





دانشگاه علوم پزشکی و
خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت اخذ دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

سنتز و مشخصه یابی کنژوگه مونوکلونال آنتی بادی ریتوکسیمب و آنزیم تریپسین

اساتید راهنما:

دکتر محمد جوهری

دکتر حسینعلی ابراهیمی

نگارنده:

سید حسین اسبقیان

تیرماه ۱۳۹۹

شماره پایان نامه: ۹۹/۰۴-۴۰۵

با تقدیر و تشکر شایسته از:

پدر و مادرم

که شیرینی و خاطره انگیزی این لحظه را مدیون
وجود آنها هستم
و بی شک بدون آنها، پیمودن این راه ممکن
نبود.

از اساتید راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر
محمد جوهری و دکتر حسینی ابراهیمی که
وجودشان همیشه قوتی برای انجام کارهایم
بوده است و بی شک انجام این پایان نامه بدون
کمک و راهنمایی های ارزنده ایشان امکان پذیر
نبوده است، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

با تشکر از استاد گرانقدر، جناب آقای دکتر پیری،
که در طول دوره تحصیل همواره با سعه صدر و

دلسوزی راهگشای من بودند و همیشه از
راهنمایی های ارزشمند و خردمندانه ایشان بهره
بردیم.

چکیده

مقدمه

سرطان هر ساله جان افراد بسیاری را می‌گیرد و هزینه‌های بالایی را به دولت‌ها و مردم تحمیل می‌کند. سرطان خون از جمله سرطان‌های شایع در جوامع بشری است. با وجود اینکه پیشرفت زیادی که در درمان سرطان‌های خون اتفاق افتاده است ولی باز هم این سرطان‌ها با توجه به تنوع آن مشکل‌ساز است و هنوز موارد مقاوم به درمان گزارش می‌شود. در سال‌های اخیر داروهای شیمی‌درمانی جایگاه خاصی در درمان سرطان خون پیدا کرده است ولی این داروها غالباً عوارض بالا و انتخاب‌پذیری پایین دارند. برای رسیدن به داروهای جدید تحقیقات گسترده‌ای در جهان در حال انجام است و شاید در آینده نزدیک شاهد یافتن داروهای قدرتمند با عوارض کم باشیم. برای رسیدن به اثربخشی بالاتر و عوارض پایین‌تر داروی شیمی‌درمانی آنزیم تریپسین را با مونوکلونال آنتی‌بادی ریتوکسیمب کنژوگه کردیم.

مواد و روش‌ها

در مرحله اول، مونوکلونال آنتی‌بادی ریتوکسیمب توسط لینکر دی سولفیدی ۳،۳'-دی تیودی پروپیونیک اسید دی(ان-هیدروکسی-سوسینیمید استر) (DSP) فعال شد تا انتهای آمینی اسید آمینه‌های لیزین با لینکر متصل شود. سپس آنزیم تریپسین با نسبت مولی برابر با آنتی‌بادی به آن اضافه گردید این مخلوط به مدت ۲۴ ساعت برای انجام واکنش در دمای یخچال نگهداری شد. برای اثبات اتصال صحیح پراکندگی نوری دینامیکی^۱، میکروسکوپ الکترونی-عبوری^۲ و کشت سلولی استفاده گردید.

نتایج

با بررسی پراکندگی نوری دینامیکی افزایش اندازه و تغییر بار سطحی پس از کنژوگاسیون مونوکلونال آنتی‌بادی با آنزیم تریپسین اثبات گردید.

نتیجه‌گیری

مطالعات ما نشان داد امکان اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال ریتوکسیمب با آنزیم تریپسین با استفاده از لینکر دی سولفیدی وجود دارد. در مطالعات بعدی میزان مرگ و میر ناشی از کنژوگه حاصل از نظر کمی در مطالعات سلولی و حیوانی بررسی خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: داروی کنژوگه، مونوکلونال آنتی‌بادی، تریپسین ، DSP ، ریتوکسیمب

¹ 3,3'-Dithiodipropionic acid di(N-hydroxysuccinimide ester)

² Dynamic light scattering

³ Transmission electron microscopy

فهرست مطالب

فصل اول:	۱
مقدمه	۱
۱. بیان مسئله	۲
۱-۱ بیماری سرطان و روش های درمانی:	۲
۲-۱ نقش مونوکلونال آنتی بادی ها در درمان سرطان:	۳
۳-۱ کونژوگه آنتی بادی-دارو(ADC)	۳
۱-۳-۱ مکانیسم عملکرد کونژوگه دارو-آنتی بادی:	۵
۲-۳-۱ اجزای کونژوگه ها:	۶
۱-۳-۲-۱ هدف و آنتی بادی	۶
۲-۳-۲-۱ آنتی بادی ریتوکسیمب	۸
۳-۲-۳-۱ الینکر	۹
۴-۲-۳-۱ الینکر DSP:	۱۰
۵-۳-۲-۱ داروی لود شده	۱۱
۶-۳-۲-۱ تریپسین	۱۱
۱-۴-۱ کونژوگاسیون	۱۲
۱-۴-۱-۱ کونژوگاسیون توسط زنجیره های جانبی سیستمین	۱۲
۲-۴-۱-۱ مزایای کونژوگه های دارو-آنتی بادی	۱۲
۳-۴-۱-۱ معایب کونژوگه های دارو-آنتی بادی:	۱۳
۱-۵-۱ مراحل تقسیم سلول:	۱۴
۲-۵-۱ مرگ سلولی	۱۴
۳-۵-۱ مرگ برنامه ریزی شده سلولی	۱۴
۴-۵-۱ انکروز	۱۵

۱۵	۵-۵-۱ تفاوت آپتوز و نکروز
۱۶	۶-۱ بررسی متون:
۱۷	۷-۱ اهداف و فرضیات
۱۷	۷-۱-۱ هدف کلی:
۱۷	۷-۲-۱ اهداف اختصاصی:
۱۷	۷-۳-۱ اهداف کاربردی:
۱۷	۷-۴-۱ فرضیات یا سؤالات تحقیق:
۱۸	فصل دوم: روش کار
۱۹	۲-۱ مواد و روش‌ها
۱۹	۲-۱-۱ معرف‌ها و مواد شیمیایی :
۱۹	۲-۱-۲ دستگاه‌ها:
۲۰	۲-۲ ملاحظات اخلاقی
۲۰	۲-۳ روش انجام کار:
۲۰	۲-۳-۱ تهیه محلول تریپسین
۲۰	۲-۳-۲ تهیه محلول DSP:
۲۰	۲-۳-۳ تهیه کنزوگه ریتوکسیمب-تریپسین
۲۰	۲-۳-۴ خالص سازی محلول نهایی:
۲۱	۲-۴ بررسی پراکندگی نوری دینامیکی (DLS)
۲۲	۲-۵ تست های سلولی کنزوگه ریتوکسیمب_تریپسین
۲۲	۲-۵-۱ کشت سلول
۲۲	۲-۵-۱-۱ تهیه محیط کشت و بافرهای مورد نیاز کشت سلولی
۲۳	۲-۵-۱-۲ دفریز کردن و نگهداری سلولها
۲۴	۲-۵-۱-۳ پاساژ سلولی

۲-۵-۲	بررسی آپتوز سلولی با رنگ آمیزی توسط آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید	۲۴
۲-۵-۲:TEM		۲۵
	فصل سوم	۲۶
	نتایج	۲۶
	سنتز کنژوگه ریتوکسیمب-تریپسین و مشخصه یابی آن	۲۶
	بررسی پراکندگی نوری دینامیکی (DLS)	۲۶
	تست های سلولی کنژوگه تراستوزومب_آسپاراژیناز	۲۹
	بررسی آپتوز سلولی با استفاده از رنگ آمیزی EB/AO	۲۹
	نتایج TEM	۳۱
	فصل چهارم :	۳۲
	بحث و نتیجه گیری	۳۲
	بحث	۳۳
	نتیجه گیری	۳۶
	پیشنهادات:	۳۶
	منابع:	۳۷

فهرست اشکال

- شکل ۱ (a) تعداد مقالات منتشره در PubMed (b. تعداد مطالعات بالینی بر اساس سایت Clinicaltrials.gov ۴
- شکل ۲ کونژوگه دارو- آنتی بادی ۵
- شکل ۳ پروسه ی ورود کونژوگه به داخل سلول ۶
- شکل ۴ آنتی بادی ریتوکسی مب ۹
- شکل ۵ انواع لینکر ها ۱۰
- شکل ۶ لینکر DSP ۱۱
- شکل ۷ مقایسه ی پنجره ی درمانی کونژوگه ها و دارو های شیمی درمانی ۱۳
- شکل ۸ توزیع اندازه آنزیم تریپسین در بافر فسفات با اسیدیتته ۷/۴ ۲۷
- شکل ۹ توزیع اندازه آنتی بادی ریتوکسی مب در بافر فسفات با اسیدیتته ۷/۴ ۲۸
- شکل ۱۰ توزیع اندازه آنتی بادی ریتوکسی مب در بافر فسفات با اسیدیتته ۷/۴ ۲۸
- شکل ۱۱ بررسی اپوپتوز و نکروز سلول های MCF7 در تیمار با کونژوگه تریپسین-ریتوکسی مب ۲۹
- شکل ۱۲ بررسی اپوپتوز و نکروز سلول های MCF7 در تیمار با آنزیم تریپسین ۳۰
- شکل 13 تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری محلول کونژوگه ۳۱

فهرست جداول

- جدول ۱ مشخصات مواد شیمیایی به کار رفته ۱۹
- جدول ۲ لیست دستگاه ها و وسایل آزمایشگاهی به کار رفته در مطالعه ۱۹
- جدول ۳: فرمول تهیه محیط کشت سلولی ۲۲
- جدول ۴: فرمول تهیه PBS ۲۳
- جدول ۵: فرمول تهیه تریپسین ۲۳

فهرست اختصارات:

	Abbreviation	Text
1	mAb	Monoclonal antybody
2	ADC	Antibody-drug conjugate
3	ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
4	CDC	Compelement-dependent cytotoxicity
5	DMSO	Dimethyl sulfoxide
6	EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
7	WHO	World Health Organization
8	FDA	Food and Drug Administration
9	ug	Microgram
10	ul	Microliter
11	mg	Miligram
12	ml	Mililiter
13	uM	Micromolar
14	nm	Nanometer
15	IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
16	IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration
17	PBS	Phosphate buffered saline
18	SEM	standard error of the mean
19	°C	Centigrade
20	AO	Acridine orange
21	EB	Ethidium bromide
22	Rcf	Relative centrifugal force
23	Rpm	Round per minutes
24	UV	Ultra violat
25	W/V	Weight/volume
26	V/V	Volume/volume