

Toxicity and bioactivity evaluation of interferon alpha-2b conjugated with solid lipid nanoparticles

Delaram Doroud¹, Marjan Khatami², Nasim Rahmani³, Maryam Shahali⁴, Ariana Alavi⁵, Mohammad Hossein Hedayati⁶

¹ Associate Professor, PhD in Pharmaceutical Sciences, Production & Research Complex, Tehran, Iran

² MsC in Biochemistry, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

³ Pharm.D, Pharmaceutics and Drug Delivery Systems Laboratory, Production & Research Complex, Tehran, Iran

⁴ Assistant Professor, PhD in Molecular Genetics, Production & Research Complex, Tehran, Iran

⁵ BSc in Biotechnology, Pharmaceutics and Drug Delivery Systems Laboratory, Production & Research Complex, Tehran, Iran

⁶ PhD in Medicine Biotechnology, Production & Research Complex, Tehran, Iran

Abstract

Background: Interferon (IFN) are small proteins that belong to the cytokine family and may interfere with viral infections and some cancers. There are many studies focused on the PEGylated interferon's bioactivity. In this study, we used solid lipid nanoparticles (SLNs) to produce new drug formulations, with the aim of reducing costs, increasing effectiveness, and also reducing side effects, and the biological effects of the formulation and comparing the obtained results with the interferon alpha-2b and PEGylated interferon alpha-2b.

Materials and methods: In this study, we evaluated the toxicity and bioactivity of three formulations: interferon alpha-2b, PEGylated interferon alpha-2b, and encapsulated interferon alpha-2b with solid lipid nanoparticles using the MTT method and cytopathic inhibition assay (CPE), respectively.

Results: The toxic effects of interferon encapsulated solid lipid nanoparticle (SLN-INF) was comparable with interferon and PEGylated interferon. In addition, empty solid lipid nanoparticles had no toxic effects on cells. The SLN-INF showed higher bioactivity than the other samples tested (interferon alpha-2b, PEGylated interferon alpha-2b) and maintained its bioactivity over time.

Conclusion: The results of this study indicate that interferon alpha-2b conjugated with solid lipid nanoparticles is a capable formulation with sufficient bioactivity and acceptable toxicity as compared to PEGylated interferon and can be applied in clinical trials in future studies.

Keywords: *Interferon alpha-2b, Solid lipid nanoparticles (SLN), Bioactivity.*

Cited as: Doroud D, Khatami M, Rahmani N, Shahali M, Alavi A, Hedayati MH. Toxicity and Bioactivity evaluation of Interferon alpha-2b conjugated with solid lipid nanoparticles. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 32(3): 246-255.

Correspondence to: Delaram Doroud

Tel: +98 912-3107327

E-mail: d_doroud@yahoo.com

ORCID ID: 0000-0003-4167-9921

Received: 29 Oct 2020; **Accepted:** 9 May 2022

بررسی سمیت و فعالیت زیستی نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اینترفرون آلفا- ۲بی (IFN α -2b)

دلارام درود^۱، مرجان خاتمی^۲، نسیم رحمانی^۳، مریم شاهعلی^۴، آریانا علوی^۵، محمدحسین هدایتی^۶

^۱ دانشیار، دکتری تخصصی فارماسیوتیکس، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور، تهران، ایران

^۲ کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

^۳ دکتری عمومی داروسازی، آزمایشگاه فارماسیوتیکس و سامانه های دارورسان، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور، تهران، ایران

^۴ استادیار، دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور، تهران، ایران

^۵ کارشناس بیوتکنولوژی. آزمایشگاه فارماسیوتیکس و سامانه های دارورسان، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور، تهران، ایران

^۶ دکتری تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: اینترفرون‌ها (IFN) گروهی از سایتوکاین‌ها با توانایی مداخله در فعالیت ویروسی هستند. مطالعات زیادی در رابطه با سمیت و تعیین فعالیت زیستی آنها انجام گرفته است. در این مطالعه از نانوذرات لیپیدی جامد جهت تولید فرمولاسیون دارویی نوین با هدف کاهش هزینه، افزایش اثربخشی و همچنین کاهش عوارض جانبی مورد استفاده قرار گرفت و اثرات زیستی فرمولاسیون لیپیدی جامد حاوی اینترفرون آلفا-۲بی در شرایط برون تن بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه سمیت و فعالیت زیستی داروی اینترفرون آلفا-۲بی کپسوله شده با نانوذرات جامد (SLN) به ترتیب با روش تست MTT و سنجش مهار اثر سایتوپاتیک (CPE) بررسی شد و مقایسه اجمالی با اینترفرون آلفا-۲بی و اینترفرون آلفا پگیله شده صورت گرفت. یافته‌ها: اینترفرون کپسوله شده با نانوذرات لیپیدی جامد (SLN-INF) در برابر اینترفرون و اینترفرون پگیله شده تفاوت معنی داری از لحاظ سمیت نداشت. همچنین SLN-INF زیستی بالاتری نسبت به بقیه نمونه های مورد آزمایش نشان داد و فعالیت زیستی آن با گذشت زمان حفظ شد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که اینترفرون آلفا-۲بی کونژوگه شده با نانو ذرات لیپیدی جامد، فعالیت زیستی اینترفرون آلفا را حفظ می‌کند و با توجه به سمیت کم آن می‌تواند فرمولاسیون مطلوبی جهت انجام مطالعات بیشتر در بالین باشد.

واژگان کلیدی: اینترفرون آلفا-۲بی، نانوذرات لیپیدی جامد، SLN، فعالیت زیستی.

مقدمه

انجمن بین المللی تحقیقات اینترفرون و سایتوکاین (The International Society for interferon and cytokine Research (ISICR) سه دسته اصلی از اینترفرون انسانی وجود دارد. نوع یک اینترفرون‌ها شامل اینترفرون آلفا (IFN- α) و اینترفرون بتا (IFN- β) به وسیله بیشتر سلول‌ها در پاسخ مستقیم به عفونت ویروسی تولید می‌شوند. اینترفرون گاما (IFN- γ) تنها اینترفرون شناخته شده از نوع دو اینترفرون‌ها است که به طور وسیعی توسط سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و سلولهای T فعال شده در پاسخ به سلول‌های عفونی

اینترفرون‌ها (IFN) پروتئین‌های دارای فعالیت زیستی هستند که توسط سیستم ایمنی بدن همه گونه‌های پستانداران جهت دفاع در مقابل عفونت ویروسی تولید می‌شوند. بر طبق تعریف

آدرس نویسنده مسئول: تهران، مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، دلارام درود

(email: d_doroud@yahoo.com)

ORCID ID: 0000-0003-4167-9921

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۱۰/۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۲/۱۹

شده به ویروس سنتز می‌شوند. اینترفرونهای لاندا (IFN- λ) که اینترفرونهای ۲۸ و ۲۹ (IL-28, IL-29) نیز نامیده می‌شوند، جزو اینترفرون‌های نوع سه هستند که به عنوان خط اول دفاع ضد ویروسی فعالیت دارند (۱).

اینترفرون‌ها بیش از ۵۰ سال به عنوان مهار کننده تکثیر ویروس آنفلانزا کاربرد داشته‌اند. امروزه، اینترفرون‌ها در درمان بیماری‌های مختلف، از جمله سرطان‌های متعدد و مالتیپل اسکلروزیس مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر این، این سایتوکاین در حال حاضر در درمان عفونت ناشی از ویروس هپاتیت C (HCV) استفاده می‌شود (۲).

امروزه اینترفرون نو ترکیب برای درمان هپاتیت و ویروس‌های دیگر و چند نوع سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. اینترفرون‌های آلفا علیه هپاتیت B (HBV)، هپاتیت C (HCV)، ویروس پاپیلوماوی انسانی (HPV)، هرپس سیمپلکس یا ویروس ساده تبخال (HSV) و ویروس سیتومگال (CMV)، ویروس حفره دهان (VSV)، ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) و ویروس‌های دستگاه عصبی مانند راینوویروس، آدنوویروس، کروناویروس فعال هستند و اینترفرون بتا به عنوان درمان برای مولتپل اسکلروز استفاده می‌شود (۳، ۴).

تعیین فعالیت زیستی یکی از آزمون‌های مهم در ارزیابی کیفی این دارو است. یکی از روش‌های اندازه‌گیری فعالیت اینترفرون‌ها در شرایط برون تن بررسی توانایی القای حالت ضدویروسی در سلول‌های مستعد برای ایجاد داده‌های دوز-پاسخ است. استفاده از رده‌های سلولی حساس در ترکیب با ویروس سایتوپاتیک مناسب، روش موثری را برای اندازه‌گیری فعالیت ضدویروسی فراهم می‌کند. مطالعات زیادی بر روی اینترفرون‌های مختلف با روش‌ها و فرآیندهای متفاوت و سلول‌ها و ویروس‌های مختلف صورت گرفته است که همگی موید این موضوع است که فعالیت ضدویروسی اینترفرون‌ها متغیر است و بستگی به چند عامل از جمله نوع سلول (حضور رسپتور اختصاصی اینترفرون بر سطح سلول) و نوع ویروس استفاده شده برای عفونی کردن سلول‌ها دارد (۵).

دوز مهار وابسته به رشد سلول در رده‌های سلولی حساس تاکنون به عنوان یک گزینه برای ارزیابی پتنتسی اینترفرون، پیشنهاد شده است. به علاوه روش‌هایی بر پایه اصول بیان پروتئین اینترفرون القایی مانند تشخیص پروتئین‌های سطح سلول مانند آنتی‌ژن‌های کلاس یک و دو (Major MHC) و دیگر مولکول‌های چسبیده (histocompatibility complex) به داخل سلول توسعه پیدا کرده‌اند (۶).

جهت بهبود خواص فارماکوکینتیکی اینترفرون‌ها مانند بهبود حلالیت و افزایش پایداری آن در بدن، فرم پگیله این مولکول توسعه و پس از مطالعات پیش بالینی، بالینی و پایداری توسط سازمان غذا و داروی آمریکا مورد تایید قرار گرفته است. در بازار دارویی ایران نیز داروی پگ اینترفرون آلفا-۲بی با نام‌های تجاری Redipen، PegIntron و Sylatron موجود است.

پگیلاسیون به فرایند اتصال پلیمر سنتتیک پلی اتیلن گلیکول (PEG) به صورت شیمیایی در شرایط برون تنی جهت افزایش نیمه عمر پروتئین و پپتیدهای دارویی کوچک نظیر اینترفرون می‌گویند. پلی اتیلن گلیکول پلیمری است که حلالیت آن در آب زیاد است و در صورت اتصال به پروتئین دارویی باعث افزایش حجم هیدرودینامیکی بیومولکول‌های فعال از لحاظ دارویی و در نتیجه تاخیر در فیلتراسیون گلومرولی می‌شود که به نوبه خود سبب افزایش نیمه عمر پروتئین نسبت به فرم غیرپگیله در محیط بیولوژیک می‌شود. این پدیده وابسته به طول زنجیره پلی اتیلن گلیکول است و بر اساس تاثیر بر افزایش اندازه بیوفیزیکی بیومولکول تخمین زده خواهد شد (۷). استفاده از این فرآورده با همراهی خوب بیمار توام خواهد بود. زیرا با افزایش نیمه عمر دارو و کاهش تعداد دفعات تزریق آن بیمار میل بیشتری به ادامه درمان و همراهی با کادر پزشکی خواهد داشت. مضاف بر اینکه هزینه درمان نیز به طور قابل توجهی کاهش خواهد یافت. با وجود اینکه در ابتدا روش پگیلاسیون موثر و ساده به نظر می‌رسد، ولی معایب بسیاری را نشان داده است که باعث محدودیت در کاربرد دارویی آن شده است. از جمله معایب فرمولاسیون‌های پگیله می‌توان به ایجاد واکنش شیمیایی در شرایط برون تنی و امکان تغییرات فیزیکوشیمیایی بر روی پروتئین مورد نظر، کاهش فعالیت زیستی، هزینه بالای تولید، ایمونوژنیسیته مولکول پلی اتیلن گلیکول و عدم زیست تخریب پذیری این پلیمر، تجمع بافتی و واکنش‌ها شدن توبولار کلیوی اشاره کرد (۸). لذا تحقیقاتی در راستای استفاده از فرمولاسیون‌های دارویی نوین برای جایگزینی روش قبلی با هدف کاهش هزینه، افزایش اثر بخشی و همچنین کاهش عوارض جانبی صورت گرفته است. در سال‌های اخیر، توجه فراوانی به تهیه نانوذرات به عنوان حامل‌هایی برای دارورسانی شده است. حامل‌های نانویی با تغییر خصوصیات فارماکوکینتیک دارو باعث بهبود عملکرد دارو و کاهش عوارض جانبی آن می‌شوند. در ساخت نانوذرات به منظور انتقال داروها، از مواد مختلفی مانند پلیمرها، ذرات فلزی، لیپیدها استفاده می‌شود که بسته به روش تولید آنها می‌توان شکل و اندازه متفاوتی از ذرات را تولید کرد (۹).

از شرکت Gibco، آنزیم تریپسین، آنتی بیوتیک جنتامایسین، رنگ تریپان بلو، دی متیل سولفوکساید، پودر MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) و رنگ آمیدو بلاک مورد استفاده قرار گرفت. این پژوهش در آزمایشگاه فارماسیوتیکس و سامانه های دارورسان مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران انجام شد.

آماده سازی اینترفرون بار گذاری شده در نانو ذره جامد با تکنیک میکروامولسیون (SLN-IFN1)

لیپید استئاریک اسید تا دمای ۸۵ درجه سانتی گراد گرم و توپین ۸۰ (سورفاکتانت) به لیپید ذوب شده، اضافه شد تا زمانی که محلول شفاف به دست آمد. فاز مایع حاوی اینترفرون با غلظت نهایی ۴/۳ میکروگرم/میلی لیتر به لیپید ذوب شده در حال هم خوردن اضافه شد و امولسیون اولیه آب در روغن (W/O) تشکیل شد. امولسیون با دستگاه هموژنایزر با برش بالا به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه هموژن گردید. نانو امولسیون حاصل فوراً در آب مقطر سرد در حال هم خوردن اضافه شد تا نانوذرات تحت فرمولاسیون امولسیون چندگانه آب در روغن در آب (W/O/W) تهیه شود (۱۳).

بلانک SLN نیز به عنوان کنترل به روش فوق تهیه شد. با این تفاوت که فاز آبی آن فاقد دارو است و فقط حاوی آب مقطر تزریقی است.

آماده سازی اینترفرون بارگذاری شده در نانو ذره جامد با تکنیک تبخیر حلال (SLN-IFN2)

لیپید استئاریک اسید در مقداری استون در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد بن ماری حل شد و به فاز مایع، ۴۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حاوی توپین ۸۰ (سورفاکتانت) و اینترفرون لیوفیلیزه با غلظت نهایی ۴/۳ میکروگرم/میلی لیتر، بر روی همزن مغناطیسی با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه اضافه شد؛ در این حالت حلال آلی (استون) روی همزن مغناطیسی تبخیر می شود. امولسیون حاصل با سرعت ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه به وسیله دستگاه هموژنایزر با برش بالا به مدت ۲۰ دقیقه هموژن گردید و نانوامولسیون حاصل به سرعت به آب مقطر دو بار تقطیر در دمای ۵-۲ درجه سانتی گراد اضافه شد و نانوامولسیون تشکیل گردید (۷).

تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات سنتز شده
جهت بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی ذرات سنتز شده سایز، شاخص پلی دیسپرسیته (PDI) و پتانسیل زتای ذرات تعیین شد. برای تعیین پتانسیل زتا از دستگاه زتا سایزر (Malvern, UK) استفاده شد. جهت بررسی سایز SLN، نمونه

نانوذرات لیپیدی جامد، Solid Lipid Nanoparticles یا SLNها از یک ماتریکس لیپیدی جامد متشکل از تری گلیسریدها، لیپیدها، اسیدهای چرب، استروئیدها و مومها تشکیل شده اند و اندازه ای کمتر از یک میکرومتر دارند. به منظور افزایش پایداری این ذرات باید در فرمولاسیون آنها از ترکیبات سورفاکتانتی استفاده شود. از این نانوذرات می توان به منظور بارگیری و حمل داروهایی با محلولیت بسیار کم در محیط آبی استفاده کرد و آنها را در مدت زمان مشخص آزاد، و با کمک روش های مختلف نظیر روش های خوراکی، تزریقی به موضع مورد نظر رسانید (۱۰).

نانوذرات لیپیدی جامد برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ به عنوان جایگزینی برای حامل های کلونیدی معمولی مثل امولسیون ها و نانوذرات بسپاری (polymeric) معرفی شد. نانوذرات لیپیدی جامد، حامل های کلونیدی با اندازه ای بین ۵۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر هستند که از لیپیدهای زیستی که در فاز مایه پراکنده شده اند تشکیل می شوند. برای غلبه بر مشکلات مربوط به حضور چربی در فاز مایه به جای روغن های مایع از ذرات جامد لیپیدی استفاده می شود. ماده فعال مورد نظر مانند دارو را در حین ساخت همراه با فاز لیپیدی ذوب یا مخلوط نموده و به فاز مائی می افزایند. به این ترتیب دارو وارد ساختار نانوذرات می شود (۱۱، ۱۲).

در این پژوهش تولید فرمولاسیون جدید اینترفرون آلفا با رویکرد بارگذاری در نانو ذرات لیپیدی جامد با هدف تعیین اثر پارامترهای عملیاتی تولید بر سمیت فرمولاسیون، تعیین فعالیت زیستی و فعالیت ویژه فرمولاسیون بهینه و مقایسه فرمولاسیون بهینه با فرمولاسیون های رایج آن مانند اینترفرون پگیله انجام شد.

مواد و روشها

در این پژوهش از اینترفرون آلفا-۲ بی تهیه شده از انستیتو پاستور ایران و اینترفرون آلفا پگیله شده اهدایی از شرکت پایا قصد دارو، رده سلولی سرطان حنجره انسان Hep2 به همراه رده سلولی فیروبلاست موشی L929 تهیه شده از بانک سلولی مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتو پاستور و ویروس Mengo که به عنوان Encephalomyocarditis virus (EMCV) نیز شناخته شده است استفاده گردید. همچنین محیط کشت های RPMI (Roswell Park Memorial) و DMEM (Dulbecco's Modified Institute Medium) و Eagle Medium (Eagle Medium) و سرم گاوی FBS (Fetal Bovine Serum)

$$\text{Lnc} = \text{InC} \cdot \text{Kt}$$

C = مقدار اینترفرون کل موجود در سیستم در زمان صفر

C = مقدار اینترفرون موجود در سیستم در زمان

t = زمان

K = ثابت سرعت آزادسازی درجه یک

برای محاسبه مدل کینتیک هیگوجی از معادله زیر استفاده شد:

$$C = Kt \frac{1}{\gamma}$$

در این مدل نمودار مقدار داروی تجمعی حل شده در برابر جذر زمان، خط مستقیم با شیب مثبت می باشد که مقدار شیب بدست آمده برابر با ثابت سرعت هیگوجی است.

روش بررسی الگوی رهایش دارو

برای بررسی الگوی رهایش اینترفرون از روش دیالیز استفاده شد. به این منظور کیسه دیالیز با مقدار مشخصی از نانوذرات حاوی اینترفرون انباشته شده و در بافر فسفات حاوی ۰.۰۲٪ سدیم آزید با pH معادل ۷/۴ قرار داده شد. این مجموعه در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و نمونه برداری از بافر فسفات در زمان‌های ۲، ۴، ۸، ۱۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده می توان نمونه برداری را تا ۷ هفته ادامه داد. میزان اینترفرون در نمونه های تهیه شده به روش برادفورد سنجش شد. منحنی آزادسازی به صورت تجمعی (درصد وزنی وزنی) ترسیم شد. به عنوان کنترل همین شرایط آزادسازی برای اینترفرون فرموله شده با بافر به عنوان استاندارد تکرار شد.

بررسی سمیت سلول

برای بررسی سمیت سلول از نمک MTT که محلول در آب و زرد رنگ است و توسط دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده به فورمازان بنفش رنگ غیر محلول در آب تبدیل می شود، استفاده گردید. میزان رنگ بنفش تولید شده متناسب با تعداد سلول‌های زنده است (۱۴). در این تست از سلول‌های L929 استفاده گردید و به محیط کشت چاهک‌های حاوی سلول‌های کشت داده شده، غلظت‌های مختلفی از فرمولاسیون‌های مورد نظر اضافه شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در رطوبت ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪ قرار گرفت. برای کنترل منفی، بخشی از سلول‌ها بدون تیمار انکوبه شدند. پس از گذشت زمان مورد نظر، MTT حل شده در بافر فسفات به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت در فویل پیچیده شده و به مدت ۲۰ دقیقه به آرامی شیک شد. بعد از ۲۰ دقیقه پلیت را به انکوباتور CO2 منتقل

رقیق تری تهیه شد و قبل از اندازه‌گیری ۲۰ دقیقه سونیکت شد. مرفولوژی سطحی ذرات نیز توسط Scanning Electron Microscope (SEM) بررسی شد. همچنین به کمک Transmission Electron Microscope (TEM) شکل نهایی ذرات بررسی و قابل رویت شد.

تعیین راندمان به دام افتادن دارو

راندمان به دام افتادن دارو از طریق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Yeild\%} = \frac{\text{weight of dried formulation}}{\text{Total weight of soild material}}$$

بررسی درصد بارگذاری (لودینگ)

جهت بررسی درصد بارگذاری مقدار مشخصی از نانوذرات لیپیدی در بافر فسفات حاوی ۰/۱٪ (وزنی حجمی) سدیم دودسیل سولفات توزین شده و در دمای اتاق بر روی شیکر انکوبه شد. سپس، مخلوط حاصل در ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. فاز رویی (Supernatant) جدا شده و میزان اینترفرون موجود در آن به روش براد فورد اندازه گیری شد.

بررسی کینتیک آزادسازی اینترفرون از نانوذرات

برای این منظور آزادسازی اینترفرون از نانوذرات جامد لیپیدی در کینتیک درجه صفر، درجه یک و هیگوجی مورد بررسی قرار گرفت. در کینتیک درجه صفر، مقدار ثابتی از دارو در واحد زمان از فرآورده آزاد می‌شود و نمودار درصد مقدار داروی آزاد شده در برابر زمان یک خط راست است. به عبارت دیگر در مدل درجه صفر نمودار مقدار داروی حل شده در برابر زمان خط مستقیم با شیب مثبت است که مقدار شیب به دست آمده برابر با ثابت سرعت انحلال است.

برای محاسبه کینتیک درجه صفر از معادله زیر استفاده شد:

$$C = C_0 - Kt$$

C = مقدار اینترفرون کل موجود در سیستم در زمان صفر

C = مقدار اینترفرون موجود در سیستم در زمان

t = زمان

K = ثابت سرعت آزادسازی درجه صفر

در کینتیک درجه یک سرعت آزادسازی با مقدار داروی باقیمانده در سیستم رابطه دارد و همواره درصدی ناشی از داروی باقیمانده در سیستم در واحد زمان آزاد می‌شود. اگر آزادسازی دارو براساس کینتیک درجه اول باشد نمودار لگاریتم درصد داروی باقیمانده در برابر زمان خط راست می‌باشد که از روی شیب آن می‌توان ثابت سرعت آزادسازی درجه اول را تعیین کرد.

برای محاسبه کینتیک درجه یک از معادله زیر استفاده شد:

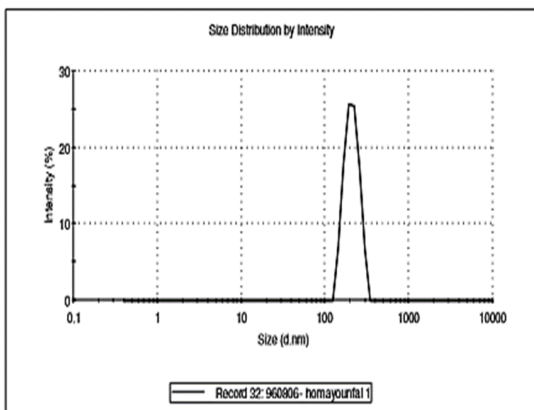
خارج و جهت خشک کردن چاهک‌ها، پلیت روی شیکر انکوباتور (با دمای تقریبی ۴۲ درجه سانتی گراد) قرار داده شد. در نهایت میزان جذب نوری در طول موج ۶۱۰ نانومتر قرائت و فعالیت زیستی محاسبه شد (۱۶، ۱۷).

یافته‌ها

بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانو ذرات سنتز شده

نانوذرات سنتز شده اندازه‌ای در حدود ۲۱۰ نانومتر با ضریب پراکندگی ۰/۲۱۸ و شارژ مثبت در حدود ۳۵ میلی ولت داشتند (نمودار ۱). اندازه کوچک ذرات (کمتر از ۳۰۰ نانومتر) به بهبود فراهمی زیستی و جذب سلولی فرمولاسیون کمک می‌کند. مقدار PDI عددی بین صفر (برای یک نمونه کاملاً یکنواخت با توجه به اندازه ذره) تا ۱ (برای یک نمونه کاملاً پراکنده با جمعیت‌های اندازه ذرات متعدد) است. در سیستم‌های دارورسانی بر پایه چربی مانند SLN ها عدد ۰/۳ و پایین‌تر برای PDI قابل قبول است (۱۸). پتانسیل زتای حدود ۳۵ نشان دهنده پایداری قابل قبول نانوذرات است (نمودار ۲).

جهت آماده سازی نمونه برای تصویربرداری با میکروسکوپ AFM و بررسی مورفولوژی نانوذرات غلظت ۱۰۰ میکرومولار از نمونه‌ها در آب دو بار تقطیر تهیه شد. سپس نمونه‌ها توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرون فیلتر شد و به مدت ۲۰ دقیقه سونیکت شد. سپس یک قطره از آن روی لامل قرار گرفت و توسط دستگاه spin coating روی سطح لامل پخش شد و در نهایت تصاویر دو بعدی و سه بعدی آن‌ها توسط میکروسکوپ AFM گرفته شد (شکل‌های ۱ و ۲).



نمودار ۱. توزیع سایز ذره

نموده و به مدت ۴ ساعت تحت این شرایط باقی ماند. در انتها میزان جذب نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر (فرانس فیلتر ۶۲۰ نانومتر) توسط دستگاه الیزا ریدر قرائت شد (۱۵). نتایج این آزمون به صورت مقایسه‌ای با زیست پذیری سلول‌ها در چاهک کنترل که هیچ نمونه‌ای به آن اضافه نشده، آورده شده است. میزان سمیت سلولی با کم کردن درصد سلول‌های زنده از ۱۰۰٪ به دست می‌آید.

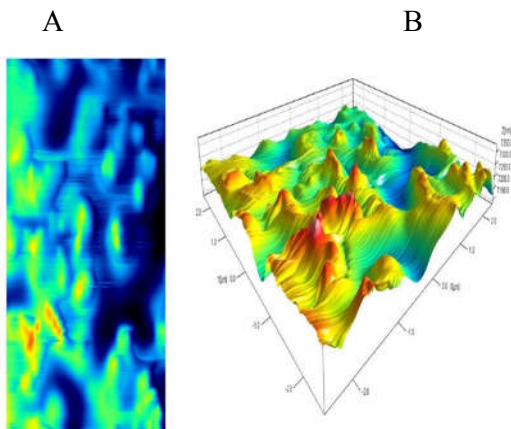
جذب نمونه تیمار شده

جذب نمونه کنترل

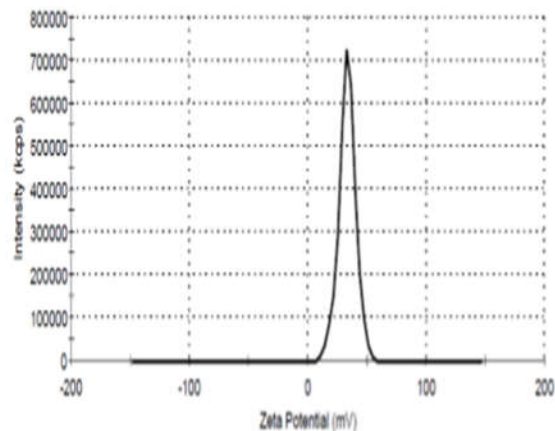
درصد سلول‌های زنده = $100 \times$

بررسی فعالیت زیستی

بررسی فعالیت زیستی اینترفرون آلفا-۲بی، اینترفرون آلفا پگیله شده و اینترفرون آلفا کپسوله شده با نانوذرات جامد (SLN) با اندازه گیری میزان اثر ضدویروسی به روش سنجش مهار اثر سایتوپاتیک (CPE) انجام شد. در این تست از رده سلولی Hep-2 استفاده شد. رقت‌های مورد نظر از فرمولاسیون‌ها (اینترفرون غیر کونژوگه و کونژوگه با PEG و SLN) در کنار استاندارد اینترفرون آلفا-۲بی به سلول‌ها داخل میکروپلیت اضافه شد و سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در شرایط مناسب (۳۷ درجه سانتی‌گراد در رطوبت ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪) انکوبه شد. در این آزمون، دامنه رقیق سازی بر اساس تخمین فعالیت زیستی نمونه طبق استاندارد فارماکوپیه ایی $1/4 \times 10^8$ IU/mg در نظر گرفته می‌شود. این بدان معناست که فعالیت زیستی نمونه‌ای با غلظت یک میلی گرم/میلی لیتر بر طبق استاندارد فارماکوپیه ایی $1/4 \times 10^8$ IU/ml در نظر گرفته می‌شود و رقت سازی باید به گونه صورت گیرد که غلظت ۱ IU/ml حدواسط رقت‌های به کار رفته در منحنی دوز-پاسخ آزمون قرار گیرد. غلظت ماده دارویی فعال اینترفرون آلفا-۲بی مورد استفاده در این مطالعه، غلظت بهینه‌ایی است که بر اساس نتایج حاصل از درصد بارگذاری (لودینگ) به دست آمده است. پس از آن، ویروس با تیترا مناسب به چاهک‌ها اضافه شد و سپس میکروپلیت به مدت ۲۰-۱۸ ساعت در شرایط مناسب (۳۷ درجه سانتی گراد در رطوبت ۹۵٪ و دی اکسید کربن ۵٪) انکوبه شد. پس از تایید لیز کامل سلول‌ها در چاهک‌های کنترل ویروسی، محیط کشت حاوی ویروس را از چاهک‌ها خارج کرده و رنگ آمیدو بلاک به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه درون رنگ روی شیکر قرار داده شد. سپس رنگ خارج و به آن فیکساتیو اضافه شد و پس از آن، فیکساتیو



شکل ۲. AFM دو بعدی اینترفرون کونژوگه شده با نانوذرات لیپیدی جامد (A) و تصویر AFM سه بعدی اینترفرون کونژوگه شده با نانوذرات لیپیدی جامد (B)



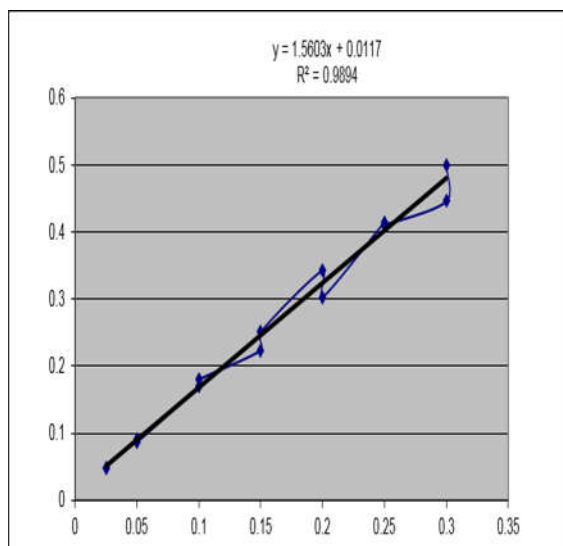
نمودار ۲. پتانسیل زتا

بررسی راندمان به دام افتادن دارو

کارایی احتباس و ظرفیت بارگیری غلظت اینترفرون آزاد در محلول رویی (سوپرناتانت) از روش برادفورد محاسبه شد (نمودار ۳).

نمودارهای حاصل از بررسی کینتیک آزادسازی اینترفرون از نانوذرات لیپیدی جامد

پس از رسم نمودار غلظت داروی آزاد شده براساس مدل های کینتیکی (نمودارهای ۴ و ۵)، ضرایب همبستگی آن در جدول ۱ آورده شده است. نمودار آزاد سازی دارو در برابر زمان نشان می دهد که نانوذرات لیپیدی حاوی اینترفرون از الگوی هیگوجی پیروی می کند. زیرا مدل آزادسازی نانوذرات در این مدل نزدیک به خط رگرسیون است و بالاترین مقدار ضریب همبستگی در این مدل مشاهده می شود.



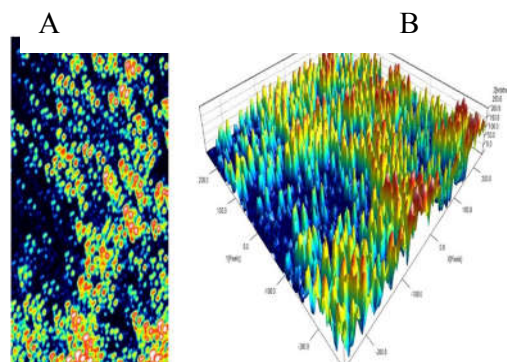
نمودار ۳. منحنی استاندارد غلظت اینترفرون به روش برادفورد

نتایج الگوی رهایش اینترفرون در زمان های مشخص

با استفاده از نمودار و معادله به دست آمده در مدل هیگوجی (نمودارهای ۶ و ۷)، درصد رهاسازی دارو از نانوذره در زمان های مورد آزمون قرار گرفته، در جدول ۲ آمده است.

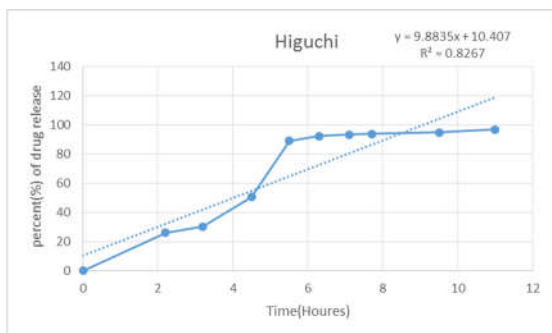
جدول ۱. مقایسه ضرایب همبستگی فرمولاسیون منتخب

مدل کینتیک رهاسازی	ضریب همبستگی
درجه صفر	$r^2=0.16041$
درجه یک	$r^2=0.7797$
هیگوجی	$r^2=0.8267$

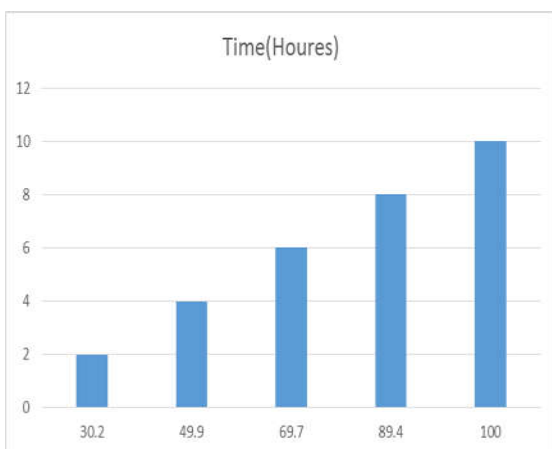


شکل ۱. AFM دو بعدی نانوذره (A) و سه بعدی نانوذره SLN (B)

سلول‌ها نیستند. اگرچه تفاوت معنی‌داری بین سمیت فرمولاسیون‌ها مشاهده نشد، به علت اینکه درصد زیست پذیری فرمولاسیون تهیه شده به روش تکنیک تبخیر حلال (SLN-IFN2) اندکی کمتر از فرمولاسیون دیگر بود، این فرمولاسیون در تست فعالیت زیستی مورد آزمایش قرار نگرفت.



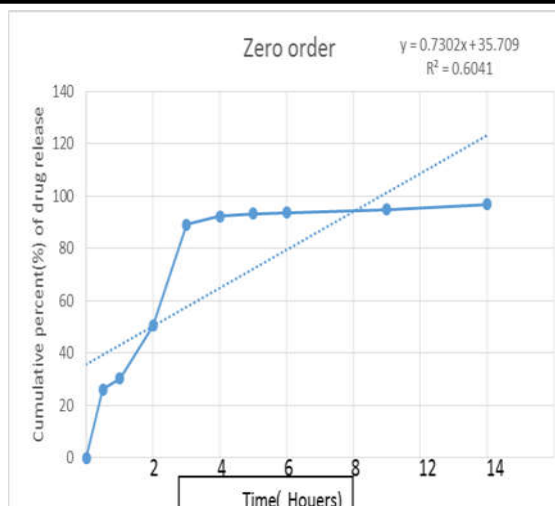
نمودار ۶. آزادسازی نانوذرات لیپیدی حاوی اینترفرون با الگوی هیگوچی



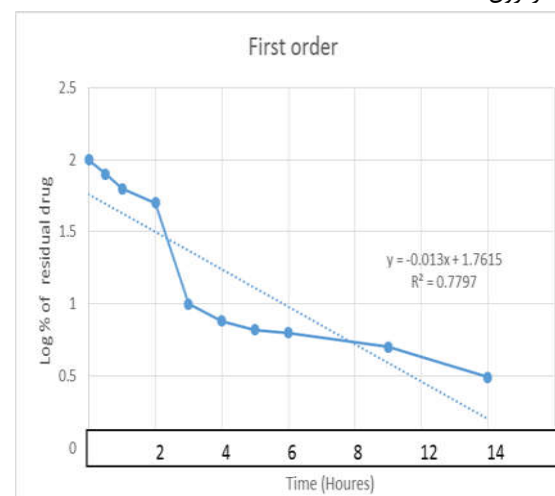
نمودار ۷. آزادسازی نانوذرات لیپیدی حاوی اینترفرون در زمان‌های معین به روش هیگوچی

جدول ۲. درصد آزادسازی نانوذرات لیپیدی حاوی اینترفرون در زمان‌های معین به روش هیگوچی

زمان رهاسازی (ساعت)	درصد رهاسازی اینترفرون
۲	۳۰/۲٪
۴	۴۹/۹٪
۶	۶۹/۷٪
۸	۸۴/۴٪
۱۰	۱۰۰٪



نمودار ۴. آزادسازی کینتیک درجه صفر نانوذرات لیپیدی حاوی اینترفرون



نمودار ۵. آزادسازی کینتیک درجه یک نانوذرات لیپیدی حاوی اینترفرون

بررسی نتایج تست سمیت سلولی MTT

این تست به منظور مقایسه میزان سمی بودن اینترفرون، اینترفرون پگیله شده و اینترفرون کونژوگه با نانوذرات جامد لیپیدی انجام شد. پس از اضافه شدن دی متیل سولفوکساید به پلیت ۹۶ خانه، میزان جذب توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد، میزان سمیت سلولی محاسبه شد و در نهایت نتایج به کمک برنامه prism آنالیز شد.

همان‌طور که در نمودار ۸ قابل مشاهده است، تفاوت معنی داری بین سمیت اینترفرون فرموله شده در SLN، ماده دارویی فعال اینترفرون و اینترفرون پگیله مشاهده نشد ($P > 0.05$). همچنین نشان داده شده است که نانوذرات جامد لیپیدی خود به تنهایی دارای خاصیت سمی برای

نتایج این تست نشان داد که SLN-IFN1 دارای فعالیت ویژه بالایی نسبت به بقیه نمونه های مورد آزمایش است و همچنین فعالیت زیستی آن به مرور زمان حفظ می شود.

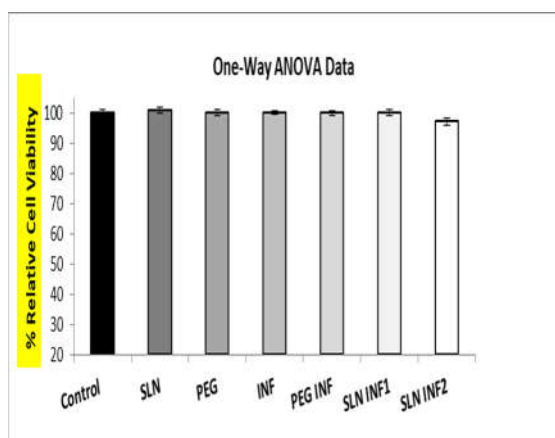
بحث

در این پژوهش اثر پارامترهای عملیاتی تولید بر فعالیت زیستی اینترفرون آلفا-2 بی بررسی شده است و نشان داده شد که اینترفرون آلفا کونژوگه شده با نانوذرات لیپیدی جامد، فعالیت زیستی اینترفرون آلفا را حفظ می کند و فرمولاسیون جدید اینترفرون در مقایسه با اینترفرون پگیله شده نتایج مطلوب تری دارد.

مولکول اینترفرون آلفا پگیله نسبت به مولکول اینترفرون غیرپگیله نیمه عمر طولانی تری دارد. بنابراین استفاده این فرآورده با همراهی خوب بیمار توام است. با وجود اینکه در ابتدا روش پگیلاسیون موثر و ساده به نظر می رسد، ولی معایب آن نظیر ایجاد سمیت کلیوی باعث محدودیت در کاربرد این ماده در داروها شده است (۱۹). بر خلاف اکثر میکروسفرهای پلیمری، نانوذرات لیپیدی جامد (SLN) سمی نیستند. زیرا، در روش تولید آنها از حلال های آلی سمی استفاده نمی شود. همچنین این ترکیبات می توانند حامل های مناسبی برای هر دو نوع داروی لیپوفیل و هیدروفیل باشند. بنابراین، استفاده از این ترکیبات می تواند جایگزین مناسبی برای روش پگیلاسیون باشد (۲۰). در سال ۲۰۱۰ مطالعه ای توسط لی و همکارانش انجام شد که نشان داد اینترفرون کپسوله شده در SLN می تواند فرمولاسیون مناسبی جهت آزادسازی کنترل شده (Controlled Release) برای داروهای دامپزشکی باشد (۲۱). اما بر خلاف مطالعه کنونی مقایسه ای با اینترفرون پگیله شده انجام نشده است. در این پژوهش اینترفرون آلفا-2 بی بارگذاری شده در نانوذرات لیپیدی جامد به دو روش میکرومولسیون و تبخیر حلال تهیه شد. فرمولاسیون حاصل از روش میکرومولسیون سمیت تقریباً مشابهی با فرمولاسیون داروی اینترفرون پگیله نشان داد، در حالی که، میزان فعالیت ویژه آن بالاتر بود و همچنین در مدت زمان بیشتری فعالیت خود را حفظ کرد.

بررسی نتایج حاصل از تست فعالیت زیستی

در این تست مقایسه فعالیت زیستی میان اینترفرون، اینترفرون پگیله شده (PEG-IFN) و اینترفرون فرموله شده در نانوذرات جامد لیپیدی به روش میکرومولسیون (SLN-IFN1) صورت گرفت. فعالیت زیستی اینترفرون، PEG-IFN و SLN-IFN1 به ترتیب $2/95 \times 10^8$ ، $1/3 \times 10^7$ و $5/2 \times 10^6$ بود. با تقسیم فعالیت زیستی به دست آمده به غلظت اینترفرون در هر نمونه میزان فعالیت ویژه محاسبه شد (جدول ۳).



نمودار ۸ مقایسه میزان سمیت نمونه ها- درصد زیست پذیری سلولی نمونه های مربوط به فرمولاسیون های مختلف و ماده دارویی فعال اینترفرون در مقایسه با کنترل منفی (چاهک حاوی سلول L929 بدون اضافه کردن فرمولاسیون های مختلف) (Control). نانوذرات جامد لیپیدی (SLN)، پلی اتیلن گلیکول (PEG)، ماده دارویی فعال اینترفرون (IFN)، اینترفرون پگیله (PEG-IFN) و اینترفرون کونژوگه با نانوذرات لیپیدی (SLN IFN1) و (SLN-IFN2).

جدول ۳. فعالیت زیستی نمونه ها

نمونه	غلظت (mg/ml)	فعالیت زیستی (IU/ml)	فعالیت ویژه (IU/mg)
API-IFN	۱/۳	$2/95 \times 10^8$	$2/27 \times 10^8$
PEG-IFN	۰/۶	$1/3 \times 10^7$	$2/16 \times 10^7$
SLN-IFN1	$4/3 \times 10^{-3}$	$5/2 \times 10^6$	$1/21 \times 10^9$

REFERENCES

- Basu A, Yang K, Wang M, Liu S, Chintala R, Palm T, et al. Structure-function engineering of interferon-beta-1b for improving stability, solubility, potency, immunogenicity, and pharmacokinetic properties by site-selective mono-PEGylation. *Bioconjug Chem* 2006;17:618-30.
- Bonjardim CA. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses--and viruses counteract IFN action. *Microbes Infect* 2005;7:569-78.
- Wadler S, Schwartz EL. New Advances in Interferon Therapy of Cancer. *Oncologist* 1997;2:254-67.

3. Stanton GJ, Weigent DA, Fleischmann WR Jr, Dianzani F, Baron S. Interferon review. *Invest Radiol* 1987;22:259-73.
4. Dianzani F. Biological basis for the clinical use of interferon. *Gut* 1993;34: 74-76.
5. Goldstein D, Laszlo J. The role of interferon in cancer therapy: a current perspective. *CA Cancer J Clin* 1988;38:258-77.
6. Basu A, Yang K, Wang M, Liu S, Chintala R, Palm T, et al. Structure-function engineering of interferon-beta-1b for improving stability, solubility, potency, immunogenicity, and pharmacokinetic properties by site-selective mono-PEGylation. *Bioconjug Chem* 2006;17:618-30.
7. Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew Chem Int Ed Engl* 2010;49:6288-308.
8. Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1638-49.
9. Ghadiri M, Fatemi S, Vatanara A, Doroud D, Najafabadi AR, Darabi M, et al. Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles: statistical modeling of entrapment efficiency and particle size. *Int J Pharm* 2012;424:128-37.
10. Heidari-Kharaji M, Taheri T, Doroud D, Habibzadeh S, Badirzadeh A, Rafati S. Enhanced paromomycin efficacy by solid lipid nanoparticle formulation against Leishmania in mice model. *Parasite Immunol* 2016;38:599-608.
11. Ramteke KH, Joshi SA, Dhole SN. Solid Lipid Nanoparticle: A Review. *IOSR J Pharm* 2012; 2:34-44.
12. Rassam, H. Allameh A, Eidi A, Alebouyeh M, Doroud D. Novel Formulation for Recombinant Streptokinase by Solid Lipid Nanoparticle: A Light at the End of the Tunnel. *Arch Pharma Pract* 2020;11:149-55.
13. Pieters R, Huismans DR, Leyva A, Veerman AJ. Comparison of the rapid automated MTT-assay with a dye exclusion assay for chemosensitivity testing in childhood leukaemia. *Br J Cancer* 1989;59:217-20.
14. Mehrabi M, Mohammadpour Dounighi N, Rezayat Sorkhabadi SM, Doroud D, Amani A, Khoobi M, et al. Development and physicochemical, toxicity and immunogenicity assessments of recombinant hepatitis B surface antigen (rHBsAg) entrapped in chitosan and mannosylated chitosan nanoparticles: as a novel vaccine delivery system and adjuvant. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018;46:230-240.
15. Gilli F, De La Torre AL, Royce DB, Pachner AR. Interaction of PEGylated interferon-beta with antibodies to recombinant interferon-beta. *Int Immunopharmacol* 2018;62:1-6.
16. Grossberg SE, Kawade Y, Kohase M, Klein JP. The neutralization of interferons by antibody. II. Neutralizing antibody unitage and its relationship to bioassay sensitivity: the tenfold reduction unit. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:743-55.
17. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 2018 ;10:57.
18. Palombo M, Deshmukh M, Myers D, Gao J, Szekely Z, Sinko PJ. Pharmaceutical and toxicological properties of engineered nanomaterials for drug delivery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2014;54:581-98.
19. Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:478-90.
20. Li S, Zhao B, Wang F, Wang M, Xie S, Wang S, et al. Yak interferon-alpha loaded solid lipid nanoparticles for controlled release. *Res Vet Sci* 2010;88:148-53.