Journal of Police Medicine

Summer 2015; Vol. 4, No. 2: 125-132

Original Article

Cloning, Expression, Purification and Toxicity Assessment of Diphtheria Toxin- Interleukin 2 Fusion Protein

Received: 19 January 2015 **Revised:** 23 February 2015 **Accepted:** 16 March 2015

Masoume Amraei[1]
Mehdi Zeinoddini[2*]
Masoud Solimani[3]
Ali Reza Saeedinia[4]

[1]M.Sc., Biochemistry, Department of Bioscience and Biotechnology, Mallek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

[2]Assistant Professor, Department of Bioscience and Biotechnology, Mallek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

[3]Associate Professor Department of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[4]Assistant professor, Department of Bioscience and Biotechnology, Mallek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

[*]**Corresponding Author:**
Mehdi Zeinoddini
Tel: (+98)2122974600
e-mail: zeinoddini52@mut.ac.ir

ABSTRACT

Background: Immunotoxin is a fusion protein containing two distinct sections covalently bonded by specific linkers. It includes an immunological section with a diagnostic role to connect the immunotoxin to the specific receptors and a toxic section with a cytotoxic role that leads to the cell death. The aim of this study is development of a lymphoma cancer protein therapy method using a recombinant immunotoxin produced by connecting diphtheria toxin to human interleukin 2 (IL2).

Materials and Methods: After the synthesis of the fusion protein gene sequence (IDZ: DT-IL2), subcloning was done in the pET expression system. The pET-IDZ plasmid was transformed to BL21 (DE3) bacteria and then was induced. The protein purification was accomplished by nickel affinity chromatography system and then the function of the produced recombinant fusion protein was evaluated on K-562 cancerous cell line by MTT biological assay.

Results: After production of pET-IDZ plasmid, the expression of the recombinant fusion protein in BL21 (DE3) bacteria was validated using electrophoresis and Western Blot methods. The purification yield determined above 95% using densitometry method. Afterwards, K-562 cells were treated by different concentrations of the produced fusion protein. The results showed the proper function of the produced fusion protein. Also, $IC_{50\,\%}$ amount (immunotoxin concentration to remove 50% of the cells) was determined as 6×10^{-6} M.

Conclusion: Immunotoxin or targeted toxin is a novel strategy for cancer patients. The first recombinant immunotoxin (named Ontak), in which diphtheria toxin had been connected to interleukin 2, was approved from United States Food and Drug Administration (FDA) in 1999. Considering the importance of this drug, recombinant fusion protein was attempted to be produced in this research. Experimental data confirmed effective protein function, but complementary studies will be required to be compared with Ontak.

Keywords: cloning, expression, purification immunotoxin, diphtheria, interleukin.

تابستان ۱۳۹۴- دوره ۴ - شماره ۲- صفحات ۱۳۲-۱۲۵

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

همسانه‌سازی، بیان، تخلیص و ارزیابی سمیّت پروتئین هیبریدی توکسین دیفتری- اینترلوکین ۲

تاریخ دریافت: ۲۸ دی ۱۳۹۳ **تاریخ اصلاح:** ۴ اسفند ۱۳۹۳ **تاریخ پذیرش:** ۲۵ اسفند ۱۳۹۳

معصوم امرایی[۱]
مهدی زین‌الدینی[*۲]
مسعود سلیمانی[۳]
علی‌رضا سعیدی نیا[۴]

[۱]کارشناس ارشد، بیوشیمی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
[۲]دکترای، بیوشیمی، استادیار، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
[۳]دانشیار، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۴]استادیار ژنتیک، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول:
مهدی زین‌الدینی
تلفن: ۲۱۲۲۹۷۴۶۰۰(۹۸+)
پست الکترونیک:
zeinoddini52@mut.ac.ir

چکیده

مقدمه: ایمونوتوکسین یک پروتئین هیبریدی و دارای دو بخش کاملاً مجزا است که توسط رابط‌های مشخص و به صورت کووالان به یکدیگر متصل هستند: یک بخش ایمنی که نقش تشخیصی و اتصال ایمونوتوکسین به گیرنده های خاص را بر عهده دارد و یک بخش توکسینی یا سمی که نقش سیتوتوکسیک و مرگ سلولی را انجام می دهد. هدف از مطالعه حاضر، تولید یک پروتئین هیبریدی با استفاده از اتصال مولکولی توکسین دیفتری (DT) به اینترلوکین ۲ انسانی (IL2)، به‌منظور استفاده از آن در بیماران مبتلا به لنفوما می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پس از سنتز اولیه توالی ژنی رمز کننده پروتئین هیبریدی مذکور (IDZ: DT-IL2)، همسانه‌سازی قطعه مربوطه در سیستم بیانی pET، صورت گرفت. پلاسمید pET-IDZ تولیدی، درون باکتری BL21(DE3) منتقل و سپس القاء گردید. در ادامه تخلیص پروتئین با استفاده از سیستم کروماتوگرافی تمایلی نیکل (Ni-NTA) انجام شد و در نهایت عملکرد پروتئین هیبریدی نوترکیب تولیدی بر روی رده سرطانی K-562 که دارای گیرنده سطحی برای اینترلوکین ۲ است، با استفاده از روش سنجش زیستی MTT مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: پس از تولید پلاسمید pET-IDZ، بیان پروتئین هیبریدی نوترکیب در باکتری BL21(DE3)، با استفاده از روش‌های الکتروفورز و وسترن بلات تأیید گردید. تخلیص پروتئین هیبریدی، خلوص بالای ۹۵ درصد را با استفاده از روش دانسیتومتری نشان داد. در ادامه سلول‌های K-562 با غلظت‌های مختلف پروتئین هیبریدی تولیدی تیمار شد. نتایج حاصله نشان داد که میزان $IC_{50\%}$ برابر ۶×۱۰^{-۱۰} مولار است.

نتیجه‌گیری: ایمونوتوکسین یا توکسین هدف‌گذاری شده به‌عنوان یکی از استراتژی‌های نوین درمانی بیماران سرطانی به‌حساب می‌آیند. اولین نمونه نوترکیب این پروتئین‌های هیبریدی (با نام اونتاک) در سال ۱۹۹۹ از سازمان غذا و داروی آمریکا تأییدیه دریافت کرد که در آن توکسین دیفتری به اینترلوکین ۲ متصل شده بود. با توجه به اهمیت داروی مذکور، تلاش گردید این دارو در داخل کشور تولید شود. نتایج حاصل از عملکرد اولیه نمونه تولیدی بیانگر صحت نمونه است ولی لازم است آزمایشات تکمیلی و مقایسه آن با نمونه خارجی صورت پذیرد.

کلید واژه‌ها: کلون، بیان، تخلیص، ایمونوتوکسین، دیفتری، اینترلوکین.

مقدمه

سرطان به‌عنوان یکی از معضلات جامعه پزشکی، همه‌ساله افراد زیادی را مبتلا کرده و موجب مرگ‌ومیر زیادی نیز شده است. یکی از روش‌های درمانی سرطان، استفاده از پروتئین‌های مؤثر جهت بلوکه کردن فعالیت‌های تکثیری سلول‌های سرطانی است. در این راستا هم توکسین‌های پروتئینی هدف‌گذاری شده هوشمند و هم پروتئین‌تراپی معمول، شامل استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال درمانی، برای این منظور استفاده می گردد [۵-۱]. یکی از استراتژی‌های درمانی سرطان، استفاده از پروتئین‌های توکسینی

Journal of Police Medicine
Summer 2015; Vol. 4, No. 2: 125-132

هدف‌گذاری شده علیه گیرنده‌های سطحی این سلول‌ها است که به نام ایمونوتوکسین[1] معروف‌اند. ایمونوتوکسین، پروتئین هیبریدی مشتمل بر دو جزء پروتئینی است. یک بخش به‌عنوان لیگاند عمل کرده و سلول‌های سرطانی را شناسایی می‌کند و بخش دوم نقش سیتوتوکسیک داشته و سبب مرگ سلول سرطانی می گردد. به‌این‌ترتیب نوعی داروی هوشمند به‌دست می‌آید که قادر است سلول‌های سرطانی را از سایر سلول‌های دیگر تمیز داده و سبب از بین رفتن آن‌ها می‌شود [۱۲-۶]. در این راستا و در جهت درمان بیماران با لنفومای پیشرفته و یا بیماران با امکان عود مجدد بیماری، از یک ایمونوتوکسین درمانی جدید با نام دنیلوکین دیفتیتوکس[2]، شناخته‌شده به‌عنوان اونتاک[3]، استفاده می‌شود. اونتاک محصول فناوری DNA نوترکیب است که در سال ۱۹۹۹ پس از اخذ تأییدیه سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) توسط شرکت Eisai در دسترس قرار گرفت. در ساختار این پروتئین هیبریدی، توکسین دیفتری[4] (DT) به‌عنوان الگو مورداستفاده قرار گرفت. در این توکسین سه دومین عملکردی[5]، انتقالی[6] و اتصالی[7] (DT: C-T-B) وجود دارد. با استفاده از فناوری مهندسی ژنتیک، دومین اتصالی (B) با اینترلوکین ۲ جایگزین می‌شود. بر این اساس توکسین مذکور علیه سلول‌های سرطانی که در سطح آن‌ها گیرنده های اینترلوکین ۲ تولید می‌شوند، هدف‌گذاری می‌شوند [۱۴ و ۱۳].

در مطالعه حاضر به‌منظور تولید و توسعه ایمونوتوکسین نوترکیب جهت درمان سرطان لنفوما، با الگوبرداری از نمونه تجاری شده اونتاک، ژن به رمز درآورنده پروتئین هیبریدی اینترلوکین ۲-توکسین دیفتری (با جایگزینی ژن به رمز درآورنده اینترلوکین ۲ به‌جای دومین اتصالی توکسین دیفتری: (C-T-IL2)، درون پلاسمید بیانی pET21a کلون و بیان گردید. در نهایت نیز پس از تخلیص پروتئین هیبریدی تولیدی، عملکرد آن با استفاده از سنجش زیستی خارج بدنی، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

با توجه به این‌که ایمونوتوکسین مورد نظر یک فیوژن پروتئین است، از دو بخش انتهای آمینو (مربوط به توکسین دیفتری) و بخش انتهای کربوکسیل (مربوط به اینترلوکین ۲) تشکیل‌شده است. بخش اول حاوی دو دومین C و T از توکسین دیفتری (Met1-Thr387) و بخش دوم حاوی اینترلوکین ۲ انسانی (Ala1-Thr133) است. به‌بیان‌دیگر در ساختار کامل توکسین دیفتری، اینترلوکین ۲ جایگزین دومین B از توکسین که زیرواحد اتصال به گیرنده آن می‌باشد، شده است. به‌منظور تعیین توالی قطعه‌های C (زیرواحد فعال آنزیمی) و T (زیرواحد جابه جایی از غشا) که در ایمونوتوکسین وجود دارد، توالی توکسین دیفتری از سایت NCBI گرفته شد. توکسین به همراه ۲۵ اسیدآمینه به‌عنوان سیگنال پپتید ترشح می‌شود که در حین یا بعد از ترشح از کورینه باکتریوم دیفتریا حذف می‌شوند؛ بنابراین ۷۵ نوکلئوتید ابتدایی حذف شدند. توالی توکسین با اسیدآمینه گلایسین به‌جای متیونین از قطعه C آغاز شده و تا اسیدآمینه ترئونین شماره ۳۸۷ از قطعه T ادامه دارد. با توجه به این‌که فیوژن پروتئین در سیستم پروکاریوتی بیان خواهد شد از توالی mRNA اینترلوکین ۲ (فاقد اینترون) استفاده شد. بعد از پیدا کردن توالی کدکننده با استفاده از سایت NCBI و جدا کردن سیگنال پپتید، توالی مورد نظر که از اسیدآمینه گلایسین شماره ۱ آغاز و تا اسیدآمینه ترئونین شماره ۱۳۳ ادامه می‌یابد، تعیین شد. پس از مشخص شدن ترادف هر دو جزء ایمونوتوکسین، با استفاده از اسیدآمینه هیستیدین دو جزء مربوطه به یکدیگر مرتبط گردیدند (وجود اسیدآمینه مربوطه بر اساس مطالعات قبلی، می‌باشد) [۱۶ و ۱۵]. همان‌گونه که اشاره شد در این طراحی، در بخش N-ترمینال توکسین دیفتری و در بخش C-ترمینال اینترلوکین ۲ طراحی گردید. همچنین در ابتدای ژن، جایگاه برش *NdeI* و توالی هیستیدین (His6) و در انتهای ژن کدون خاتمه و جایگاه برش *EcoRI* طراحی گردید. پس از بهینه کردن کدون‌ها بر مبنای سیستم بیانی باکتری E.coli، به شرکت Bioneer جهت سنتز ارسال شد.

پس از سنتز، ژن مورد نظر در پلاسمید کلونینگ pGEM-B1 دریافت شد و به نام pGEM-IDZ نام‌گذاری گردید. پلاسمید مربوطه به باکتری مستعد شده XL1-blue (با استفاده از کلرید کلسیم ۰/۱ مولار) به‌منظور تکثیر آن انتقال داده شد و از کلنی‌های غربال‌شده بر مبنای آمپی‌سیلین، استخراج پلاسمید صورت گرفت، سپس هضم آنزیمی توسط دو آنزیم *EcoRI* و *NdeI* صورت گرفت و دو انتهای چسبنده در ژن ایجاد شد؛ همچنین پلاسمید بیانی pET21a(+) توسط این دو آنزیم خطی شده و انتهای چسبنده در دو طرف آن ایجاد شد. پس از تخلیص از روی ژل آگارز، ژن مورد نظر با استفاده از آنزیم T_4 به داخل پلاسمید بیانی pET21a(+) انتقال یافت تا پلاسمید pET-IDZ به‌دست آید.

پلاسمید pET-IDZ، به باکتری *E.Coli* سویه BL21(DE3) مستعد شده (با استفاده از کلرید کلسیم ۰/۱ مولار)، انتقال‌یافته و به کمک آمپی‌سیلین غربالگری گردید تا کلنی‌های مثبت انتخاب گردد. باکتری نوترکیب به‌دست‌آمده برای القای بیان در OD ۰/۷ با ۱ mM از IPTG در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (جهت افزایش پروتئین‌های محلول) به مدت چهار ساعت، مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور خالص‌سازی فیوژن پروتئین، ابتدا فرآیند شکست سلولی به‌وسیله سونیکاسیون (۱۰ سیکل ۳۰ ثانیه) انجام گرفت. سپس با

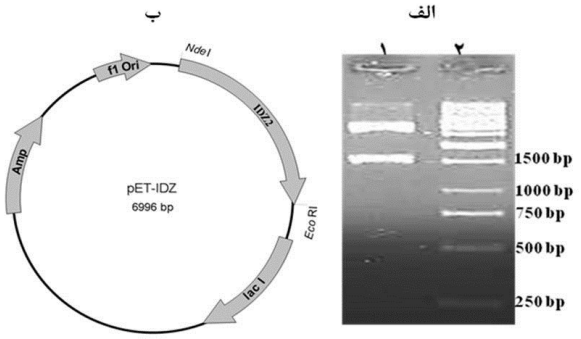
1: Immunotoxin, 2: DenileukinDiftitox, 3: Ontak, 4: Diphtheriae Toxin, 5: Catalytic domain (C), 6: Translocation domain (T)
7: receptor Binding domain (B)

تابستان ۱۳۹۴- دوره ۴- شماره ۲- صفحات ۱۳۲-۱۲۵

انجام سانتریفوژ (۱۲۰۰۰ rpm) به مدت ۳۰ دقیقه و دمای چهار درجه سانتی‌گراد)، پروتئین‌های محلول از بخش رسوب، اینکلوژن‌بادی‌های اضافه و بدنه باکتری جدا گردید. محلول پروتئینی حاوی ایمونوتوکسین از ستون نیکل- سفارز عبور داده شد. برای جدا کردن پروتئین از ستون، با استفاده از شیب غلظتی ایمیدازول ۲۰ تا ۵۰۰ میلی‌مولار، تفکیک پروتئینی در لوله‌های مجزا صورت گرفت. پس از تخلیص اولیه، به منظور فرمولاسیون ایمونوتوکسین مربوطه، با استفاده از سنتریکون، ایمیدازول‌های اضافی از پروتئین خارج شد و با بافر PBS، تعویض بافر گردید و همچنین تا سه برابر تغلیظ شد.

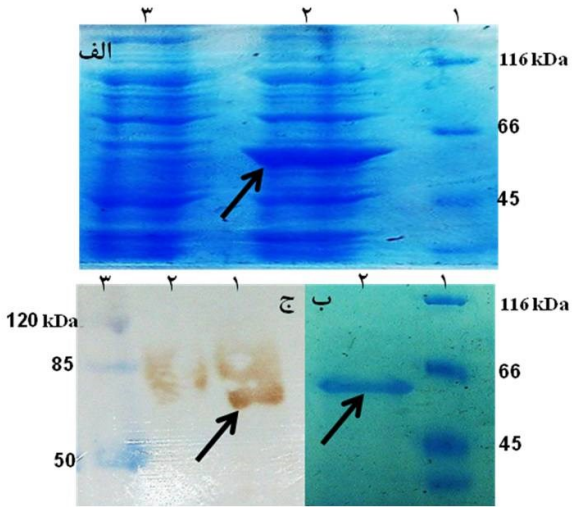
خلوص و اندازه ایمونوتوکسین تخلیص شده با استفاده از SDS-PAGE ۱۲ درصد رنگ‌شده با کوماسی‌بلو R-250 آنالیز شد. به کمک روش ژل دانسیتومتری، خلوص پروتئین بیش از ۹۵ درصد محاسبه گردید. آنالیز لکه‌گذاری وسترن[1] نیز مطابق با روش مرسوم روی SDS-PAGE ۱۲ درصد انجام شد. لازم به ذکر است با توجه به طراحی دنباله هیستیدین در انتهای آمینوپروتئین، از آنتی بادی مونوکلونال و تجاری علیه His6 (Roche: 04905318001) استفاده شد. همچنین تعیین غلظت پروتئین با استفاده از کیت برادفورد (BioRad: 500-02030) صورت گرفت و ایمونوتوکسین حاصله در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی شدند.

برای ارزیابی عملکرد پروتئین هیبریدی تولیدی، از رده سرطانی



شکل ۱: آنالیز مولکولی سازه ساخته‌شده pET-IDZ. الف- نتیجه الکتروفورز با ژل آگاروز، محصول هضم دو آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET-IDZ با استفاده از دو آنزیم محدودگر *NdeI* و *EcoRI*. (۱) محصول هضم دو آنزیمی پلاسمید، (۲) مارکر وزنی DNA، 1 kb. ب- نقشه پلاسمید نوترکیب pET-IDZ.

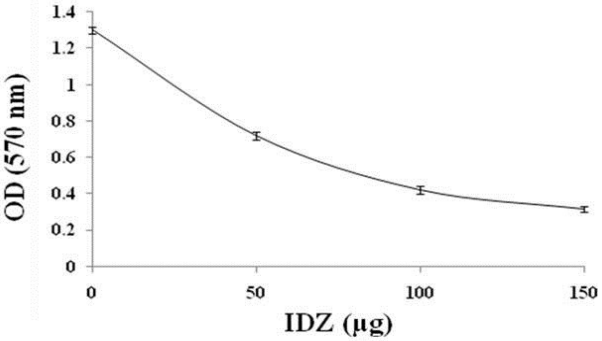
K-562 (ATCC: CCL-243) که بیان کننده گیرنده اینترلوکین ۲ در سطح سلولی است، استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS رشد داده شدند. برای آزمایش سمیّت ایمونوتوکسین، ابتدا سلول‌ها در غلظتی برابر با 10^4 cell/ml به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شدند. بعد از ۱۶ ساعت رشد، غلظت‌های متفاوت از ایمونوتوکسین (صفر تا ۱۵۰ میکروگرم) به‌صورت دوتایی به سلول‌ها اضافه‌شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پنج درصد CO_2 انکوبه شدند. در نهایت میزان زنده‌بودن سلول‌ها با استفاده از نمک تترازولیوم (MTT) به شکل زیر انجام شد. محلول MTT در غلظت ۵ mg/ml در PBS تهیه و مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه‌شده و به مدت چهار الی شش ساعت در انکوباتور $37\ ^{\circ}C$ انکوبه شد. سلول های زنده به‌واسطه داشتن آنزیم ردوکتاز میتوکندری فعال، با نمک تترازولیوم واکنش داده و سبب تشکیل کریستال‌های فورمازان می گردد. در ادامه کریستال‌های فورمازان تشکیل‌شده با ۱۰۰ میکرولیتر از ایزوپروپانل اسیدی، محلول شده و سپس جذب هر چاهک در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. درنتیجه با این روش، سلول های زنده از غیرزنده به‌واسطه آنزیم‌های متابولیسمی، از هم تفکیک‌شده و



شکل ۲: آنالیز بیان و تخلیص ایمونوتوکسین نوترکیب تولیدی با استفاده از SDS-PAGE و وسترن بلات. الف- بیان پروتئین نوترکیب قبل و بعد از القا، (۱) مارکر وزن مولکولی، (۲) باکتری نوترکیب پس از چهار ساعت القاء، (۳) باکتری نوترکیب قبل از القاء. ب- تخلیص پروتئین نوترکیب، (۱) مارکر وزن مولکولی، (۲) پروتئین خالص‌شده. ج- وسترن بلات پروتئین نوترکیب، (۱) پروتئین خالص و تغلیظ شده، (۲) پروتئین خالص‌شده قبل از تغلیظ، (۳) مارکر وزن مولکولی.

[1]: Western Blot

Journal of Police Medicine
Summer 2015; Vol. 4, No. 2: 125-132



شکل ۳: میانگین جذب خوانده شده توسط دستگاه در مقادیر صفر تا ۱۵۰ میکروگرم (آزمایشات با سه بار تکرار می‌باشد).

لذا اثر سمیّت پروتئین هیبریدی تولیدی مقایسه می‌گردد.

یافته‌ها

پس از سنتز اولیه ایمونوتوکسین نوترکیب (pGEM-IDZ)، به‌منظور تهیه و ساخت سازه پلاسمیدی pET-IDZ، هضم دو آنزیمی پلاسمیدهای pGEM-IDZ و pET-21a(+) با استفاده از دو آنزیم محدودگر *NdeI* و *EcoRI* انجام شد. در ادامه ساب‌کلونینگ به کمک آنزیم T4 لیگاز صورت گرفت. پس از ارزیابی مولکولی پلاسمیدهای نوترکیب به‌دست‌آمده، ساخت سازه پلاسمیدی pET-IDZ، تأیید گردید. آزاد شدن قطعه حدود ۱۵۰۰ بازی بیانگر صحت کلون‌های به‌دست‌آمده است (شکل ۱).

به‌منظور بررسی بیان ایمونوتوکسین مربوطه، پلاسمید pET-IDZ به باکتری مستعد شده BL21(DE3) منتقل شد و با IPTG القاء گردید. نتایج حاصله از الکتروفورز (SDS-PAGE)، بیانگر تولید مناسب ایمونوتوکسین نوترکیب در باکتری (به‌اندازه حدوداً ۵۸ کیلو دالتون) می‌باشد (شکل ۲-الف). همچنین پس از خالص سازی پروتئین با استفاده از ستون شارژ شده با نیکل و تعویض و تغلیظ پروتئین، خلوص بالای ۹۵ درصدی به کمک دو روش SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید گردید (شکل ۲-ب و ج).

به‌منظور ارزیابی فعالیت ایمونوتوکسین نوترکیب تولیدی، از سلول‌های سرطان خون که دارای گیرنده اینترلوکین ۲ است (K-562)، استفاده‌شده و میزان مرگ سلولی به کمک روش MTT assay مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. مطابق شکل ۳، افزایش غلظت ایمونوتوکسین نوترکیب مورداستفاده، سبب کاهش درصد سلول‌های زنده بر اساس کاهش OD 570 نانومتری وابسته به تشکیل کریستال‌های فورمازان، شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه مشخص شده است که درمان‌های رایج مثل فتوتراپی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی همیشه برای از بین بردن بدخیمی کافی نیستند، به‌علاوه این درمان‌ها خود مسبب عوارض جانبی متعددی هستند؛ بنابراین با به‌کارگیری شیوه‌های درمانی نوین از جمله ایمونوتوکسین‌ها که برای سلول‌های هدف بسیار اختصاصی‌تر عمل می‌کنند، این عوارض تا حد بسیار بالایی کاهش می‌یابد [۱۲-۱۰]. بخش ایمنی در ساختار ایمونوتوکسین اغلب یک آنتی‌بادی است؛ هرچند که امروزه از سایر ترکیبات ایمنی نظیر سیتوکین‌ها نیز استفاده می‌شود. آنتی‌بادی منوکلونال در نقش یک حامل و انتقال‌دهنده ظاهر می‌شود که با شناسایی گیرنده سطح سلول سبب اتصال هدفمند ایمونوتوکسین و کمک به انتقال توکسین حمل شده به درون سلول می‌شود. از طرف دیگر بخش توکسینی در ساختار ایمونوتوکسین ها، شامل توکسین های باکتریایی و گیاهی یا سایر ترکیبات کشنده سلولی است. به‌صورت کلاسیک از ۴۰ سال قبل تاکنون، ایمونوتوکسین ها در اثر کانژوگاسیون شیمیایی (به واسطه مواد شیمیایی متصل‌کننده) یک آنتی‌بادی به یک توکسین پروتئینی یا مشتقات آن، تولیدشده است. امروزه علاوه بر این نوع از ایمونوتوکسین‌ها، می‌توان با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیکی، دو بخش ایمنی و توکسینی را به یکدیگر متصل نموده و کارایی موردنظر را از آن به‌دست آورد [۲۰-۱۷].

با توجه به گسترش سرطان در کشورهای در حال توسعه ازجمله ایران، لزوم توجه و تحقیق بر روی روش‌های نوین درمانی بسیار ضروری است. در تحقیق حاضر تلاش گردید با تولید یک نمونه ایمونوتوکسین نوترکیب بر اساس ایده برداری از نمونه تجاری موجود (Denileukin Diftitox یا Ontak)، گامی در جهت درمان بیماران مبتلا به سرطان لنفوما برداشته شود. پس از طراحی و سنتز ایمونوتوکسین بر مبنای نمونه تجاری، تولید پروتئین نوترکیب مذکور بر اساس سیستم بیانی pET، صورت پذیرفت. لازم به ذکر است، با توجه به پتنت بودن ساختار داروی تجاری، ترادف ژنی این داروی نوترکیب در NCBI به‌طور واضح، نمایه نشده و بر مبنای اطلاعات ارائه‌شده در خصوص اونتاک، ترادف اولیه شناسایی و سنتز گردید. در خصوص سنجش زیستی نیز لازم به توضیح است که گیرنده اینترلوکین ۲ در سه فرم وجود دارد، تمایل کم (CD25)، تمایل متوسط (CD122/CD132)، تمایل بالا (CD25/CD122/CD132) همچنین سلول های بدخیم بیان‌کننده یک یا تعداد بیشتری از زیر واحدهای گیرنده اینترلوکین ۲ در بعضی لوسمی‌ها و لنفوم‌ها شامل CTCL دیده می‌شوند [۲۴-۲۱]. اگرچه ایمونوتوکسین اونتاک به هر سه فرم گیرنده اینترلوکین، می‌تواند اتصال یابد، ولی تنها سلول‌های بیان‌کننده گیرنده های تمایل بالا و متوسط می‌توانند پروتئین ترکیبی را وارد سلول نمایند. ایمونوتوکسین اونتاک بعد از اتصال به گیرنده اینترلوکین ۲ به‌وسیله

مجله طب انتظامی
تابستان ۱۳۹۴- دوره ۴- شماره ۲- صفحات ۱۳۲-۱۲۵

اندوسیتوز، وارد سلول می‌شود، سپس هضم اسیدی اتفاق می‌افتد که این واکنش، برای انتقال قطعه C (زیرواحد فعال آنزیمی) توکسین دیفتری از آندوزوم به سیتوپلاسم، حیاتی است. قطعه C پس از ورود به سیتوپلاسم با برداشتن یک ADP-ریبوز از نیکوتین‌آمیدآدنین‌دی‌نوکلئوتید (NAD) و انتقال آن به فاکتور طویل‌سازی ۲ [1] (EF2) باعث غیرفعال‌سازی آن و در نتیجه مهار سنتز پروتئین و مرگ سلولی می‌گردد [۲۴ و ۲۳].

در مطالعه حاضر، ارزیابی عملکردی ایمونوتوکسین نوترکیب تولیدی بر روی رده سرطانی K-562 که بیان‌کننده گیرنده اینترلوکین ۲ با تمایل متوسط است [۲۵]، انجام گرفت. آنالیز نتایج سنجش زیستی (شکل ۳)، نشان داد که میزان ۱۵۰ میکروگرم از ایمونوتوکسین نوترکیب تولیدی (۱۸×۱۰^{-۱۰} مولار) نسبت به سایر غلظت ها، سمیّت بیشتری دارد. همچنین IC_{50} (غلظت موردنیاز از توکسین برای از بین بردن ۵۰ درصد سلول‌ها) به میزان ۶×۱۰^{-۱۰} مولار محاسبه گردید. میزان IC_{50} به‌دست‌آمده در این آزمایش با تحقیقات مشابه قبلی روی رده سلولی YT2C2 که بیان‌کننده گیرنده اینترلوکین ۲ با تمایل متوسط است و همین طور رده سلولی HUT102 که بیان‌کننده گیرنده اینترلوکین ۲ با تمایل بالا [۲۶] است، قابل‌مقایسه است. نتایج بیانگر افزایش پنج برابری در قدرت مرگ سلولی ایمونوتوکسین تولیدی، نسبت به رده سلولی YT2C2 و کاهش شش برابری نسبت به رده سلولی HUT102 بود. لازم است در مطالعات بعدی علاوه بر آزمایش ایمونوتوکسین تولیدی بر روی رده‌های سلولی مذکور، با نمونه تجاری نیز مقایسه صورت گیرد. به‌هرحال با توجه به عدم دسترسی به این دارو در داخل کشور و هزینه‌های هنگفت واردات دارو، تولید و تجاری کردن آن در داخل کشور، هزینه درمان بیماران را تا حد زیادی کاهش می‌دهد؛ همچنین با تغییر گیرنده پروتئین تولیدی می‌توان به ایمونوتوکسین‌های جدیدی دست پیدا کرد که علیه سرطان های دیگر هم کاربرد داشته باشد.

تشکر و قدردانی

پروژه فوق در پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر انجام‌گرفته است و بودجه آزمایش‌های فوق از سوی این دانشگاه تأمین‌شده است؛ بنابراین جا دارد تا از زحمات مسئولین این دانشگاه، سپاسگزاری گردد.

منابع

1. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 317-27.
2. Li YM, Hall WA. Targeted toxins in brain tumor therapy. Toxins (Basel) 2010; 2: 2645-62.
3. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. Nat Rev Drug Discov 2010; 9: 767-74.
4. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. Nat Biotechnol 2005; 23: 1147-57.
5. Mellstedt H. Monoclonal antibodies in human cancer. Drugs today (Barc) 2003; 39: 1-16.
6. Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. AAPS J 2006; 8: E532-E51.
7. Frankel AE, Kreitman RJ, Sausville EA. Targeted toxins. Clin Cancer Res 2000; 6: 326–34.
8. Vallera DA. Immunotoxins: will their clinical promise be fulfilled? Blood 1994; 83: 309-17.
9. Bonomi PD. Immunotoxins: the next generation. Advances in targeting cancer therapies 2006; 4: 1-4.
10. Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin treatment of cancer. Annu Rev Med 2007; 58: 221-37.
11. Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin therapy of cancer. Nat Rev Cancer 2006; 6: 559-65.
12. Kreitman RJ. Immunotoxins in cancer therapy. Curr Opin Immunol 1999; 11: 570-8.
13. Kaminetzky D, Hymes KB. Denileukin diftitox for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. Biologics 2008; 2: 717–24.
14. Knobler E. Current management strategies for cutaneous T-cell lymphoma. Clin Dermatol 2004; 22: 197–208.
15. Potala S, Verma RS. Modified DT–IL2 fusion toxin targeting uniquely IL2Rα expressing leukemia cell lines: Construction and characterization. J biotechnol 2010; 148: 147-55.
16. Leppla SH, Avallone J, Bugge T, Liu S-H, Osorio M. Activation of recombinant Diphtheria Toxin fusion proteins by specific proteases highly expressed on the surface of tumor cells. Google Patents 2004.
17. Kreitman RJ. Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies. BioDrugs 2009; 23: 1-13.
18. Gadadhar S, Karande AA. Abrin immunotoxin: targeted cytotoxicity and intracellular trafficking pathway. PLoS One 2013; 8: e58304.
19. Kreitman RJ. Immunoconjugates and new molecular targets in hairy cell leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2012; 2012: 660-6.
20. Onda M. Recombinant immunotoxins with low en-

[1] Elongation Factor 2

Journal of Police Medicine

Summer 2015; Vol. 4, No. 2: 125-132

dotoxins for clinical and animal studies. Methods Mol Biol 2012; 907: 627-43.

21.Talpur R, Jones DM, Alencar AJ, Apisarnthanarax N, Herne KL, Yang Y, et al. CD25 expression is correlated with histological grade and response to denileukin diftitox in cutaneous T-cell lymphoma. J Invest Dermatol 2006; 126: 575-83.

22.Prince HM, Martin AG, Olsen EA, Fivenson DP, Duvic M. Denileukin diftitox for the treatment of CD25 low expression mycosis fungoides and Sezary syndrome. Leuk Lymphoma 2013; 54: 69–75.

23.Re GG, Waters C, Poisson L, Willingham MC, Sugamura K, Frankel AE. Interleukin 2 (IL-2) receptor expression and sensitivity to diphteria fusion toxin DAB389IL-2 in cultured hematopoietic cells. Cancer Res 1996; 56: 2590-5.

24.Nakase K, Kita K, Nasu K, Ueda T, Tanaka I, Shirakawa S, et al. Differential expression of interleukin-2 receptors (alpha and beta chain) in mature lymphoid neoplasms. Am J Hematol 1994; 46: 179-83.

25.Dilloo D, Hanenberg H, Lion T, Burdach S. IL-2 inhibits proliferation of K562 cells and reduces accumulation of bcr/abl mRNA and oncoprotein. Leukemia 1995; 9: 419-24.

26.Burton J, Goldman CK, Rao P, Moos M, Waldmann TA. Association of intercellular adhesion molecule 1 with the multichain high-affinity inter-

مجله طب انتظامی
تابستان ۱۳۹۴- دوره ۴- شماره ۲- صفحات ۱۳۲-۱۲۵