlooji I, Rezaee E, Abbasian Z, Dadashzadeh S. Cerasome Versus Liposome: A Comparative Pharmacokinetic Analysis Following Intravenous Administration into Rats. Iran J Pharm Res [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 4]; In Press (In Press). Available from:

برای اتصال آنتی‌بادی‌ها به لیپوزوم‌ها ارائه ندهند. روش‌های کونژوگه مبتنی بر لینکر در مقایسه با روش‌های فعال‌سازی شیمیایی، مانند معرف Traut می‌توانند مقیاس‌پذیرتر و تکرارپذیرتر باشند. این امر، به‌ویژه برای تولید در مقیاس بزرگ مجتمع‌های آنتی‌بادی-لیپوزوم برای تحقیقات یا کاربردهای بالینی مهم است. سازگاری با آنتی‌بادی‌های مختلف هم موضوع قابل توجهی است. مولکول‌های پیوند دهنده (مثل GPTMS) را می‌توان برای سازگاری با انواع مختلف آنتی‌بادی‌ها، از جمله آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، پلی‌کلونال یا مهندسی شده با تغییرات خاص، استفاده کرد. این تطبیق‌پذیری اجازه می‌دهد تا طیف وسیعی از آنتی‌بادی‌ها به لیپوزوم‌ها برای کاربردهای مختلف متصل شوند. به‌طور کلی، استفاده از لینکری مانند GPTMS برای کونژوگاسیون آنتی‌بادی به لیپوزوم‌ها مزایایی از نظر ویژگی، پایداری و تکرارپذیری در مقایسه با روش‌های فعال‌سازی شامل معرف‌های شیمیایی مانند معرف Traut ارائه می‌دهد. این مزایا، کونژوگاسیون با واسطه پیوند دهنده را برای بسیاری از کاربردها در دارورسانی، تشخیص و درمان به یک انتخاب برتر تبدیل می‌کند. استفاده از GPTMS به‌عنوان یک پیوند دهنده برای اتصال آنتی‌بادی‌ها به سطح لیپوزوم‌ها مزایایی را از نظر ویژگی، پایداری، جهت‌گیری کنترل شده، کاهش ایمنی‌زایی، خواص قابل تنظیم و سازگاری با تکنیک‌های بیوکونژوگاسیون ارائه می‌دهد که آن را به یک رویکرد امیدوارکننده برای کاربردهای دارورسانی هدفمند تبدیل می‌کند. همچنین، نانوذرات سرازومی سنتز شده در این مطالعه در مقایسه با نانوحامل‌های مایسلی که توسط روتوجا چوگله و همکارانش ساخته شده است، پایداری طولانی مدت بهتر و رهایش طولانی مدت تری دارد [۲۵].

۵- نتیجه‌گیری

دسته جدیدی از حامل‌های سرازومی با آنتی‌بادی هرسپتین عامل‌دار و برای دارورسانی هدفمند سنتز شدند. استفاده از

- et al. Specific delivery of idarubicin to HER2-positive breast cancerous cell line by trastuzumab-conjugated liposomes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018 Oct 1; 47:209–14.
- [15] Fathian kolahkaj F, Derakhshandeh K, Khaleseh F, Azandaryani AH, Mansouri K, Khazaei M. Active targeting carrier for breast cancer treatment: Monoclonal antibody conjugated epirubicin loaded nanoparticle. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019 Oct 1;53:101136.
- [16] Jain R. Waterborne inorganic-organic hybrid coatings on magnesium by sol-gel route. 2015 Jul.
- [17] Haghghi AH, Khorasani MT, Faghhi Z, Farjadian F. Effects of different quantities of antibody conjugated with magnetic nanoparticles on cell separation efficiency. *Heliyon*. 2020 Apr 1;6 (4):e03677.
- [18] Design, fabrication and performance evaluation of interdigital capacitive sensor for detection of Cardiac Troponin-I and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 | IEEE Conference Publication | IEEE Xplore [Internet]. [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/7370209>
- [19] Almaki JH, Nasiri R, Idris A, Majid FAA, Salouti M, Wong TS, et al. Synthesis, characterization and in vitro evaluation of exquisite targeting SPIONs-PEG-HER in HER2+ human breast cancer cells. *Nanotechnology*. 2016 Feb;27(10):105601.
- [20] Monoclonal Antibody-Conjugated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Cells and Gliomas - Ketao Mu, Shun Zhang, Tao Ai, Jingjing Jiang, Yihao Yao, Lingyu Jiang, Qing Zhou, Hongbing Xiang, Yanhong Zhu, Xiangliang Yang, Wenzhen Zhu, 2015 [Internet]. [cited 2024 May 13]. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.2310/7290.2015.00002>
- [21] PD-L1 monoclonal antibody-decorated nanoliposomes loaded with Paclitaxel and P-gp transport inhibitor for the synergistic chemotherapy against multidrug resistant gastric cancers | Discover Nano [Internet]. <https://brieflands.com/articles/ijpr-138362.html#abstract>
- [6] Hashizume M, Kawanami S ichi, Iwamoto S, Isomoto T, Kikuchi J ichi. Stable vesicular nanoparticle ‘Cerasome’ as an organic-inorganic hybrid formed with organoalkoxysilane lipids having a hydrogen-bonding unit. *Thin Solid Films*. 2003 Aug 22;438-439:20–6.
- [7] Immordino ML, Brusa P, Arpicco S, Stella B, Dosio F, Cattel L. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel. *Journal of Controlled Release*. 2003 Sep 4;91(3):417–29.
- [8] Cheon JW, Kim IJ, Kim JH, Jang JW, Lee DJ, Mun SY, et al. Silica-polyethersulfone core-shell nanoparticles as multifunctional filler for marine applications. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2022 Jan 1;152:106721.
- [9] Gaur S, Nigam S, Khanna A, Raman RK. Silane-Coated Magnesium Implants with Improved *In-Vitro* Corrosion Resistance and Biocompatibility. *Journal of Materials Science & Surface Engineering*. Vol. 4 (5), 2016, pp 415–424.
- [10] Monteiro DA, Gozzi G, Chinaglia DL, Oliveira ON, de Vicente FS. Proton conduction mechanisms in GPTMS/TEOS-derived organic/silica hybrid films prepared by sol-gel process. *Synthetic Metals*. 2020 Sep 1;267:116448.
- [11] The Effect of pH Immobilization of Antibody-B on the GPTMS Functionalized Filter Paper for Detect Antigen B on the Red Blood Cell Surface | Thai Journal of Nanoscience and Nanotechnology [Internet]. 2021 [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://ph05.tcithaijo.org/index.php/TJNN/article/view/72>
- [12] Cao Z, Ma Y, Yue X, Li S, Dai Z, Kikuchi J. Stabilized liposomal nanohybrid cerasomes for drug delivery applications. *Chem Commun*. 2010 Jul 14; 46 (29):5265–7.
- [13] Martinelli C, Pucci C, Ciofani G. Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy. *APL Bioengineering*. 2019 Mar;3(1):011502.
- [14] Amin M, Pourshohod A, Kheirollah A, Afrakhteh M, Gholami-Borujeni F, Zeinali M,

No 4 [Internet]. [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08982104.2017.1370471>

[24] Raikwar S, Yadav V, Jain S, Jain SK. Antibody-conjugated pH-sensitive liposomes for HER-2 positive breast cancer: development, characterization, in vitro and in vivo assessment. *Journal of Liposome Research*. 2023;0(0):1–25.

[25] Chougale R, Patil K, Disouza J, Hajare A, Jadhav N, Kumbhar P. Development of docetaxel-loaded (Soluplus®-PF108) mixed micelles vacuum foam-dried product for improved stability and melanoma treatment by QbD approach. *Futur J Pharm Sci*. 2024 Apr 2;10(1):54.

2020 [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s11671-019-3228-z>.

[22] Stamm MT, Zha Z, Jiang L, Dai Z, Zohar Y. Functionalization of ceramic liposomal nanoparticles, cerasomes, with antibodies. In: 2011 16th International Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference [Internet]. 2011 [cited 2023 Oct 2]. p. 1614–7. Available from: <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/5969803>

[23] Docetaxel-loaded nanostructured lipid carriers functionalized with trastuzumab (Herceptin) for HER2-positive breast cancer cells: *Journal of Liposome Research*: Vol 28,

Cerasome-Antibody: A smart Nanocarrier toward Diagnostic and Delivery Applications

Maryam Vesal^{*1}, Zahra Vaezi², Abdollah Allahverdi^{*1}, Hossein Naderi-Manesh¹

1. Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Department of bioactive compounds, Faculty of Interdecipnary Technologies, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

a-allahverdi@modares.ac.ir, Zahra.vaezi@modares.ac.ir

Receipt: 2024/05/26

Accepted: 2024/08/24

Abstract

In recent years, targeted drug delivery systems have emerged as a promising approach to increase the efficacy of therapeutic agents while minimizing side effects. Cerasomes are specialized liposomes characterized by covalent siloxane networks on their surface, which provide exceptional morphological stability while retaining the beneficial properties of traditional liposomes. Cerosomes provide a unique platform for drug encapsulation and delivery due to their biocompatibility, stability, controllable release, and suitability for long-term storage. This research aims to engineer the surface of cerasomes to improve the selectivity and efficiency of drug delivery .

The Herceptin antibody is strategically placed on the surface of the serosa, enabling precise targeting of HER2+ cells. The physicochemical characteristics of the antibody-functionalized cerasomes were determined, revealing a size of 229 ± 15.6 nm and a 13.5 ± 1.2 mV. Results from infrared (IR) and fluorescence spectroscopy demonstrated that the antibody was successfully attached to the cerasome's surface, achieving a binding efficiency of 64%. These findings elucidate the fundamental mechanisms underlying the synthesis of immunocerasomes and provide a valuable framework for future advancements in targeted drug delivery systems.

Keywords: cerasome, antibody, targeted drug delivery, breast cancer