





دانشگاه علوم پزشکی تهران
مرکز تحقیقات نانوفناوری دانشکده داروسازی

عنوان:

**طراحی و بکارگیری نانوسامانه دارورسانی هدفمند علیه رده سلول‌های
سرطانی پروستات، بر پایه پادتن ضد PLAC1**

پایان نامه برای دریافت درجه دکتری تخصصی پژوهشی PhD

نگارنده:

محمد رضا نژاد مقدم

اساتید راهنما:

دکتر رسول دیناروند

دکتر امیر حسن زرنانی

دکتر رامین قهرمانزاده

اساتید مشاور:

دکتر رویا قدس

دکتر محمد حسین قهرمانی

دکتر مرتضی محمودی

۱۳۹۶

شماره پایان نامه:

اظهار نامه دانشجو

موضوع پایان نامه:

اینجانب محمدرضا نژادمقدم دانشجوی دوره دکترای تخصصی PhD مرکز تحقیقات نانوفناوری دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران گواهی می‌نمایم که تحقیقات ارائه شده در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده و صحت و اصالت مطالب نگارش شده مورد تأیید می‌باشد و در موارد استفاده از کار دیگر محققان به مرجع مورد استفاده اشاره شده است. بعلاوه گواهی می‌نمایم که مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون برای دریافت مدرک توسط اینجانب یا فرد دیگری ارائه نشده است و هیچ‌بخش آن از کار سایر دانشجویان و محققین کپی نشده است. در تدوین متن پایان‌نامه دستورالعمل مصوب دانشگاه را به‌طور کامل رعایت کرده‌ام.

امضاء دانشجو:

تاریخ:

حق چاپ، نشر و مالکیت معنوی پایان نامه

- ۱- هرگونه کپی برداری به صورت کل پایان نامه یا بخشی از آن تنها با موافقت استاد راهنما مجاز می باشد.
- ۲- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه علوم پزشکی تهران می باشد و بدون اجازه کتبی دانشگاه به شخص ثالث قابل واگذاری نیست.
- ۳- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

این ناچیز تقدیم به:

- تمام آزاد مردان و زنانی که نیک می‌اندیشند و ترکیب عقل، منطق و معنویت را پیشه خود نموده و رضایت و سعادت خود را وابسته به پیشرفت و سعادت جامعه می‌دانند.
- دانشمندان، بزرگان، و جوانمردان شهیدی که بهترین تصمیم به اقتضای روزگار را برای سعادت و نجات هم‌نوعان خود برگزیدند و شجاعت و شهامت آنها چراغ امید و تعالی بشریت است.
- پدر مرحوم و مادر عزیزم که همواره چشم‌های پر از برق و شوق ایشان در موفقیت‌های کوچک تحصیلی‌ام، انگیزه تلاش مضاعفم به تحصیل و کسب علم بود.
- همسر عزیزم که با مهربانی و صبوری‌اش، مشقت‌های مسیر پژوهش و تحقیق را برایم به امید و روشنی راه تبدیل کرد و امیدوارم بتوانم جوابگوی محبت‌اش باشم.
- استاد فرهیخته و فرزانه‌ام جناب آقای دکتر امیرحسن زرنانی که راهنمایی‌ها و دغدغه‌های فراوانش در طراحی، برنامه‌ریزی و اجرای این پژوهش با کیفیت، بسی شایسته و قابل تقدیر است. امیدوارم قادر به درک زیبایی‌های وجودش باشم و بتوانم در آینده‌ی نزدیک جوابگوی زحمات و حسن اعتمادش باشم.
- استاد ارجمندم جناب آقای دکتر رسول دیناروند که از طریق فراهم کردن هزینه‌های اجرای پروژه، راهنمایی‌ها و محبت‌های همیشگی خود اینجانب را همراهی کرده و امکان انجام این پژوهش را فراهم نمودند، کمال سپاس و امتنان خود را از ایشان اظهار می‌دارم.

سپاسگزاری

سپاس مخصوص خداوند مهربان و حکیم که به انسان توانایی و دانایی بخشید تا سعادت را در گروه شفقت، مهرورزی و یاری در حل مشکلات هم‌نوعان بیابد، که خداوند سمیع و بصیر است.

تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم از:

جناب آقای دکتر رامین قهرمان‌زاده

سرکار خانم دکتر رویا قدس

جناب آقای دکتر مرتضی محمودی
جناب آقای دکتر محمد حسین قهرمانی
جناب آقای دکتر علی انیسیان
سرکار خانم دکتر مریم ابوالحسنی
سرکار خانم دکتر محبوبه نظری
سرکار خانم دکتر مریم یوسفی
جناب آقای دکتر آرش مینایی-تهرانی
جناب آقای دکتر محمود بزرگمهر
جناب آقای دکتر بهرنگ شیری ورنامخواستی
جناب آقای جعفر محمودیان
سرکار خانم دکتر زهره محمدی
جناب آقای احمدرضا محمودی
جناب آقای علی احمد بیات
جناب آقای ابراهیم میرزادگان
سرکار خانم سمانه منتظری
سرکار خانم خدیجه خسروی
سرکار خانم فرشته محمدی
سرکار خانم سمیه نجفزاده
سرکار خانم جمیله قاسمی
جناب آقای مرتضی فاراب
سرکار خانم صدیقه وفایی
سرکار خانم فاطمه یزدی
سرکار خانم مریم درزی
سرکار خانم لیلا کاتوزیان
سرکار خانم لیلا بالای گلی
سرکار خانم مریم فرضی
جناب آقای محمد رضا پاکزی

تامین بودجه مالی این پروژه از طریق طرح‌های پژوهشی مصوب زیر صورت گرفت.
دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد طرح: ۹۲-۰۳-۱۵۹-۲۵۴۶۷
شبکه نانو وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی با شماره تأمین اعتبار: ۷۰۰/۱۶۵۴
پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا با کد طرح: ۹۲-۰۳۵

طراحی و بکارگیری نانوسامانه دارورسانی هدفمند علیه رده سلول‌های سرطانی پروستات، برپایه پادتن ضد PLAC1

چکیده فارسی:

سرطان پروستات دومین عامل مرگ مردان بواسطه بیماری سرطان است و روش‌های تشخیص و درمان برپایه زیست‌نشانگر PSA نیز موفقیت قابل ملاحظه‌ایی در کنترل آن نداشته است. لذا در سال‌های اخیر زیست‌نشانگرهای جدیدی شامل Integrin v3، STEAP1 و TENB2 معرفی شده‌اند. اما هنوز سطح بیان و ارزش پیش‌آگهی این زیست‌نشانگرها در تومورهای پروستات کاملاً روشن نیست. یافته‌های اخیر در مورد بیان متمایز یک پادگن اختصاصی جفت، PLAC1، در سرطان پروستات و ارتباط مستقیم آن با میزان بدخیمی، بر ظرفیت PLAC1 بعنوان هدف ایمنی‌درمانی سرطان پروستات دلالت دارد. در بررسی تولید پادتن‌های تک‌دومانی ضد PLAC1 و ارزیابی اثر آنها بر شاخص‌های سلول‌های توموری شامل تکثیر، مهاجم و مقاومت به آپتوز دیده شده است که با وجود واکنش‌پذیری اختصاصی پادتن‌ها، هیچکدام در مهار شاخص‌های فوق موفق نبوده‌اند. لذا استفاده از اختصاصی بودن مطلوب آن پادتن‌ها برای انتقال و رهایش هدفمند یک عامل سمی شیمیایی بسیار قوی به سلول‌های توموری سرطان پروستات، فرضیه اصلی طراحی و اجرای پروژه حاضر شد. مبنای این فرضیه، یک مدل خلاق از فناوری نانو مبتنی بر نسل جدیدی از کونژوگه‌های پادتن-دارو (ADCs) است که از پادتن با ابعاد نانومتری ذاتی‌اش، همزمان بعنوان عامل هدف‌گیری و حامل عامل سمی به درون سلول‌های سرطانی استفاده می‌نماید. این فناوری با معرفی دو نمونه مورد تأیید FDA به نام Adcetris[®] و Kadcyła[®] و همچنین بیش از ۷۰ مطالعه جاری در مراحل آزمون بالینی، افق امیدوارکننده‌ای را در درمان هدفمند سرطان گشوده است. در این پروژه، ویژگی واکنش‌پذیری و اختصاصی بودن یکسری پادتن‌های تک‌دومانی ضد PLAC1 ارزیابی شد. الگوی بیان زیست‌نشانگر PLAC1 در سه رده سلول‌های سرطانی پروستات شامل LNCaP، DU145، PC3 و یک رده سلول سرطانی کولون (LS180) بعنوان کنترل منفی، با روش‌های PCR، وسترن بلات و فلوسایتومتری بررسی شد. سپس با اضافه کردن گروه فعال آمینی به مشتق داروی کمپتوسینی، SN38، و تأیید آن به روش FT-IR، H-NMR، Mass و C-NMR، امکان اتصال آن به بخش هیدروکربنی پادتن فراهم شد. نسبت مولکول‌های SN38 متصل به پادتن بوسیله HPLC تعیین شد و سپس با استفاده از روش ایمونوفلورسانس (IF) و فلوسایتومتری، ویژگی اتصال، تمایل، و سرعت درون‌بری وابسته به پذیرنده پادتن (anti-PLAC1 antibody) با نوع متصل آن به داروی SN38 (anti-PLAC1-ADC) مقایسه شد. اثر سمیت سلولی anti-PLAC1-ADC به روش ریخت‌شناسی، فلوریمتری با cAM، آزمون‌های کامت و آپتوزیس در رده سلول‌های سرطانی پروستات و

همچنین سلول‌های جدا شده از بافت سرطانی پروستات (ex vivo study) ارزیابی شد. و میزان ایمنی آن نیز طی مطالعه درون‌تنی با مدل موش آزمایشگاهی (Balb/c) بررسی شد. نتایج بررسی بیان PLAC1، حضور قابل‌ملاحظه این پادگن در رده سلول‌های سرطانی پروستات را تأیید می‌نماید. در بین پادتن‌های تک‌دودمانی ضد PLAC1 تولید شده، پادتن 2H12C12، واکنش‌پذیری و اختصاصی بودن مطلوب‌تری در شناسایی پادگن PLAC1 نشان داد و لذا فقط از آن در ادامه مطالعه استفاده شد. پادتن 2H12C12 با ثابت اتصال نانومولار به پادگن PLAC1 متصل شده و با سرعت بالایی، حدود ۱۵ دقیقه، ۵۰ درصد آن به درون سلول‌های PLAC1⁺ هدایت می‌شود. نسبت اتصال مولکول SN38 به هر پادتن حدود ۵/۵ بدست آمد. این مقدار اتصال دارو به پادتن تغییر قابل‌ملاحظه‌ای در قدرت اتصال، تمایل و سرعت درون‌بری آن ایجاد نکرد. اثر سمیت سلولی انتخابی بر سلول‌های PLAC1⁺ ایجاد کرد و IC50 آن ۶۲ نانومولار بود که حدود ۱۵ برابر کمتر از SN38 است. نتایج مجاورت anti-PLAC1-ADC و isotype-matched-ADC به ترتیب با سلول‌های PLAC1⁻ و PLAC1⁺ اثر سمیت سلولی قابل‌ملاحظه‌ای را نشان نداد. میزان القاء آپتوز anti-PLAC1-ADC متناسب با میزان بیان PLAC1 رده سلول‌های سرطانی و همچنین جدا شده از بافت سرطانی پروستات است و مطالعه درون‌تنی آن نیز اثر سمیت ناخواسته معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. نتایج یادشده برای اولین بار ظرفیت ADC‌های مبتنی بر پادتن ضد PLAC1 را به عنوان یک روش جدید ایمنی‌درمانی بیماران مبتلا به سرطان پروستات گزارش می‌نماید.

لغات کلیدی: کونژوگه‌های پادتن-دارو (ADC)؛ پادگن PLAC1، پادتن ضد PLAC1؛ سرطان پروستات؛ SN38؛ درون‌بری؛ سمیت سلولی.