

## ایمنی زائی نانوذرات PLGA واجد پروتئین نو ترکیب CfaB از اشریشیا کولی انتروتوکسیژنیک

شهرام نظریان<sup>۱</sup>، سید لطیف موسوی گرگری<sup>۲\*</sup> (PhD)

۱- مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین(ع)

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد

دریافت: ۹۶/۱/۱۵، اصلاح: ۹۶/۳/۱۶، پذیرش: ۹۶/۳/۳۰

### خلاصه

**سابقه و هدف:** باکتری اشریشیا کولی انتروتوکسیژنیک، از عوامل شایع اسهال می باشد. با بروز مقاومت آنتی بیوتیکی، ساخت ایمونژن موثر علیه باکتری ضروری است. فاکتورهای کلونیزاسیون از مهمترین کاندیدای واکسن علیه ETEC می باشند. بارگذاری ایمونژن های نو ترکیب از جمله فاکتورهای کلونیزاسیون در نانو حاملها، سبب محافظت آنها در برابر عوامل محیطی شده، غلظتهای مناسب از ایمونژن را فراهم و فعالیت زیستی را افزایش می دهد. هدف از این تحقیق بررسی ایمنی زائی پروتئین CfaB بارگذاری شده در نانوذرات PLGA می باشد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، بهینه سازی کدونی ژن *cfaB* با نرم افزار OPTIMIZER انجام شد. بیان پروتئین در *E. coli* با IPTG القا گردید. پروتئین به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی تخلیص و با وسترن بلاتینگ ارزیابی شد. نانوذرات PLGA به روش امولسیون دوگانه تهیه و خصوصیات ساختاری با SEM و DLS بررسی گردید. ایمن سازی ۴۰ موش BALB/C در چهار گروه ۱۰ تایی انجام شد و به گروه اول ۲۰ میکروگرم از پروتئین بارگذاری شده در نانوذره، گروه دوم پروتئین به همراه ادجوانت فروند و گروه سوم و چهارم به ترتیب نانوذرات بدون آنتی ژن و بافر PBS تجزیه شد. تزریقات با فاصله دو هفته ای و چهار بار انجام شد و یک هفته پس از تزریقات خونگیری از چشم حیوانات انجام شد و تیتراژ آنتی بادی با روش الایزا تعیین گردید. ممانعت سرم از اتصال باکتری ETEC به سلول Caco2 بررسی شد.

**یافته ها:** ژن بهینه سازی شده شاخص سازگاری کدون ۰/۸۵ را دارا شد. بیان پروتئین منجر به تولید CfaB با وزن ۱۸/۹ کیلودالتون شد. میزان پروتئین ۵ میلی گرم در لیتر بود. ظرفیت بارگذاری پروتئین در نانوذرات PLGA، ۸۵ درصد بود. متوسط اندازه نانوذرات ۱۷۰ نانومتر بود. ایمن سازی موشها پاسخ آنتی بادی سرمی را القا کرد. سرم ایمن اتصال ETEC به سلول Caco2 را ۶۲/۸٪ کاهش داد.

**نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که پروتئین نو ترکیب CfaB بارگذاری شده در نانوذرات PLGA ایمنی علیه باکتری ETEC را تحریک می کند.

**واژه های کلیدی:** PLGA، نانوذرات، CfaB، ETEC، ایمنی زائی.

### مقدمه

از آنجاکه برخی ایمونژن های نو ترکیب از جمله فاکتورهای کلونیزاسیون باکتری به تنهایی سیستم ایمنی را به خوبی تحریک نمی کنند، استفاده از ادجوانت ها و حامل ها می تواند کارائی ایمنی زائی را بهبود بخشد. بارگذاری ایمونژنهای نو ترکیب از جمله CfaB در نانو ذرات از قبیل PLGA به عنوان سازو کاری برای افزایش ایمنی زایی، مورد توجه قرار گرفته است (۱۶ و ۱۱). مطالعات انجام شده در استفاده از PLGA برای تولید آنتی بادی علیه فاکتورهای کلونیزاسیون CS3 و CS6 همراه با موفقیت بوده است (۱۴ و ۱۳). Deng و همکاران ایمنی زائی پروتئین LTB-ST را به صورت نانو کپسوله مورد بررسی قرار دادند (۱۵). Nazarian و همکاران فیژون پروتئین واجد فاکتورهای اتصال و توکسین را در نانوذرات PLGA بارگذاری کردند (۱۶). با توجه به اینکه پروتئین های زیر واحدی نیازمند استفاده از ادجوانت ها هستند و با در نظر گرفتن عملکرد ادجوانتی نان حامل ها، هدف از این تحقیق ارزیابی ایمنی علیه اتصال باکتری ETEC با پروتئین CfaB در PLGA بارگذاری شده در نانوذرات PLGA می باشد.

باکتری اشریشیاکولی انتروتوکسیژنیک یکی از مهمترین باکتری های ایجاد کننده بیماری های گوارشی بوده و شیوع اسهال ناشی از آن به ویژه در کشورهای در حال توسعه و همچنین در افرادی که به این مناطق مسافرت می کنند، بالا است (۱ و ۲). باکتری از طریق فاکتورهای کلونیزه کننده سطحی خود به اپیتلیوم روده متصل و کلونیزاسیون در سطح سلول های روده کوچک رخ می دهد (۳ و ۴). پس از اتصال و کلونیزاسیون باکتری، انتروتوکسین های باکتری بر روی سلول های اپیتلیوم آن ناحیه اثر می گذارد (۵ و ۶). یکی از مهم ترین عوامل بیماری زا در باکتری اشریشیاکولی انتروتوکسیژنیک، تولید یک یا تعداد بیشتری از عوامل کلونیزاسیون (CFS) است و به عنوان هدف برای تهیه واکسن مورد توجه قرار دارند (۷ و ۸). فاکتور اتصال CFA/I اولین CF شناسایی شده و رایج ترین فاکتور کلونیزاسیون در سویه های ETEC به ویژه در مناطق بومی آمریکای جنوبی و آسیا محسوب می شود (۹ و ۱۰). پروتئین CfaB به عنوان زیر واحد اصلی CFA/I، شامل سیگنال پپتید ۲۳ آمینواسیدی و پروتئین بالغ ۱۴۷ آمینواسیدی است که نقش کلیدی در اتصال باکتری به سلول های اپی تلیالی روده را دارد (۱).

\*مسئول مقاله: دکتر سید لطیف موسوی گرگری

آدرس: تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی. تلفن: ۵۱۲۱۵۰۸۰-۰۲۱

E-mail: slmousavi@shahed.ac.ir

## مواد و روش‌ها

**بهینه‌سازی ژن *cfaB*:** بهینه‌سازی کدون‌های نادر، بررسی پایداری mRNA و نیز شاخص سازگاری کدون (CAI) با نرم افزار OPTIMIZER انجام و سازه توسط شرکت Shingene چین سنتز شد. ژن صناعی در وکتور بیانی pET28a زیر همسانه سازی شد. تراریخت پلاسمید نوترکیب در سلول‌های مستعد با استفاده از روش شوک حرارتی صورت گرفت.

**بیان و تخلیص و تائید پروتئین نوترکیب CfaB:** بیان پروتئین نوترکیب در میزبان *E.coli* BL21-DE3 در شرایط بهینه با استفاده از IPTG (Fermentas) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار در دمای ۳۷°C و زمان ۵ ساعت القا گردید.

عصاره سلول‌های بیانی بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. تخلیص پروتئین نوترکیب به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی به روش دنا توره و با استفاده از بافرهای حاوی اوره ۸ مولار با شیب pH در ستون Ni-NTA (Qaigen) صورت پذیرفت. پس از حذف اوره از پروتئین تخلیص شده با دیالیز شیب اوره، غلظت پروتئین به روش برادفورد اندازه‌گیری شد.

**تائید پروتئین به روش وسترن بلات:** پروتئین نوترکیب حاصل با استفاده از آنتی بادی ضد هیستیدین کانژوگه شده با آنزیم HRP (Qaigen) و به روش وسترن بلات ارزیابی شد. پروتئین بر روی کاغذ نیتروسلولز (Sigma) منتقل و نواحی آزاد و فاقد پروتئین با بافر حاوی ۵ درصد شیر خشک تهیه شده در PBST (بافر PBS واجد ۰/۵ درصد توتین ۲) مجاور شد. در مرحله بعدی آنتی بادی ضد هیستیدین با رقت ۱:۱۰۰۰۰ بر روی کاغذ اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. آشکارسازی با محلول ظهور حاوی دی آمینوبنزیدين (Sigma) انجام شد.

**بارگذاری پروتئین نوترکیب در نانوذرات PLGA:** برای تولید نانوذرات از روش امولسیون دوگانه تبخیر حلال استفاده شد (۲۲؛۲۰). ۱ میلی گرم پروتئین به عنوان فاز آبی به ۲ میلی‌لیتر از محلول PLGA در متیلن کلراید اضافه و با استفاده از همگن‌ساز به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد. امولسیون، آب-روغن به ۳۰ میلی‌لیتر پلی وینیل الکل (۲/۵ درصد وزنی به حجمی) افزوده و با همگن‌ساز هم زده شد. به امولسیون دوگانه آب در روغن در آب (W1/O/W2) به دست آمده، ۱۵ میلی‌لیتر آب بدون یون اضافه و به مدت ۱ ساعت هم زده شد. نانوذرات با سانتریفیوژ ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه جمع‌آوری و شستشو داده شدند. نانوذرات پلیمری برای بررسی خصوصیات ظاهری و ایمنی زائی مورد استفاده قرار گرفت.

**بررسی خصوصیات ظاهری نانوذرات و تعیین بازده بارگذاری پروتئین نوترکیب:** شکل ظاهری نانوذرات تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل LEO-1455VP بررسی شد. برای آماده سازی نمونه، نانوذرات بر روی فویل خشک گردید و با طلا پوشانده شدند. تصویر برداری از نانوذرات با شتاب ولتاژ ۱۰ کیلو ولت و با بزرگنمایی ۱۰ هزار انجام شد. اندازه و پتانسیل زتای ذرات به روش پراش نور پویا (DLS) با استفاده از دستگاه Zetasizer (Malvern) تعیین گردید. بازده بارگذاری از مقایسه مقدار اولیه پروتئین مورد استفاده و میزان پروتئین جذب نشده در ذرات پلیمری به دست آمد (۱۶).

**ایمن‌سازی حیوان آزمایشگاهی و بررسی تیتراژ آنتی بادی به روش الیزا:** تعداد ۴۰ سر موش آزمایشگاهی ماده (BALB/C) با متوسط وزن ۲۵ گرم، در ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. ۲۰ میکروگرم از پروتئین بارگذاری شده در نانوذره به هر موش

گروه اول و پروتئین به همراه ادجوانت فروند به گروه دوم به روش زیر پوستی تجویز شد. به گروه سوم و چهارم به ترتیب نانوذرات بدون آنتی‌ژن و بافر PBS تجویز شد.

تزریقات با فواصل دو هفته ای و چهار بار انجام شد. جهت بررسی ایمنی‌زائی، یک هفته پس از تزریقات دوم، سوم و چهارم از چشم حیوانات ایمن و غیرایمن خونگیری انجام شد. سرم‌ها جداسازی و برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. آنتی‌بادی پلی کلونال موجود در سرم به روش الایزای غیرمستقیم مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. سریال رقت سرم‌ها از ۱/۲۰۰ تا ۱/۲۵۶۰۰ تهیه شد.

**بررسی اثرات ضد اتصالی و مهارکنندگی آنتی بادی:** سلولهای Caco-2 ترپسینه به چاهک‌های پلیت کشت واجد اسلایدهای میکروسکوپی افزوده و در گرمخانه با شرایط فشار ۵ درصد CO<sub>2</sub> نگهداری شدند. تعداد ۱۰<sup>۷</sup> باکتری ETEC جدا شده از بیمار و دارای CFA/I (۱۷) جداگانه به سرم موش ایمن و غیر ایمن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر انکوباتور در دمای اتاق قرار داده شد. سوسپانسیون به چاهک‌ها افزوده و یک ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار گرفت. در سلول‌ها با گیسما رنگ آمیزی و در زیر میکروسکوپ بررسی شدند. درصد مهار اتصال باکتری به سلول با مقایسه میزان اتصال باکتری در حضور سرم ایمن و سرم غیرایمن محاسبه گردید.

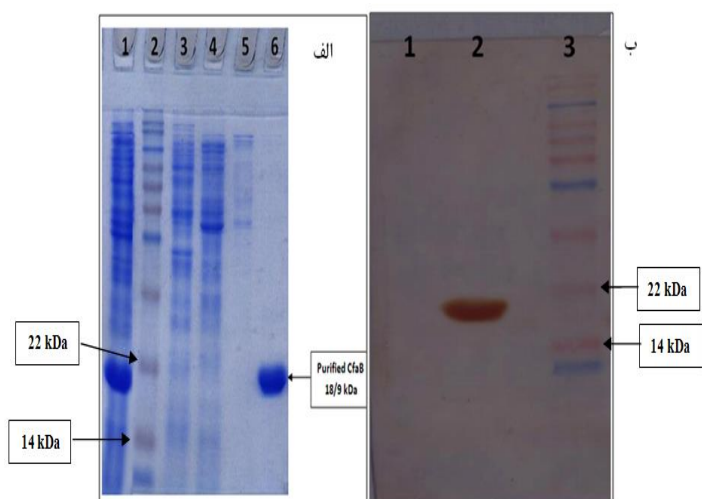
**آنالیز آماری:** برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلموگراف-یرنوزوف و برای مقایسه تعداد دفعات تجویز فرمولاسیون از تحلیل واریانس مکرر استفاده شد. آزمون دانکن برای مقایسات بین گروههای مختلف تجویز استفاده شد و  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

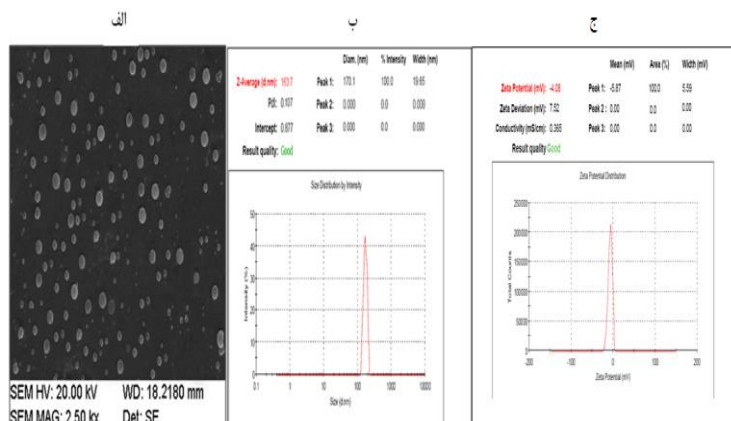
**بهینه‌سازی ژن *cfaB*:** جهت افزایش بیان پروتئین نوترکیب، بهینه‌سازی کدونی بر روی توالی کد کننده پروتئین CfaB انجام شد. شاخص انطباق پذیری کدونی از ۰/۶۶ به ۰/۸۵ و محتوای سیتوزین و گوانین از ۴۱ درصد به ۴۴/۶ درصد تغییر کرد. تعداد کدون‌هایی که از کیفیت مناسبی برای افزایش بیان پروتئین برخوردار هستند از ۴۴ درصد به ۷۴ درصد تغییر پیدا کرد. حداقل انرژی mRNA برای ساختار قبل از بهینه سازی ۱۱۷/۱۰ - کیلو کالری به ۱۶۰/۱۰ - بعد از بهینه‌سازی رسید.

**بیان، تخلیص و تائید پروتئین نوترکیب:** ژن صناعی در وکتور بیانی pET28a با آنزیم‌های محدود گر *EcoRI* و *HindIII* (Fermentas) زیر همسانه سازی شد. قطعه ژنی به طول ۴۴۴ جفت باز بر روی ژل آگارز تائید کننده زیر همسانه سازی بود (شکل ۱). القاء بیان پروتئین با IPTG انجام شد. در نمونه‌های القاء شده، پروتئین با وزن مولکولی حدود ۱۸/۹ کیلو دالتون مشاهده شد (شکل ۲). برای خالص سازی پروتئین نوترکیب از روش دنا توره و اوره ۸ مولار استفاده شد. پروتئین نوترکیب با خلوص بالایی در خروجی ستون حاصل از بافر رهاسازی E وجود داشت (شکل ۲).

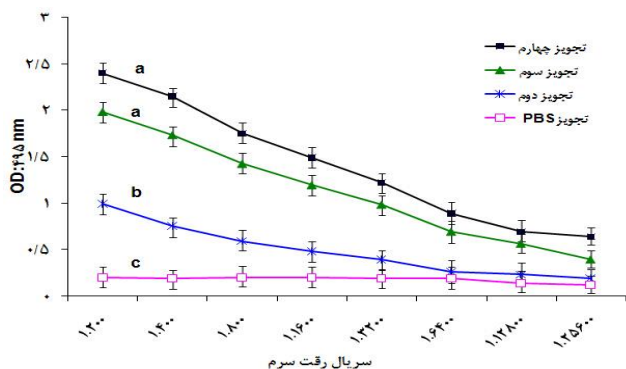
صحت پروتئین نوترکیب تولید شده با روش وسترن بلات بررسی شد. آنتی بادی ضد هیستیدین توالی شش آمینواسیدی هیستیدین پروتئین نوترکیب را شناسایی و با آن واکنش داد (شکل ۲).



شکل ۲. (الف) تخلیص پروتئین نو ترکیب با ستون میل ترکیبی Ni-NTA. ستون ۱: نمونه قبل از ستون، ستون ۲: نشانگر پروتئینی Vivantis PR0602، ستون ۳، ۴، ۵: نمونه خروجی از ستون پس از شستشو با بافر D، C، E، پروتئین تخلیصی با ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار. (ب) تأیید پروتئین به روش وسترن بلاتینگ. ستون ۱: پروتئین BSA، ستون ۲: پروتئین CfaB، ستون ۳: نشانگر پروتئینی



شکل ۳. (الف): تصویر SEM نانوذرات PLGA، (ب): ارزیابی توزیع اندازه ذرات پلیمری تهیه شده، (ج): پتانسیل زتا نانوذرات پلیمری واجد پروتئین



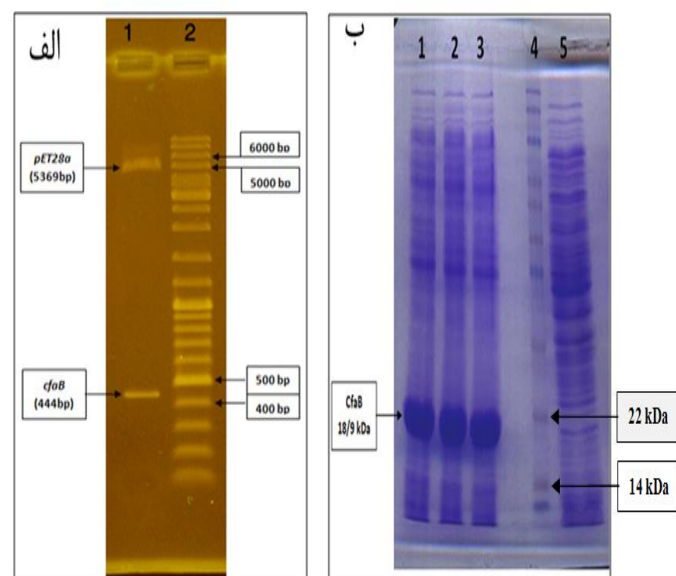
نمودار ۱. تیتراژ آنتی بادی تولید شده در موش پس از تزریق پروتئین نو ترکیب به همراه ادجوانت. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد

تهیه نانوذرات PLGA و برآورد بازده بارگذاری پروتئین: نانوذرات PLGA به روش امولسیون دو گانه تهیه شد. تصویر میکروسکوپ الکترونی سطح صاف و کروی بودن نانوذرات را نشان داد (شکل ۳). نتایج DLS تهیه نانوذرات PLGA با میانگین اندازه ۱۷۰ نانومتر را نشان داد (شکل ۳).

پتانسیل زتای نمونه پس از بارگذاری پروتئین نو ترکیب به ۵/۸۷- رسید (شکل ۳). شاخص پراکندگی نانوذرات تهیه شده ۰/۱۰۷ بود. بازده بارگذاری پروتئین در نانوذرات پلیمری ۸۵ درصد بود.

سنجش تیتراژ آنتی بادی ضد CfaB و بررسی تاثیر آنتی سرم بر مهار اتصال باکتری: ایمنی زایی حیوانات با تزریق پروتئین بارگذاری شده در نانوذرات و پروتئین آزاد به همراه ادجوانت انجام گردید. پس از تزریق اول، دوم و سوم در گروه های دریافت کننده آنتی ژن، تیتراژ آنتی بادی افزایش معنی داری داشت که این افزایش در گروه کنترل دیده نشد (نمودار ۱ و ۲).

تیتراژ آنتی بادی مربوط به تجویز آنتی ژن با ادجوانت (نمودار ۱) نسبت به تیتراژ آنتی بادی آنتی ژن بارگذاری شده در نانوذرات (نمودار ۲) افزایش غیر معنی داری را نشان داد. همچنین افزایش تیتراژ آنتی بادی تزریق چهارم نسبت به تزریق سوم تفاوت معنی داری را نشان نداد (نمودار ۱ و ۲). تجزیه واریانس اثرات فرمولاسیون تجویز آنتی ژن و تعداد دفعات تجویز با اندازه گیری مکرر انجام شد و برای فاکتورهای مورد ارزیابی در این تحقیق، از لحاظ آماری معنی دار بود ( $p < 0.05$ ). آزمایش معنیت از اتصال باکتری ETEC به سلول Caco-2 انجام شد. نتایج شمارش تعداد باکتری های اتصال یافته نشان داد که آنتی بادی تولید شده توانسته اتصال باکتری به سلول Caco-2 را کاهش دهد. به طور میانگین درصد معنیت از اتصال باکتری به سلول توسط آنتی بادی، ۶۲/۸٪ بود.



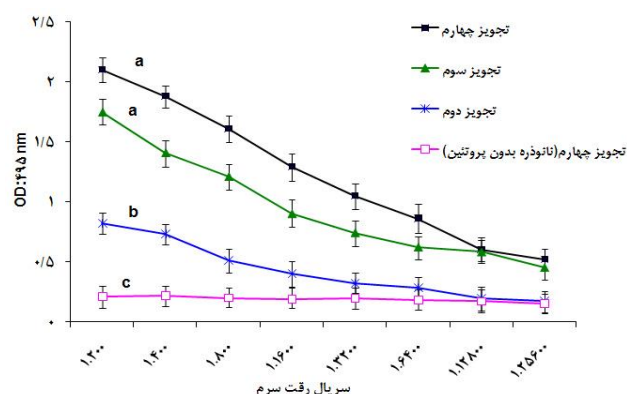
شکل ۴. (الف) تأیید همسانه سازی ژن cfaB در پلاسمید pET28a به روش هضم آنزیمی. ستون ۱: پلاسمید نو ترکیب برش خورده با آنزیم های محدود گر، ستون ۲: نشانگر اندازه DNA ladder mix. (ب) بررسی بیان پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد. ستون های ۱، ۲، ۳: سلول القاء شده با IPTG، ستون ۴: نشانگر پروتئینی Vivantis PR0602، ستون ۵: سلول القاء نشده

ذرات پلیمری تهیه شده در این تحقیق ۱۷۱ نانومتر بود. اندازه ذره حاوی آنتی ژن، عاملی تعیین کننده در جذب و سرنوشت زیستی آن است. Alexis و همکاران نشان دادند که در بدن موش میکروذرات PLGA در مقایسه با نانوذرات به خوبی جذب نشده و سیستم ایمنی را به طور مناسب تحریک نمی کنند (۲۲). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که نانوذرات PLGA می توانند سبب ایجاد ایمنی در حیوان گردند. در تحقیقی مشابه Byrd و همکاران نیز نشان دادند که کاهش اندازه ذرات PLGA سبب پاسخ مناسب ایمنی علیه فاکتورهای اتصال ETEC می شود (۱۴). پتانسیل زتای نانوذرات نیز منفی بود. بار سطحی ذرات در حذف آنها از بدن موثر است. در تحقیق انجام شده توسط Alexis و همکاران تأیید گردید که نانوذرات دارای بار مثبت نسبت به نانوذراتی که دارای بار سطحی منفی می باشند، با سرعت بیشتری از بدن حذف می گردند (۲۲). بر این اساس در تحقیق حاضر از PLGA استفاده گردید تا نانوذرات پلیمری تهیه شده به دلیل پتانسیل زتای منفی ماندگاری طولانی تری را در بدن حیوان داشته باشند. با توجه به نتایج ایمنی زائی انجام شده در تحقیق حاضر به نظر می رسد پلیمر PLGA توانسته با رهایش تدریجی آنتی ژن و عرضه آن به سیستم ایمنی به عنوان ادجوانت عمل کرده و سبب بروز پاسخ های ایمنی گردد. در تحقیق مشابه Byrd و همکاران نیز اثر ادجوانتی PLGA را در ایجاد ایمنی علیه فاکتور CS3 از ETEC را نشان داد (۱۳). با این حال Lapa و همکاران نشان دادند که نانوذرات واجد فاکتور اتصال CS6 پاسخ های ایمنی بالایی را نشان نداده و نیازمند استفاده از ادجوانتهای کمکی می باشد (۲۳). یکی از دلایل این تفاوت می تواند به تفاوت ماهیت آنتی ژنی پروتئین های مختلف مرتبط باشد.

فعالیت خنثی کنندگی آنتی بادی تولید شده در تحقیق حاضر نشان داد که ساختار طبیعی فاکتور کلونیزاسیون CFA/I ارائه شده بر سطح باکتری ETEC توسط آنتی بادی شناسایی شده و مانع از اتصال آنها به گیرنده سلولی شده است. این یافته نشان می دهد که زیر واحد ساختاری فاکتور کلونیزاسیون CFA/I چگونه ای در نانوذرات PLGA بارگذاری شده که تغییراتی در اپی توپهای آن به وجود نیامده است. نتایج حاصله تأیید بیشتری بر نقش کلیدی آنتی بادی ضد CfaB در ایجاد محافظت در برابر ETEC و جلوگیری از بروز اسهال است (۲۳). نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که پروتئین نوترکین CfaB بارگذاری شده در پلیمر PLGA می تواند به عنوان ایمونژن در برابر عفونت و اسهال ناشی از باکتری ETEC مد نظر قرار گیرد.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از زحمات کارشناس آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست شناسی دانشگاه شاهد تقدیر و تشکر می شود.



نمودار ۲. تیتراژ آنتی بادی تولید شده در موش پس از تجویز نانوذرات واجد پروتئین نوترکین. حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد

### بحث و نتیجه گیری

نتایج تحقیق نشان داد که پلیمر PLGA می تواند با رهایش تدریجی به عنوان ادجوانت عمل کرده و سبب برانگیختن پاسخ ایمنی علیه فاکتور اتصال دهنده از باکتری ETEC گردد. در این تحقیق پس از طراحی توالی، بهینه سازی کدونها انجام گرفت. افزایش CAI به ۰/۸۷ و عدم وجود ساختارهای گره ساختگی و یا لوپ های بلند در نقطه شروع mRNA ۵' سبب بیان پروتئین نوترکین CfaB گردید. امروزه تحقیقات زیادی جهت به کارگیری نانوذرات به عنوان حاملین ایمونژن ها صورت گرفته است. نانوذرات پلیمری PLGA به دلیل زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری مناسب، امکان رهایش هدفمند و نیز محافظت از ترکیبات در بدن، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۸ و ۱۹).

مطالعات انجام شده در استفاده از PLGA برای تولید آنتی بادی علیه فاکتورهای کلونیزاسیون CS3 و CS6 از ETEC همراه با موفقیت بوده است (۱۴ و ۱۳). Deng و همکاران و Nazarian و همکاران در تحقیقاتی جداگانه فیوژن پروتئین هایی از ETEC را به صورت نانوکپسوله برای ایمنی زایی مورد بررسی قرار دادند (۱۶ و ۱۵). در تحقیقات مختلف از پلیمر PLGA با نسبت های ۵۰:۷۵، ۵۰:۲۵ و ۷۵:۲۵ از لاکتیک اسید به گلیکولیک اسید استفاده می گردد (۲۰ و ۱۹). در این تحقیق از PLGA با نسبت ۵۰:۵۰ استفاده شد تا تخریب مناسب پلیمر و رها شدن مقدار کافی آنتی ژن متعادل بوده و سبب تحریک سیستم ایمنی گردد. در مطالعه حاضر از پلی وینیل الکل به عنوان سورفکتانت استفاده شد. Menon و همکاران نشان دادند که با افزایش غلظت سورفکتانت تا ۵ درصد می توان نانوذرات کوچکتری را تهیه کرد (۲۱). از آنجاکه غلظت های بالای سورفکتانت PVA می تواند سبب بروز سمیت گردد لذا در این تحقیق به جای غلظت های بالا، از غلظت ۲/۵ درصد سورفکتانت استفاده شد. میانگین اندازه

# Immunogenicity Evaluation of PLGA Nanoparticles Contains Recombinant CfaB Protein from Enterotoxigenic *Escherichia Coli*

Sh. Nazarian (PhD)<sup>1</sup>, S.L. Mousavi Gargari (PhD)<sup>\*2</sup>

1. Biology Research Centre, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, I.R.Iran

2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences Shahed University, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(9); Sep 2017; PP: 39-44

Received: Apr 5<sup>th</sup> 2017, Revised: Jun 6<sup>th</sup> 2017, Accepted: Jun 20<sup>th</sup> 2017.

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) are the most common causes of diarrhea among children. Colonization factors (CFs) are the major ETEC candidate vaccines. Considering the high antibiotics resistance reports, construction of effective immunogen against bacteria is major goal. Encapsulation of recombinant immunogen in nano carriers such as polymeric PLGA nanoparticles, not only protects them from degradation in environmental elements but also provides the effective concentrations of immunogen in targets, hence increasing bioactivity. The aim of this study was to investigate the immunogenic properties of CfaB protein encapsulated in PLGA nanoparticles.

**METHODS:** In this research study, *cfaB* gene codon optimization was performed by OPTIMIZER software. Expression of recombinant protein in *E.coli* was induced with IPTG. The recombinant protein was purified using affinity chromatography and evaluated by Western Blotting analysis. PLGA nanoparticles containing recombinant protein were prepared by double emulsion method and their structures were characterized by SEM and DLS. 40 BALB/C mice in four group were immunized with nanoparticles and antibody titers were determined by ELISA. The efficiency of antibodies in preventing the attachment of ETEC bacteria to the Caco 2 cells was examined.

**FINDINGS:** The optimized gene had a Codon adaptation index (CAI) of 0.85. Expression of recombinant protein led to the production of CfaB with molecular weight of 18/9 kDa. Yield of protein was 5mg/L. Encapsulation efficiency of recombinant protein in PLGA nanoparticles was 85%. The average particle size was 170 nm. Immunization of mice induced serum antibody response. Immunized sera decreased %62.8 of ETEC adhesion to Caco2 cells.

**CONCLUSION:** Recombinant CfaB protein encapsulated in PLGA nanoparticles stimulate immunity against ETEC.

**KEY WORDS:** PLGA, nanoparticle, ETEC, CfaB, Immunization.

Please cite this article as follows:

Nazarian Sh, Mousavi Gargari SL. Immunogenicity Evaluation of PLGA Nanoparticles Contains Recombinant CfaB Protein From Enterotoxigenic *Escherichia Coli*. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(9):39-44.

\* Corresponding author: S.L. Mousavi Gargari (PhD)

Address: Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 51212600

E-mail: slmousavi@shahed.ac.ir

## References

1. Bourgeois AL, Wierzb TF, Walker RI. Status of vaccine research and development for enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vaccine*. 2016;34(26):2880-6.
2. Gheibi Hayat SM, Mousavi Gargari SL, Nazarian S. Construction and immunogenic properties of a chimeric protein comprising CfaE, CfaB and LTB against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biologicals*. 2016;44(6):503-10.
3. Nandre RM, Duan Q, Wang Y, Zhang W. Passive antibodies derived from intramuscularly immunized toxoid fusion 3xSTaN12S-dmLT protect against STa+ enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diarrhea in a pig model. *Vaccine*. 2017;35(4):552-6.
4. Sincock SA, Hall ER, Woods CM, O'Dowd A, Poole ST, McVeigh AL, et al. Immunogenicity of a prototype enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesin vaccine in mice and nonhuman primates. *Vaccine*. 2016;34(2):284-91.
5. Alerasol M, Gargari SLM, Nazarian S, Bagheri S. Immunogenicity of a fusion protein comprising coli surface antigen 3 and labile b subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Iran Biomed J*. 2014;18(4):212-18.
6. Joffré E, Sjöling Å. The LT1 and LT2 variants of the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) heat-labile toxin (LT) are associated with major ETEC lineages. *Gut Microb*. 2016;7(1):75-81.
7. Bagheri S, Gargari SLM, Rasooli I, Nazarian S, Alerasol M. A CsaA, CsaB and LTB chimeric protein induces protection against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Brazil J Infect Dis*. 2014;18(3):308-14.
8. Hajizade A, Ebrahimi F, Amani J, Arpanaei A, Salmanian AH. Design and in silico analysis of pentavalent chimeric antigen against three enteropathogenic bacteria: enterotoxigenic *E. coli*, enterohemorrhagic *E. coli* and *Shigella*. *Biosci Biotechnol Res Commun*. 2016;9(2):229-43.
9. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PloS one*. 2013;8(9):72788.
10. Madhavan TV, Sakellaris H. Chapter Five-Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol*. 2015;90:155-97.
11. Muheem A, Shakeel F, Jahangir MA, Anwar M, Mallick N, Jain GK, et al. A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. *Saudi Pharma J*. 2016;24(4):413-28.
12. Ramirez JEV, Sharpe LA, Peppas NA. Current state and challenges in developing oral vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;114:116-31.
13. Byrd W, Cassels FJ. The encapsulation of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor CS3 in biodegradable microspheres enhances the murine antibody response following intranasal administration. *Microbiol*. 2006;152(3):779-86.
14. Byrd W, Cassels FJ. Intranasal immunization of BALB/c mice with enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor CS6 encapsulated in biodegradable poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Vaccine*. 2006;24(9):1359-66.
15. Deng G, Zeng J, Jian M, Liu W, Zhang Z, Liu X, et al. Nanoparticulated heat-stable (STa) and heat-labile B subunit (LTB) recombinant toxin improves vaccine protection against enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in mouse. *J Biosci Bioengin*. 2013;115(2):147-53.
16. Nazarian S, Gargari SLM, Rasooli I, Hasannia S, Pirooznia N. A PLGA-encapsulated chimeric protein protects against adherence and toxicity of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbio Res*. 2014;169(2):205-12.
17. Nazarian S, Gargari SLM, Rasooli I, Alerasol M, Bagheri S, Alipoor SD. Prevalent phenotypic and genotypic profile of enterotoxigenic *Escherichia coli* among Iranian children. *Japan J Infect Dis*. 2014;67(2):78-85.
18. Zhu X. PLGA Nanomedicine. *J Drug Deliv Thera*. 2017;7(3):84-6.
19. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release*. 2012;161(2):505-22.
20. Luk AS, Junnarkar GH, Chen G. Sustained release small molecule drug formulation. Google Patents; 2017. Available From: <http://www.google.com.pg/patents/EP2361609A1?cl=en>
21. Menon JU, Kona S, Wadajkar AS, Desai F, Vadla A, Nguyen KT. Effects of surfactants on the properties of PLGA nanoparticles. *J Biomed Mater Res Part A*. 2012;100(8):1998-2005.
22. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008;5(4):505-15.
23. Lapa JA, Sincock SA, Ananthakrishnan M, Porter CK, Cassels FJ, Brinkley C, et al. Randomized clinical trial assessing the safety and immunogenicity of oral microencapsulated enterotoxigenic *Escherichia coli* surface antigen 6 with or without heat-labile enterotoxin with mutation R192G. *Clin Vaccin Immunol*. 2008;15(8):1222-8.