

# ساخت میکروسفرهای PLGA به روش امولسیون دوگانه- تبخیر حلال و بررسی رفتار رهایشی ویروس H9N2 آنفلوآنزای طیور

جمال خاضعی<sup>i</sup>، فریبا اورنگ<sup>ii</sup>، علی نظری شیروان<sup>iii</sup>، مهدی امینیان<sup>iv</sup>

## چکیده

استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر<sup>1</sup> به صورت ریزذرات حاوی مواد دارویی، در تهیه سامانه‌های نوین دارورسانی<sup>2</sup> و دستیابی به رهایش کنترل شده دارو یا عامل فعال، رهیاقتی جدید و جایگزین مناسبی برای تزریق‌های دردآور روزانه داروهای پروتئینی است. یکی از چالش‌های عمده برای توسعه چنین سامانه‌هایی افزایش بازده فرآیند تولید این ریزذرات و همچنین حفظ پایداری و خواص مواد دارویی و پروتئین‌های محبوس شده است. این مطالعه به منظور بررسی قابلیت روش امولسیون دوگانه-تبخیر حلال برای تهیه میکروسفرهایی از جنس پلی لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید حاوی پروتئین ویروس تضعیف شده (واکسن) آنفلوآنزای طیور و بررسی رهایش پروتئین در شرایط آزمایشگاهی (برون تن) انجام شد. به منظور افزایش پایداری و میزان رهایش پروتئین، نمک‌های قلیایی مانند: کربنات منیزیم همراه با پروتئین انکپسوله شد. در فرآیند تبخیر حلال و در فاز آبی دوم از افزودنی‌هایی نظیر نمک طعام و اوره به منظور تضمین و افزایش بارگذاری پروتئین استفاده شد. مطالعات نشان دادند که میکروسفرهای تولید شده کروی شکل هستند و سطحی تقریباً صاف و با تخلخل سطحی کم دارند. منحنی رهایش پروتئین نشان داد حضور نمک قلیایی همراه با پروتئین، میزان رهایش را افزایش می‌دهد؛ اما تأثیر قابل توجهی بر نرخ رهایش ندارد.

## واژه‌های کلیدی

سامانه‌های نوین دارورسانی، پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر، روش امولسیون دوگانه-تبخیر حلال، میکروسفر، پلی لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید، ویروس آنفلوآنزای طیور H9N2

## *Preparation and Release Behavior Evaluation of H9N2 Avian Influenza Virus Loaded PLGA Microspheres Using Double Emulsion-Solvent Evaporation*

Jamal Khazei , Fariba Orang , Ali Nazari Shirvan , Mahdi Aminian

### ABSTRACT

Microparticulate form of biodegradable polymers containing drugs is a promising approach toward new controlled release drug delivery systems, and a perfect alternative for daily painful injection of protein drugs. One major challenge in developing such systems is increasing efficiency of fabrication processes and retaining stability and effectiveness of encapsulated proteins and drugs. In this study capabilities of double

<sup>i</sup> دانشگاه صنعتی امیر کبیر (پلی تکنیک)، دانشکده مهندسی پزشکی، تلفن: ۰۲۱۶۴۵۴۲۲۶۴، فکس: ۰۲۱۶۴۹۵۶۵۵

<sup>ii</sup> دانشگاه صنعتی امیر کبیر (پلی تکنیک)، دانشکده مهندسی پزشکی، تلفن: ۰۲۱۶۴۵۴۲۲۶۴، فکس: ۰۲۱۶۴۹۵۶۵۵

<sup>iii</sup> کرج حصارک، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش بیوتکنولوژی، آزمایشگاه آنزیم

<sup>iv</sup> کرج حصارک، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش بیوتکنولوژی، آزمایشگاه آنزیم

emulsion (W/O/W) - solvent evaporation method for encapsulation of attenuated avian influenza virus (H9N2) in poly(lactic-co-glycolic acid) 50:50 were investigated and, the protein in vitro release profiles were determined. Some basic salts such as MgCO<sub>3</sub> co-encapsulated with protein were used to increase stability and release of the protein. Additives such as NaCl and urea were added to second water phase to ensure and increase loading of the protein. The microspheres were all spherical with almost smooth surface and some small pores. Release profiles reveal that MgCO<sub>3</sub> increased the amount of released protein but did not have a significant effect on release rate.

#### KEYWORDS

Controlled release drug delivery systems, Biodegradable polymers, Double emulsion-solvent evaporation method, Microsphere, Poly(lactic-co-glycolic acid), Avian influenza virus (H9N2).

بکارگیری یاور<sup>۶</sup> در واکسیناسیون می‌باشد. یاورها باعث بهبود کارایی واکسن‌ها در ایجاد پاسخ ایمنی مناسب در بدن می‌شوند و می‌توانند با مقادیر کمتری از عامل درمانی، تأثیرپذیری بیشتری در ایجاد ایمنی‌زایی در مقابل بیماری داشته باشند [۸]. به دلیل مشکلات موجود در سیستم‌های انتقال واکسن، به استفاده از سامانه‌های پلیمری رهایش دارو به منظور انتقال پروتئین‌ها و واکسن‌ها توجه شده است. مواد پلیمری؛ مانند پلی متیل متاکریلات، پلی آکریل آمید، پلی سیانوآکریلات، پلی لاکتیک اسید، پلی گلیکولیک اسید و کوپلیمر آنها به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان حامل یا افزایش دهنده اثر واکسن‌ها بکار می‌روند. تحقیقات متعدد نشان داده است نانوذرات پلیمری می‌توانند به عنوان جایگزین مناسبی برای یاورهای رایج مورد استفاده قرار گیرند. به عنوان مثال نانوذرات کوپلیمر پلی لاکتیک-گلیکولیک اسید در مقایسه با یاورهای رایج، پاسخ ایمنی بالاتری ایجاد می‌کنند [۹-۱۱]. از نانوذرات پلی لاکتیک-گلیکولیک اسید به عنوان یاور و بستر مناسب برای رهایش کنترل شده واکسن کزاز و دیفتتری استفاده شده است [۱۲ و ۱۳]. به‌طور کلی استفاده از نانوذرات به عنوان جایگزین مناسب برای یاورهای رایج مزایای متعددی دارد که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: (۱) نانوذرات پلیمری به عنوان یک حامل مؤثر برای هر آنتی‌ژنی مناسب هستند. (۲) فرآیند تولید نانوذرات بسیار سریع و نیاز به تجهیزات ساده، آب برای تزریق و نمک‌های آلی دارد. (۳) تکرارپذیری خواص آنها برای تمام نمونه‌ها بسیار عالی است. (۴) در مدت زمان طولانی انبارداری تغییری در مورفولوژی سطح، pH و اندازه ذرات به‌وجود نمی‌آید. (۵) امکان فعال کردن T-cell‌ها در واکسن‌های حاوی یاورهای نانوذره‌ای پلیمر وجود دارد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات پلیمری (از قبیل وزن مولکولی، اندازه ذرات، آبگریزی و حلالیت‌پذیری) نقش مهمی در افزایش پاسخ‌های ایمنی و ارزیابی یاور مفید، ایفا می‌کند. به طور مثال، مطالعات انجام شده نشان داده است ذرات پلیمری با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر یاور بهتری محسوب می‌شوند. از طرفی آبگریزی

#### ۱- مقدمه

ارتومیکسوویروس‌ها<sup>۲</sup> یا ویروس‌های آنفلوانزا عامل نوعی بیماری بسیار مسری هستند که در دستگاه‌های تنفس، گوارش و اعصاب جایگزین می‌شوند و گاهی در طیور به مرگ و میر بسیار شدید منجر می‌شوند. این ویروس‌ها به دو گروه ویروس‌های آنفلوانزا با قدرت بیماری‌زایی شدید<sup>۴</sup> (HPAI) و ویروس‌های آنفلوانزا با قدرت بیماری‌زایی کم یا متوسط (non-HPAI) تقسیم می‌شوند [۱].

واکسیناسیون یکی از مؤثرترین راه‌های مقابله با بیماری‌های ویروسی و عفونی است که تاکنون باعث نجات زندگی افراد زیادی در جهان و کاهش هزینه‌های درمان بیماری‌ها شده است [۲ و ۳]. از جمله ویژگی‌های موجود در یک واکسن، قابلیت ایجاد مصونیت در برابر عامل عفونت‌زا یا محصولات سمی آن است. در حال حاضر برای تهیه واکسن برخی از بیماری‌های عفونی مانند ایدز، وبا، جذام، مالاریا و تیفوس، از میان دشواری‌ها می‌توان به عدم شناسایی کامل مکانیزم‌های سلولی و مولکولی؛ که در ایجاد حافظه ایمنی در بیمار شرکت دارند، اشاره کرد. امروزه استراتژی‌های جدید برای دستیابی به ایمنی‌زایی مؤثر واکسن‌ها در دست است که از آن جمله می‌توان به تولید واکسن‌های مخاطی، بکارگیری یادآورها و آنتی‌ژن‌های تهیه شده به روش مهندسی ژنتیک و بیوشیمی اشاره کرد [۴].

واکسن‌های متداول آنفلوانزا، فرمولاسیون‌های غیرفعال هستند که به صورت غیر تزریقی تجویز می‌شوند و شامل پروتئین‌های هم‌گلوکوتینین<sup>۵</sup> (HA) و نورآمینیداز<sup>۶</sup> (NA) یا دیگر قسمت‌های ویروس می‌باشند. این واکسن‌ها تنها در ۶۰-۹۰٪ موارد، خاصیت ایمنی را فراهم می‌کنند [۵]. علت این امر عدم انطباق بین واکسن‌ها و رفتارهای آنتی‌ژنی ویروس‌ها [۶] و همچنین پاسخ‌های اختصاصی ضعیف به واکسن است [۷].

یکی از ساز و کارهای موجود برای بهبود عملکرد واکسن و اثر بخشی طولانی مدت و کاهش میزان مصرف عامل درمانی،

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید با نسبت کوپلیمری ۵۰:۵۰ (PLGA 50:50) با وزن مولکولی ۷۵-۴۰ KDa، متیلن کلراید (DCM)، کلرید سدیم (NaCl)، هیدروکسید سدیم (NaOH)، سدیم دودسیل سولفات (SDS) و کربنات منیزیم (MgCO<sub>3</sub>) از شرکت Sigma Aldrich و پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) با وزن مولکولی ۴۰ KDa و اوره (UltraPure, MW=۶۰ Da) از شرکت Fluka خریداری شد.

### ۲-۲- تهیه سویه H9N2 ویروس آنفلوآنزا

سویه H9N2 خالص و غیر فعال شده ویروس آنفلوآنزای طیور با تزریق ۰/۲ ml ویروس آنفلوآنزا در حفره آلتوتویک<sup>۱</sup> ۱۰۰۰ عدد تخم مرغ جنین‌دار SPF<sup>10</sup>، ۹-۱۱ روزه که از شرکت مرغک وابسته به سازمان اقتصادی کوثر خریداری شده بود، کشت و تکثیر یافت. بعد از گذشت ۷۲ ساعت انکوباسیون در انکوباتور با دمای ۳۷°C و رطوبت ۷۵ درصد (Biotech Galaxy R.S.) و بروز مرگ جنینی، مایع آلتوتویک جمع‌آوری شد. سپس مایع جمع‌آوری شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C و با سرعت ۳۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد، پس از طی این مرحله، مایع رویی برداشته شد. به منظور رسوب ذرات ویروسی و سایر پروتئین‌ها، غلظت PEG<sup>۱۱</sup> در محلول حاوی ویروس به ۱۰٪ w/v رسانده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، دوباره سانتریفیوژ تحت شرایط ۴°C و سرعت ۹۰۰۰ rpm به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت. رسوب حاصل؛ که حاوی ویروس و سایر پروتئین‌ها است، در محلول بافر TNE با ترکیب (۰/۱۲۵M EDTA.NaCl (۰/۰۱ M)، تریس<sup>۱۲</sup> (۰/۱ M) و pH=۷/۴-۷/۶، به صورت سوسپانسیونی یکنواخت درآمد و به مدت ۲۴ ساعت در محلول تریس ۱۰ mM، دیالیز شد تا PEG از محیط حذف شود. سپس مایع ویروسی دیالیز شده تحت شرایط ۲۰۰۰ rpm و طی دو ساعت در دمای ۴°C اولتراسانتریفیوژ (SORVALL ULTRA Pro 80) گردید. رسوب حاصل در ۱۰۰ ml بافر TNE به صورت سوسپانسیونی یکنواختی درآمد. برای تخلیص نهایی ویروس و حذف سایر مواد، عمل اولتراسانتریفیوژ با استفاده از گرادیان سوکروز<sup>۱۳</sup> با سرعت ۲۰۰۰ rpm و به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۰°C صورت گرفت.

### ۲-۳- تهیه میکروسفرهای PLGA حاوی ویروس H9N2

برای تهیه میکروسفرها از روش امولسیون دوگانه تبخیر

نانوذرات پلیمری به افزایش پاسخ‌های ایمنی بدن منجر می‌شود [۱۴]. استفاده از نانوذرات پلیمری این امکان را فراهم می‌کند که با توجه به نوع نیاز، مسیرهای مختلفی را برای تجویز واکسن در نظر گرفت. محققان نانوکپسول‌های پلیمری محتوی آنتی‌ژن را از طریق وریدی، عضلانی، زیرپوستی، استنشاقی و یا خوراکی تجویز کرده‌اند [۱۵ و ۱۶].

محققان روش‌های متعددی را برای ساخت میکرو نانوذرات پلیمری پیشنهاد کرده‌اند. چنین ذراتی را می‌توان از طریق پلیمریزاسیون مونومرهایی که مولکول‌های دارو در آنها قرار گرفته‌اند، تولید کرد و یا آنکه از طریق پلیمرهای از پیش تهیه شده به دست آورد؛ اما به منظور ساخت میکروسفرهای کوپلیمر پلی‌لاکتیک-گلیکولیک اسید بیشتر از پلیمرهای از پیش تهیه شده استفاده می‌شود [۱۷].

روش تبخیر حلال<sup>۱۴</sup> یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای انکپسوله کردن است. مواد تشکیل دهنده هسته و دیواره در یک حلال فرار آلی و امتزاج ناپذیر با آب حل می‌شوند و محلول حاصل در یک محلول آبی به صورت امولسیون در می‌آید. با گذشت زمان حلال تبخیر می‌شود و در نهایت میکروکپسول‌ها یا ریزذرات جامد تولید می‌شوند. در حالتی دیگر، از این روش یک امولسیون دوگانه تشکیل می‌شود که در آن ماده تشکیل دهنده هسته به صورت یک محلول آبی در محلول پلیمر در یک حلال آلی فرار، ریخته شده و چنان همزده می‌شود که امولسیون حاصل شود. امولسیون به دست آمده مجدداً درون یک فاز آبی به صورت امولسیون درمی‌آید تا نتیجه کار امولسیون دوگانه باشد. تبخیر حلال فرار، میکروکپسول‌هایی با یک هسته آبی به جای می‌گذارد [۱۸]. در تحقیقی که زانگ (Zhang) و همکارانش برای بارگذاری سرم آلبومین گاوی بر روی ذرات پلیمری کوپلیمر پلی‌لاکتیک-گلیکولیک اسید به روش امولسیون یگانه آب در روغن (W/O)- تبخیر حلال انجام دادند، میزان بارگذاری پروتئین حداقل ۶۱٪ و حداکثر ۸۶٪ گزارش شد [۱۹].

هدف در مطالعه حاضر، بررسی قابلیت‌های روش امولسیون دوگانه - تبخیر حلال برای تهیه میکروسفرهای پلیمری از جنس پلی‌لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید (PLGA) حاوی پروتئین ویروس تضعیف شده آنفلوآنزای طیور سویه H9N2 (واکسن آنفلوآنزای طیور) و بررسی رهايش پروتئین در شرایط *in vitro* است. بدین منظور سعی شده است روشی به کار گرفته شود که بازده بارگذاری را افزایش دهد. همچنین در این تحقیق تأثیر به کارگیری نمک‌های قلیایی در حفظ پایداری پروتئین (ویروس آنفلوآنزا) محبوس شده در میکروسفرها، مطالعه شده است.

حلال و از روش چن (Chen) و همکارانش [۲۰]، با اندکی تغییر استفاده شد. مقدار ۱ ml از ویروس تخلیص و دیالیز شده؛ که براساس سنجش پروتئینی به روش Lowry، حاوی حدود ۳mg/ml پروتئین ویروس بود، به عنوان فاز آبی اول برداشته شد و به ۵ ml محلول PLGA در متیلن کلراید (محلول ۶ w/v) افزوده شد. مجموعه حاصل به وسیله هموژنایزر (IKA® Yellow Line; DI18 disperser; S18N-10G) به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm همزده شد تا امولسیون اولیه آب-روغن (W1/O) به دست آید. امولسیون به دست آمده به یکباره به حجم ۳۰ ml فاز آبی دوم؛ که حاوی PVP (۵ w/v) و NaCl (۵ w/v) و فشار اسمزی آن با افزودن مقدار مشخصی اوره، در ۱۲/۴ Osmol/Kg تثبیت شده بود، اضافه شد و به مدت یک دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm به وسیله هموژنایزر به هم زده شد. امولسیون ثانویه حاصل به صورت دوگانه W1/O/W2 بوده و به وسیله همزن مغناطیسی (Cerhardet, model: HEIZPLATTE-HSR2) در دمای اتاق و به مدت ۵ الی ۶ ساعت همزده شد. در طول زمان تخریب برای مشاهده قطرات پراکنده شده، به وسیله میکروپیت حجمی معادل ۵۰-۳۰ μl از محلول در حال همزدن برداشته شد و روی لام شیشه‌ای قرار گرفت و به وسیله میکروسکوپ نوری (Motic-B Series) بررسی شد. پس از گذشت زمان لازم برای تخریب حلال و سخت شدن ذرات موجود در محلول، عملیات جمع‌آوری ذرات و شستشوی آنها انجام شد. برای جمع‌آوری ذرات، کل محلول به داخل لوله فالکون ۵۰ ml (Falcon™) ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد (HETTICH, RotinA 35R, Germany). پس از ته‌نشینی کامل ذرات، مایع رویی جمع‌آوری شد، تا به منظور ارزیابی بازده بارگذاری از نظر مقدار پروتئین منتقل شده به فاز آبی دوم بررسی شود. به ذرات ته‌نشین شده حدود ۳۰ تا ۴۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده شد و پس از همزدن و پراکنده شدن مجدد ذرات ته‌نشین شده عمل سانتریفیوژ به طور مشابه انجام گردید. این مرحله، ۳ بار تکرار شد تا میکروسفرها به خوبی شسته شده و احتمال اتصال پروتئین‌ها به سطح آنها به حداقل برسد. در پایان این مرحله و پس از ته‌نشینی ذرات، تا حد امکان مایع رویی ذرات ته‌نشین شده، جدا و ظروف حاوی ذرات به فریزر با دمای ۷۰°C- منتقل شد. سپس با استفاده از دستگاه خشک کن سرمایشی<sup>۱۴</sup> و در دمای ۵۰°C- و فشار ۰/۰۵ mbar عملیات لیوفیلیزاسیون ذرات انجام گرفت. بسته به حجم نمونه‌ها ۴ تا ۸ ساعت برای این عملیات صرف شد. پس از اتمام این مرحله میکروسفرها در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. در جدول ۱ جزئیات ترکیب اجزاء تشکیل دهنده فازهای آبی اول و دوم و فاز آلی برای نمونه‌های

ساخته شده ارائه شده است.

## ۲-۴- تهیه تصاویر SEM

به منظور مطالعه شکل و مورفولوژی سطحی میکروسفرها از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل (SEM, Cambridge Instrument Ltd., Model S.360) استفاده شد. بدین منظور میکروسفرهای لیوفیلیزه شده بر روی پایه‌های مخصوص؛ که چسب دوطرفه دارند، قرار گرفت و پس از پوشش‌دهی با طلا (Auto Sputter Coater Biorad E5200)، از نمونه‌ها با دستگاه SEM تصویر برداری شد.

## ۲-۵- تعیین توزیع ابعادی ذرات به وسیله LPSA<sup>۱۵</sup>

حدود ۳۰ mg از میکروسفرها در ۱ ml محلول ۱ w/v Tween 60 به وسیله vortex پراکنده شد و سپس به وسیله دستگاه LPSA مدل (FRITSCH-analysset, Type 22.902) تحلیل ابعادی شد.

## ۲-۶- تعیین بازده بارگذاری

برای تعیین بازده بارگذاری پروتئین، ۳۰ mg از هر یک از سه نوع میکروسفر تهیه شده در ۱/۵ ml محلول ۰/۳ M NaOH حاوی ۵ w/v سدیم دودسیل سولفات (SDS) حل شدند. سپس نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۷°C روی همزن قرار داده شد تا تخریب و خارج شدن پروتئین بارگذاری شده به طور کامل صورت گیرد. استفاده از SDS علی‌رغم تأثیری که ممکن است بر ساختار پروتئین داشته باشد، برای تسهیل جداسازی پروتئین از میکروسفرها ضروری است. پس از اطمینان از انحلال میکروسفرها، نمونه سانتریفیوژ شد تا ذرات احتمالی موجود در آن به طور کامل ته‌نشین شوند و سپس مایع رویی جدا و با استفاده از روش پروتئین سنجی Lowry، مقدار پروتئین موجود در آن تعیین شد [۲۱]. به منظور مقایسه تغییرات ساختاری احتمالی پروتئین در مراحل محبوس سازی آن، پروتئین رها شده در این محلول به وسیله الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌امید [۲۲] و رنگ آمیزی نیترا نقره آمونیاکی [۲۳] بررسی و مقایسه شد.

## ۲-۷- مطالعه رهایش در حالت *in vitro*

۳۰ mg از میکروسفرهای حاوی پروتئین پس از توزین دقیق به ۱ ml محلول فسفات بافر سالین (pH=۷/۴) (PBS) (۱۷۰ mM NaCl، ۳/۴ mM KCl، ۱/۸ mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>، ۱۰ mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) حاوی ۰/۰۲ w/v سدیم آزید، اضافه و با همزدن پراکنده شد. نمونه‌ها در دمای ۳۷°C و با همزدن گاه به گاه به مدت بیش از ۴۰ روز نگهداری شدند. در زمان‌های ۳۰ دقیقه، ۲

بنفش نیز مورد سنجش قرار گرفتند. نمونه‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر Spectrophotometer Pharmacia biotech Ultra Spec 2000 با قابلیت کار در محدوده مرئی و ماوراء بنفش در طول موج ۲۸۰ nm بررسی شدند. از نظر دقت اندازه‌گیری روش ELISA قابلیت اندازه‌گیری پروتئین را در محدوده ۰/۰۱-۰/۱ نانو گرم و روش اسپکتروفتومتری ماورای بنفش قابلیت اندازه‌گیری پروتئین با غلظت بیش از ۴ mg/ml را دارد [۲۵].

ساعت، ۱، ۳ و ۴ روز پس از آغاز رهایش و سپس به صورت هفتگی، نمونه‌ها از انکوباتور خارج و با سرعت ۱۱۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس بافر روی نمونه‌ها تخلیه و با بافر تازه جایگزین شد و دوباره به انکوباتور منتقل شدند. بافرهای برداشت شده تا زمان سنجش در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. برای سنجش میزان پروتئین موجود در بافر، از روش طیف سنجی ماورای بنفش در طول موج ۲۸۰ nm و روش ELISA<sup>۱۷</sup> استفاده شد [۲۴]. به منظور کنترل و مقایسه نتایج، نمونه‌های بافر جدا شده با روش طیف‌سنجی ماورای

جدول (۱): مشخصات نمونه‌های تهیه شده

| نمونه    | W1 فاز آبی اول   | O فاز روغنی                   | W2 فاز آبی دوم  |
|----------|--|-------------------------------|---|
| MS-B     | ۱ ml آب  | ۵ ml محلول PLGA در DCM (۶w/v) | ۳۰ ml محلول NaCl (۵٪) و PVP (۵٪) و اوره (با فشار اسمزی ۱/۲۴ Osmol/kg) |
| MS-AI    | ۱ ml محلول پروتئین H9N2 (با غلظت ≈۲mg/ml)                                  | ۵ ml محلول PLGA در DCM (۶w/v) | ۳۰ ml محلول NaCl (۵٪) و PVP (۵٪) و اوره (با فشار اسمزی ۱/۲۴ Osmol/kg) |
| MS-AI-MC | ۱ ml محلول پروتئین H9N2 (با غلظت ≈۲mg/ml) به همراه MgCO <sub>3</sub> ۳ w/v | ۵ ml محلول PLGA در DCM (۶w/v) | ۳۰ ml محلول NaCl (۵٪) و PVP (۵٪) و اوره (با فشار اسمزی ۱/۲۴ Osmol/kg) |

حد قابل قبول برای فرآیند امولسیون دوگانه-تبخیر حلال است [۱۹].

### ۳- نتایج

#### ۳-۱- بازده فرآیند تولید میکروسفر

بازده فرآیند تولید میکروسفر از مقایسه مقدار اولیه پلیمر و پروتئین مصرف شده با مقدار میکروسفر به دست آمده قابل تعیین است:

$$\text{وزن پروتئین} + \text{وزن پلیمر} \times 100 = \frac{\text{وزن میکروسفر}}{\text{بازده فرآیند تولید}}$$

مقادیر بازده تولید میکروسفر در (جدول ۲) آمده است.

#### ۳-۲- مورفولوژی و توزیع ابعادی میکروسفرها

با توجه به تصاویر SEM، مشاهده شد که میکروسفرهای تهیه شده تقریباً کروی شکل هستند و سطحی صاف دارند (شکل ۱). در نمونه‌های حاوی پروتئین حفره‌های ریزی نیز به صورت پراکنده روی سطح میکروسفرها دیده می‌شود. اندازه‌گیری ابعاد ذرات به وسیله دستگاه LPSA، نشان‌دهنده توزیع نرمال ابعاد ذرات است. اندازه میکروسفرهای تولید شده در محدوده ۱۴-۱۰ μm می‌باشد. میانگین ابعادی میکروسفرهای تهیه شده در (جدول ۲) آمده است.

#### ۳-۳- بازده بارگذاری پروتئین در میکروسفرها

پس از هیدرولیز و تخریب میکروسفرها در محلول NaOH ۰/۳M حاوی SDS ۵ w/v٪، مقدار مؤثر پروتئین بارگذاری شده به روش Lowry اندازه‌گیری شد (جدول ۲). میزان بارگذاری در

جدول (۲): مشخصات میکروسفرهای تولید شده

| نمونه    | بازده تولید (%) | بازده بارگذاری (%) | قطر متوسط ذرات (μm) |
|----------|-----------------|--------------------|---------------------|
| MS-B     | ۷۳              | —                  | ۱۰/۴۶               |
| MS-AI    | ۸۶              | ۷۲                 | ۱۲/۵۲               |
| MS-AI-MC | ۷۵              | ۶۷                 | ۱۳/۷۹               |

#### ۳-۴- مطالعه رهایش پروتئین

به منظور مطالعه رهایش پروتئین، از دو روش ELISA (به شیوه Antigen Capture Assay) و روش اسپکتروفتومتری ماورای بنفش استفاده شد. روش اسپکتروفتومتری عملاً حساسیت لازم برای اندازه‌گیری کمی غلظت پروتئین، در محدوده غلظتی مورد استفاده در این آزمایش‌ها را ندارد و فقط برای بررسی روند کلی تغییرات غلظت پروتئین به کار گرفته شد. بنابراین از روی اطلاعات به دست آمده تنها می‌توان نمودار میزان جذب بر حسب زمان سپری شده را رسم کرد (شکل ۲).

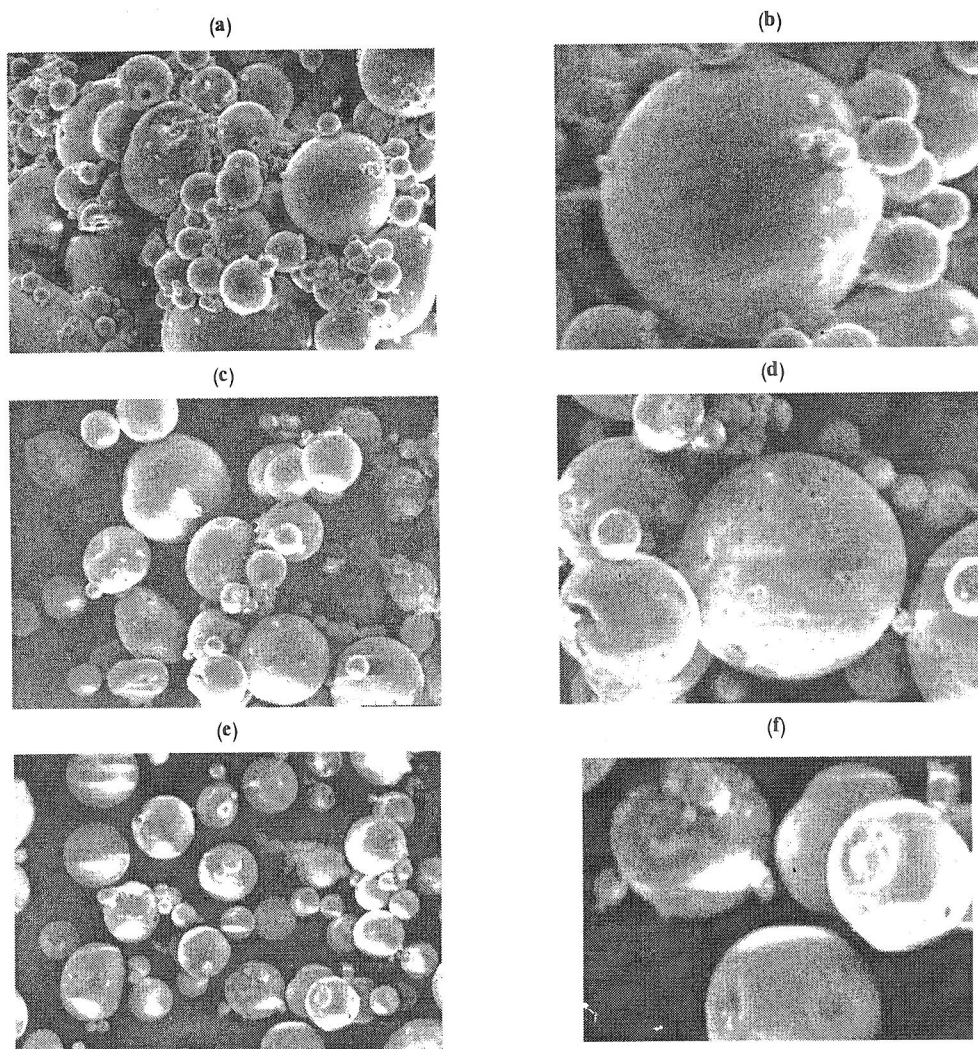
با توجه به دقت بسیار خوب روش ELISA در اندازه‌گیری میزان آنتی‌ژن، کلیه اندازه‌گیری‌های کمی با استفاده از همین روش انجام شد. شکل (۲) نشان دهنده آن است که میکروسفرهای بارگذاری شده با پروتئین (نمونه‌های MS-AI و MS-AI-MC)، در طی روزهای اول مقادیر زیادی از پروتئین بارگذاری شده را آزاد می‌کنند. رهایش سریع اولیه یا به عبارت دیگر، رهایش انفجاری، در طی این مرحله حدود ۲۵ تا ۴۵

درصد از کل پروتئین بارگذاری شده است. با توجه به بازده بارگذاری میکروسفرها، مشاهده می‌شود که در طول دوره بررسی رهایش پروتئین از میکروسفرها (حدود ۴۰ روز) تنها ۶۰ تا ۷۵ درصد از پروتئین محبوس شده رها شده است (شکل ۳ و ۴). به نظر می‌رسد که حضور  $MgCO_3$  میزان رهایش پروتئین را تا حدودی افزایش داده است که این موضوع نتایج محققان دیگر را تأیید می‌کند [۲۶].

#### ع- بحث

بازده فرآیندهای امولسیون دوگانه-تبخیر حلال به شدت وابسته به شرایط فیزیکی و تجهیزات مورد استفاده در حین

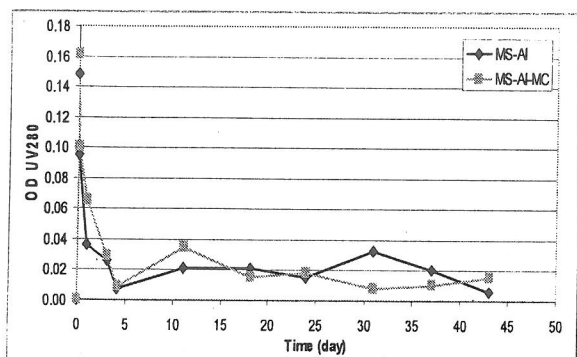
تولید است. در این روش، تشکیل ذرات از چندین فاکتور متأثر است که عبارتند از (۱) دمای فرآیند تبخیر حلال، (۲) وزن مولکولی پلیمر، (۳) نسبت دارو به پلیمر، (۴) حجم حلال مصرفی، (۵) غلظت و نوع عامل سطح فعال (سورفکتانت)، (۶) سرعت همزدن و میزان نیروی برشی بکاررفته به منظور تشکیل امولسیون، (۷) حلالیت دارو، (۸) ویسکوزیته و نسبت حجم فاز پیوسته [۲۷ و ۲۸]. با توجه به نتایج جدول (۲) مشاهده می‌شود که بازده تولید میکروسفرها در نمونه MS-AI-MC (نمونه حاوی  $MgCO_3$ ) نسبت به سایر نمونه‌ها کمتر است.



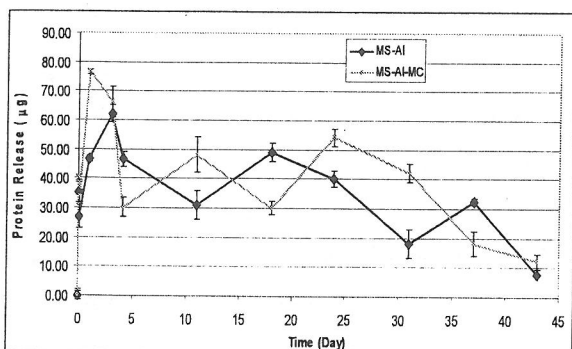
شکل (۱): تصاویرهای SEM از نمونه MS-B با بزرگنمایی (a) ۱۰۰۰X و (b) ۲۵۰۰X، نمونه MS-AI با بزرگنمایی (c) ۱۰۰۰X و (d) ۲۵۰۰X، و نمونه MS-AI-MC با بزرگنمایی (e) ۱۰۰۰X و (f) ۲۵۰۰X

در آب تقسیم‌بندی می‌شود و میزان حلالیت آن کمتر از ۱٪ است، نمی‌تواند تأثیری در ایجاد گرایان غلظتی و مهاجرت فازهای مایع داشته باشد. اما استفاده از NaCl و اوره در فاز آبی دوم باعث افزایش بازده بارگذاری شده است. حضور

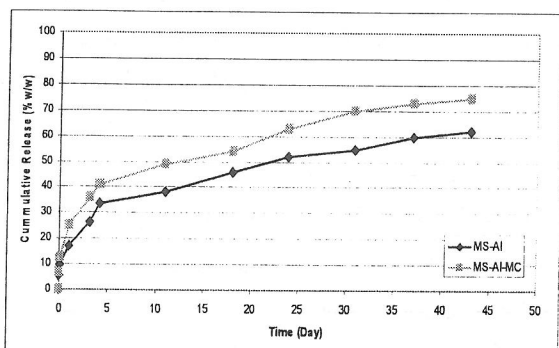
شاید حضور و یا ایجاد توده‌هایی از پودر  $MgCO_3$  قبل و یا در هنگام تهیه میکروسفرها باعث ناپایدار شدن تعدادی از قطرات فاز آلی پراکنده شده در فاز پیوسته شود و به کاهش بازه تولید بیانجامد. از آنجا که  $MgCO_3$  در دسته مواد نامحلول



شکل (۲): منحنی آزادسازی پروتئین از میکروسفرهای PLGA بر حسب زمان، اندازه‌گیری شده با روش اسپکتروسکوپی



شکل (۳): منحنی آزادسازی پروتئین از میکروسفرهای PLGA بر حسب زمان، اندازه‌گیری شده با روش ELISA



شکل (۴): منحنی رهایش تجمعی پروتئین بر حسب زمان در شرایط *in vitro*

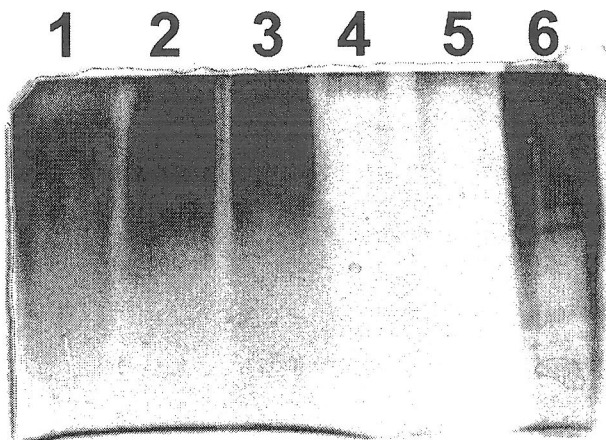
یکناختی ابعاد ذرات نشان‌دهنده مناسب بودن روش تهیه میکروسفرها برای تولید چنین ذراتی است. کوچک بودن ذرات به دست آمده این امیدواری را ایجاد می‌کند که بتوان از این میکروسفرها در مرحله *in vivo*، هم به صورت خوراکی و هم به صورت تزریقی استفاده کرد. میکروسفرهایی برای کاربرد خوراکی در مطالعات *in vivo* مناسب‌ترند که قطری حدود  $1-10 \mu\text{m}$  داشته باشند تا در دستگاه گوارش قابل جذب باشند [۱۲].

با بررسی نمودار آزادسازی پروتئین بر حسب زمان؛ که بر اساس طیف‌سنجی ماورای بنفش تهیه شده است (شکل ۲)، می‌توان فرآیند رهایش را به دو مرحله رهایش سریع اولیه (یا

NaCl در فاز آبی دوم باعث کاهش حلالیت پروتئین در آن خواهد شد. در محلولی با توان یونی زیاد، افزودن نمک به محلول باعث نامحلول شدن پروتئین و رسوب آن خواهد شد [۲۹]؛ زیرا یون‌های موجود در محلول آبی به گروه‌های باردار پروتئین حمله می‌کند و از واکنش آن با مولکول‌های حلال (یعنی آب) مانع می‌شود. NaCl همچنین باعث ایجاد گرادیان غلظتی در فاز آبی دوم نسبت به فاز آبی اول می‌شود [۳۰]. در این حالت، فاز آبی در حال سخت شدن نقش یک غشای نیمه تراوا را ایفا می‌کند و در نتیجه گرادیان غلظتی آب موجود در داخل میکروسفرها به سمت خارج منتقل می‌شود؛ اما مولکول‌های درشت پروتئین به دشواری از این غشای می‌گذرند. خروج آب باعث می‌شود حجم قطرات فاز آبی داخلی کمتر شده و قطر کوچک‌تری پیدا کنند. کوچک‌تر شدن این قطرات پراکنده شده در فاز آبی، باعث می‌شود قطره‌های فاز آبی پایداری بیشتری پیدا کند و در نتیجه، بازده بارگذاری افزایش یابد. افزودن اوره به فاز آبی دوم نیز در ایجاد فشار اسمزی به سمت خارج و تعیین جهت گرادیان غلظتی مؤثر است با این تفاوت که اوره یونیزه نمی‌شود و برتوان یونی فاز آبی دوم تأثیری نخواهد داشت [۲۰].

تخلخل سطحی در میکروسفرهای تولید شده را می‌توان نتیجه فرآیند خروج و تبخیر آرام حلال از میکروسفر دانست که باعث می‌شود میکروسفرها دیرتر سخت شوند و در بازه زمانی طولانی‌تری قابلیت انقباض و تغییر شکل پیدا کنند. در نتیجه، قطرات پراکنده شده‌ای که به سطح میکروسفر نزدیک‌تر هستند، امکان مهاجرت و تماس با سطح خارجی و فاز پیوسته را دارند که در نهایت به ایجاد حفره در سطح منجر می‌شود. مهاجرت قطرات فاز آبی داخلی به سمت خارج فقط در مرحله ابتدایی فرآیند تبخیر حلال و شکل‌گیری میکروسفرها ممکن است؛ یعنی زمانی که لایه مرزی پلیمر در میکروسفرها ویسکوزیته زیادی ندارد و به راحتی تغییر شکل پیدا می‌کند. به دلیل حضور نمک در فاز آبی خارجی گرادیان غلظتی به سمت خارج میکروسفرها وجود دارد که باعث می‌شود قطرات آب داخل میکروسفر نیروی محرکه لازم برای خروج از میکروسفر را پیدا کنند [۳۱] و این حفره‌ها می‌توانند ردپایی از خروج این فاز آبی داخلی باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید (شکل ۵) همان گونه که انتظار می رفت میزان پروتئین انکپسوله نشده؛ که به فاز آبی دوم منتقل می شود، ناچیز است ستون های مربوط به هیدرولیز نمونه های میکروسفر باندهای پروتئینی شاخص ویروس H9N2 را به درستی نشان ندادند. اما این مورد برای نمونه شاهد مثبت؛ یعنی پروتئین H9N2 قرار گرفته در معرض محیط هیدرولیز، دیده شد که بیانگر این واقعیت است که آسیب دیدگی ساختار پروتئین و توده ای شدن آن و عدم ظهور باندهای شاخص، ناشی از تأثیر محیط نامساعد هیدرولیز بوده است. عدم ظهور باند قابل رویت در ستون مربوط به نمونه MS-B نشانه عدم تداخل و بی تأثیر بودن مونومرهای ناشی از هیدرولیز پلیمر در فرآیند الکتروفورز است. بنابراین، شدت رنگ ظاهر شده در ستون های ۲ و ۳ تنها به پروتئین مربوط است و نشانه میزان بارگذاری نسبتاً خوبی است.



شکل (۵): ژل پلی اکریل آمید رنگ آمیزی شده به روش نیترات نقره آمونیاکی. [(۱) پروتئین H9N2 در معرض محیط هیدرولیز (۲) محلول هیدرولیز MS-AI (۳) محلول هیدرولیز MS-AI-MC (۴) محلول هیدرولیز MS-B (۵) W2 پس از جمع آوری میکروسفرهای MS-AI (۶) پروتئین H9N2]

## ۵- نتیجه گیری

در این مطالعه، سویه H9N2 ویروس آنفلوآنزای طیور پس از استخراج و تخلیص، به روش امولسیون دوگانه- تبخیر حلال در میکروسفرهایی از جنس پلی لاکتیک-کو- گلیکولیک اسید (PLGA 50:50) انکپسوله شد. فرآیند محبوس سازی پروتئین در پلیمرهای زیست تخریب پذیر همواره دشواری ها و پیچیدگی هایی را به همراه دارد. از جمله این موارد بازده کم بارگذاری و تخریب و ناپایدار شدن پروتئین و عوامل فعال بیولوژیکی هستند. استفاده از افزودنی هایی در فاز آبی دوم؛ مانند نمک (NaCl) و اوره برای بهینه کردن شرایط تهیه

رهایش انفجاری) و رهایش یکنواخت با سرعت کم، تقسیم بندی کرد. نمودار شکل (۲) با نمودار رهایش پروتئین؛ که بر پایه اندازه گیری با روش ELISA تهیه شده است (شکل ۳)، همخوانی خوبی دارد. پروتئین هایی که در هنگام تولید میکروسفرها به سطح آنها چسبیده اند و حتی پس از شستشو نیز تا حدودی باقی مانده اند، همچنین پروتئین هایی که نزدیک به سطح میکروسفر محبوس شده اند را می توان عاملی برای این رهایش انفجاری دانست (شکل ۴). در مراحل ابتدایی پس از آغاز رهایش، دو مکانیزم در آزادسازی پروتئین ها مؤثر است: (۱) نفوذ از طریق حفره های سطحی و غشای پلیمری، (۲) تخریب پلیمر و شکستن زنجیره های آن در اثر هیدرولیز؛ که باعث می شود مسیر نفوذ آب و خروج پروتئین گشوده شود [۲۸]. تغییر شرایط محیطی در تغییر زمان تخریب پلیمر مؤثر است. برای مثال در یک محیط ایستا، با آغاز تخریب پلیمر و آزاد شدن گروه های اسیدی، pH محیط کاهش می یابد که این امر می تواند روند تخریب را سریع تر کند. بنابراین، با گذشت زمان و پیشرفت تخریب، نرخ تخریب نیز شدت می یابد [۱۸]؛ اما نمی توان انتظار داشت که با افزایش نرخ تخریب، رهایش نیز تندتر شود؛ زیرا غلظت پروتئین نیز در میکروسفر رو به کاهش است. بنابراین، علی رغم ایجاد بستر متخلخل تر برای نفوذ و خارج شدن پروتئین ها، نمودار رهایش به صورت خطی و از درجه صفر خواهد شد که این مورد در شکل (۴) به خوبی نشان داده شده است.

عوامل ناپایدار کننده پروتئین نیز در تعیین پروفیل رهایش نقش بسیار مهمی دارند؛ به گونه ای که ممکن است پروتئین تحت تأثیر این عوامل توده ای شده و قابلیت حلالیت خود در آب را از دست بدهد. در نتیجه، در بستر پلیمری خود رسوب می کند و به فاز آبی محیط رهایش منتقل نمی شود که این امر باعث کاهش میزان رهایش خواهد شد. یکی از عوامل مؤثر در ناپایدارسازی پروتئین ها pH محیط است [۲۲]. شرایط محیطی حاکم بر میکروسفرها به گونه ای است که با پیشرفت روند تخریب، فضای درون میکروسفرها در اثر رها شدن گروه های اسیدی حاصل از شکسته شدن زنجیره ها، به شدت اسیدی می شود [۲۳]. این محیط اسیدی عاملی است که باعث توده ای شدن پروتئین و کاهش قابلیت انحلال آن در فاز آبی و توانایی خارج شدن آن از میکروسفر خواهد شد. حضور نمک هایی مانند  $MgCO_3$  باعث افزایش pH محیط و ایجاد محیطی تقریباً خنثی برای پروتئین می شوند که پایداری پروتئین را به مدت طولانی تری حفظ می کند. از طرفی، افزایش pH محیط نرخ تخریب پلیمر را کند می کند و نیمه عمر آن را افزایش خواهد داد [۲۴].



Bilati U.; Allémann E.; Doelker E.; "Strategic Approaches for Overcoming Peptide and Protein Instability within Biodegradable Nano- and Microparticles", Euro. J. Pharm. Biopharm., vol. 59, p.p. 375-388, 2005.

Desai M.; Hilfinger J.; Amidon G.; Levy R.J.; Labhasetwar V.; "Immune Response with Biodegradable Nanospheres and Alum: Studies in Rabbits Using Staphylococcal Enterotoxin B-toxin", J. Microencapsulation, vol. 17, p.p. 215-225, 2000.

Jung T.; Kamm W.; Breitenbach A.; Hungerer K.D.; Kissel T.; "Tetanus Toxoid Loaded Nanoparticles from Sulfobutylated Poly(vinyl alcohol)-graft-Poly(lactide-co-glycolide): Evaluation of Antibody Response after Oral and Nasal Application in Mice", Pharm. Res., vol. 18, p.p. 352-360, 2001.

Kreuter J.; "Physicochemical Characterization of Nanoparticles and their Potential for Vaccine Preparation", Vaccine Res., vol. , p.p. 93-98, 1992.

Florence A.T.; "The Oral Absorption of Micro-and Nanoparticles: Neither Exceptional nor Unusual", Pharm. Res., vol. 14 p.p. 259-266, 1997.

Jacqueline M.K.; Xiuhua L.; Charles W.T.; Mark J.N.; "A Nonionic Block co-Polymer Adjuvant (CRL1005) Enhances the Immunogenicity and Protective Efficacy of Inactivated Influenza Vaccine in Young and Aged Mice", Vaccine, vol. 18, p.p. 2177-2187, 2000.

Kevin J.W.; Lonnie D.S.; "Delivery Systems for Small Molecule Drugs, Proteins and DNA: The Neuroscience/Biomaterial Interface", Exp. Neurol., vol. 190, p.p. 1-16 2004

Mathiowitz E.; Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, 1<sup>st</sup> Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999.

Zhang J.X.; Zhu K.J.; Chen D.; "Preparation of Bovine Serum Albumin Located Poly(L,D-lactide-glycolide acid) Microspheres by Modified Phase Separation Technique", J. Microencapsulation, Vol. 22 p.p. 117-126, 2005.

Chen J.L.; Chiang C.H.; Yeh M.K.; "The Mechanism of PLA Microparticle Formation by Water-in-Oil-in-Water Solvent Evaporation Method", J. Microencapsulation, vol. 19, p.p. 333-346, 2002.

Walker J.M.; The protein Protocols Handbook, Human Press Inc., New Jersey, 1996.

Walker J.M.; Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis of protein: Basic protein and peptide protocols, Humana Press, New Jersey, 1994.

مصطفایی، علی؛ الکتروفورز پروتئین در ژل، انتشارات تزکیه، تهران، ۱۳۷۸.

FMD ELISA KIT, Indirect Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antigens of Food and Mouth Disease Virus, bench protocol: NP FERRIS, IRAN, February, 2001

Harlow E.; Lane D.; Antibodies, a laboratory manual, Cold Spring Harbor, New York, 1988.

- [۱۱] میکروسفر، دستیابی به بازده بارگذاری در حدود ۷۰ درصد را ممکن ساخت که در حد قابل قبول برای این روش است. به کارگیری نمک‌های قلیایی مثل  $MgCO_3$  در فاز آبی داخلی در حفظ پایداری پلیمر تأثیر مثبت دارد و میزان رهایش را در طول دوره رهایش نسبت به نمونه‌های بدون  $MgCO_3$  افزایش می‌دهد. ذره‌های به دست آمده ابعادی متوسط در حدود ۱۴-۱۰ میکرومتر داشته و کروی شکل بودند. سطح این میکروسفر تقریباً صاف و تخلخل‌های پراکنده و ناچیزی در سطح آنها قابل مشاهده بود.

## ۶- مراجع

- [۱] جلالی، هادی؛ جداسازی و تخلیص پروتئین H9 ویروس آنفلوانزای طیور سویه H9N2 برای تهیه آنتی سرم اختصاصی، پایان نامه دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ۱۳۸۲.
- [۲] خاضعی، جمال؛ ساخت میکروسفرهای PLGA به روش امولسیون دوگانه-تبخیر حلال و ارزیابی الگوی رهایش ویروس H9N2 آنفلوانزای طیور، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی پزشکی دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ۱۳۸۳.
- [۳] Zhou Sh.; Liao X.; Li X.; Deng X.; Li H.; "Poly-D,L-Lactide-co-Poly(ethylene glycol) Microspheres as Potential Vaccine Delivery Systems", J. Control. Release, vol. 86, p.p. 195-205, 2003.
- [۴] Jaing W.; Gupta R. K.; Deshpande M.C.; Schwendeman S.P.; "Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens", Adv. Drug Deliv. Rev., vol. 57 p.p. 391-410, 2005.
- [۵] Couch R.B.; Keitel W.A.; Cate T.R.; "Improvement of Inactivated Influenza Virus Vaccines", J. Infect. Dis., vol. 176, p.p. 38-44 1997.
- [۶] Potter C.W.; Jennings R.; "Intranasal Immunisation with Inactivated Influenza Vaccine", Pharm. Sci. Technol. Today, vol. 2, p.p. 402-408, 1999.
- [۷] Miller R.A.; "The Aging Immune System: Primer and Prospectus", Science, vol. 273, 70-74 1996.
- [۸] Cohen S.; Bernstein H.; Microparticulate Systems for Vaccine Delivery, 1<sup>st</sup> Edition, Marcel Dekker Inc., 1996.
- [۹] Lemoine D.; Pr at V.; "Polymeric Nanoparticles as Delivery System for Influenza Virus Glycoproteins", vol. 54 p.p. 1527 1998.
- [۱۰] Aucouturier J.; Dupuis L.; Ganne V.; "Adjuvants Designed for Veterinary and Human Vaccines", Vaccine, vol. 19 p.p. 2662-2672, 2001.

- 1 - Biodegradable
- 2 - Drug Delivery System
- 3 - Orthomyxovirus
- 4 - Highly Pathogenic Avian Influenza
- 5 - Hemagglutinin
- 6 - Neuraminidase
- 7 - Adjuvant
- 8 - Solvent Evaporation
- 9 - Allantoic
- 10 - Specific Pathogen Free
- 11 - Polyethylene glycol
- 12 - Tris
- 13 - Sucrose Gradient
- 14 - Freeze Dryer
- 15 - Laser Particle Size Analyzer
- 16 - Phosphate Buffer Saline
- 17 - Enzyme Linked Immunosorbent assay

- Lamprecht A.; Ubrich N.; Hombreiro Pérez M.; Lehr C.M.; Hoffman M.; Maincent P.; "Influences of Process Parameters on Nanoparticle Preparation Performed by a Double Emulsion Pressure Homogenization Technique", Int. J. Pharm., vol. 196, p.p. 177-182, 2000. [۲۶]
- Vandervoort J.; Ludwig A.; "Biocompatible Stabilizers in the Preparation of PLGA Nanoparticles: a Factorial Design Study", Int. J. Pharm., vol. 238, p.p. 77-92, 2002. [۲۷]
- Lee T.H.; Wang J.; Wang C.H.; "Double-Walled Microspheres for the Sustained Release of a Highly Water Soluble Drug: Characterization and Irradiation Studies", J. Control. Release, vol. 83 p.p. 437-452, 2002. [۲۸]
- Park T.G.; Yong Lee H.; Sung Nam Y.; "A New Preparation Method for Protein Loaded Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) Microspheres and Protein Release Mechanism Study", J. Control. Release, vol. 55 p.p. 181-191, 1998. [۲۹]
- Perugini P.; Ida Genta I.; Cont B.; Modena T.; Pavanetto F.; "Long-Term Release of Clodronate from Biodegradable Microspheres", AAPS Pharm. Sci. Tech., vol. 2, p.p. 1-9, 2001. [۳۰]
- Kim H.K.; Chung H.J.; Park T.G.; "Biodegradable Polymeric Microspheres with Open/Closed Pores for Sustained Release of Human Growth Hormone", J. Control. Release, vol. 112, p.p. 167-174, 2006. [۳۱]
- Schwendeman S.P.; Cardamone M.; Klivanov A.; Langer R.; Brandon M.R.; *Stability of Proteins and their Delivery from Biodegradable Polymer Microspheres*, Marcel Dekker Inc., USA, 1996. [۳۲]
- Lu L.; Peter S.J.; Lyman M.D.; Lai H.L.; Leite S.M.; Tamada J.A.; Uyama S.; Vacanti J.P.; Langer R.; Mikos A.G.; "In Vitro and In Vivo Degradation of Porous Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) Foams", Biomaterials, vol. 21 p.p. 1837-1845, 2000. [۳۳]
- Faisant N.; Akiki J.; Siepmann F.; Benoit J.P.; Siepmann J.; "Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: Experiment and theory", Int. J. Pharm., vol. 314, p.p. 189-197, 2006. [۳۴]