



زیست فناوری دارویی

Drug Biotechnology



مolf: زهرا پاینده

دکترای تخصصی رشته بیوتکنولوژی پزشکی از دانشگاه علوم پزشکی زنجان

## فهرست مطالب

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| ۱- زیست فناوری دارویی:.....                                            | ۳  |
| ۱-۱ تعریف و اهداف بیوتکنولوژی دارویی: .....                            | ۳  |
| ۲- زیست فناوری در تشخیص بیماری‌ها:.....                                | ۸  |
| ۳- نقش زیست فناوری در کنترل بیماری‌ها از جمله سرطان:.....              | ۱۹ |
| ۴- دستاوردهای زیست فناوری دارو در درمان بیماری‌ها: .....               | ۲۱ |
| ۴-۱ پروتئین نو ترکیب: .....                                            | ۲۳ |
| ۴-۲ واکسن: .....                                                       | ۲۴ |
| ۴-۲-۱ واکسن و دارورسانی: .....                                         | ۲۵ |
| ۴-۲-۲ واکسن‌های درمانی: .....                                          | ۲۹ |
| ۴-۳ آنتی‌بادی‌های مونوکلونال: .....                                    | ۳۸ |
| ۴-۳-۱ استفاده‌های رایج تشخیصی و درمانی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال: ..... | ۴۵ |
| ۴-۳-۲ کاربردهای درمانی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال: .....                 | ۴۶ |
| ۵- زیست فناوری در ژن درمانی: .....                                     | ۵۶ |
| ۶- بهینه‌سازی و مهندسی وکتورهای بیانی: .....                           | ۵۹ |
| واژه نامه .....                                                        | ۶۱ |

## ۱- زیست فناوری دارویی:

### ۱-۱ تعریف و اهداف بیوتکنولوژی دارویی:

زیست فناوری از اواخر قرن بیستم به عنوان مهمترین فناوری در میان فناوری های نوین مورد توجه قرار گرفته است که برای آن تاکنون تعاریف مختلفی ارائه شده است. زیست فناوری استفاده از سیستم ها و موجودات زنده برای توسعه یا ساخت محصولات، یا هر کاربرد تکنولوژیکی است که از سیستم های زیستی، موجودات زنده یا مشتقات آنها برای ساخت یا اصلاح محصولات خاص استفاده می کند. اگرچه پیشرفت سریع و چشمگیر شاخه های مختلف زیست فناوری در چند دهه اخیر در تمام ابعاد زندگی بشر نفوذ کرده است، اما با این وجود حضور این دانش گسترده در علومى مانند پزشکی و داروسازی پررنگ تر بوده است. وابستگی متقابل سلامت انسان و محصولات درمانی جدید، ظهور دستکاری های زیست شناسی مولکولی، و فناوری های جدید در مدیریت اطلاعات در سطوح مختلف (ژن، رونوشت و پروتئین)، زمینه تحقیقاتی و صنعتی جدیدی را برای علوم دارویی ایجاد کرده است. بنابراین، فناوری های جدید و الزامات دارویی موجود دست به دست هم داده اند تا به نسل های جدیدی از زیست داروها منجر شوند که دارای فعالیت های بهبودیافته و شیوه های عمل انتخابی برای مبارزه با بیماری هایی مانند سرطان و سایر بیماری های ناتوان کننده هستند. علاوه بر این طراحی و تولید انواع واکسن ها، فراورده های بیولوژیکی مانند دارو ها و پروتئین های نو ترکیب، ساخت مواد اولیه دارویی و سیستم های نوین دارورسانی از دیگر کاربردهای زیست فناوری دارویی می باشد.

پیش از توسعه زیست فناوری به عنوان یک رشته ی مستقل، وظیفه تولید یک عامل درمانی نو ترکیب، تجزیه و تحلیل آن و سایر زمینه های مرتبط با آن در قالب رشته های متفاوت در موسسات مختلف وجود داشت. اما با آشکار شدن کاربردهای این حوزه و ورود آنها به دوره های آموزشی و آموزش سیستماتیک، نیاز به ایجاد یک رشته ی مستقل شدت گرفت تا اینکه یک رشته ی مجزا به عنوان زیست فناوری دارویی شکل گرفت. زیست فناوری دارویی یک رشته نسبتاً جدید و رو به رشد است که در آن اصول زیست فناوری برای توسعه داروها اعمال می شود. این زمینه ی علمی می تواند از سایر رشته های زیست فناوری مانند پزشکی، کشاورزی، صنعتی و غیره متمایز شود. در این زمینه، نه تنها طراحی، تولید و کنترل داروها با کمک میکروارگانیسم ها یا سایر موجودات بیولوژیکی صورت می پذیرد، بلکه بررسی تأثیرگذاری این محصولات بر سیستم مراقبت های بهداشتی از طریق داروهای مختلف هدفمند و هوشمند نیز مورد اهتمام است.

آمار نشان می دهد که سالیانه نزدیک به ۱۴ تا ۱۵ میلیون کودک زیر سن ۵ سال (حدود ۴۰ هزار نفر در روز) فوت می کنند، که علت فوت ۸۰ درصد آنها بر اثر بیماری های عفونی می باشد. با توجه به پیش بینی های انجام شده مبنی بر افزایش جمعیت جهان به بیش از ۸ میلیارد در سال ۲۰۳۰ میلادی و در نتیجه ایجاد چالش هایی در حوزه بهداشت و سلامت عمومی از جمله عدم درمان بیماری ها به علت مقاومت دارویی، زیست فناوری دارویی می تواند نقش قابل توجهی در جهت تولید داروهای موثر با کارایی بالا داشته باشد. رسالت مهم دیگر زیست فناوری دارویی تولید عواملی جهت تشخیص بیماری ها در مراحل ابتدایی و نیز امکان درمان بسیاری از بیماری

هایی که تاکنون برای آنها راهکار درمانی پیشنهاد نشده است، می باشد. در حال حاضر زیست فناوری دارویی با کمک مهندسی پروتئین و مهندسی ژنتیک امکان تولید نسل جدید داروها را فراهم آورده است. همچنین با استفاده از روش های مدرن، تشخیص برخی بیماریها در مراحل اولیه و حتی قبل از تولد را امکان پذیر ساخته است.

سریع ترین و کم هزینه ترین راه برای دستیابی به مراقبت های بهداشتی- درمانی، استفاده از این شاخه زیست فناوری است، که در طی سالیان گذشته با استفاده از فنون متفاوت و نوین، داروهای جدیدی را برای پیشگیری و درمان بیماری ها به بازار عرضه کرده است. داروهای زیستی با کشت انبوه میکروارگانیسم ها به دست آمده و برای پیش گیری، تشخیص، درمان، و یا کاهش عوارض و دردهای ناشی از بیماری استفاده می شوند. داروهای زیستی از لحاظ تولید و نحوه عمل بسیار پیچیده تر از داروهای شیمیایی هستند. از آنجاکه این داروها از لحاظ ترکیب با مواد زیستی موجود در بدن شباهت دارند به راحتی توسط اسید معده هضم می شوند، بنابراین برای رساندن این داروها به موضع مورد نظر باید از شیوه های خاصی استفاده کرد. به طور کلی، تاریخچه زیست فناوری دارویی شامل کشف پنی سیلین توسط الکساندر فلمینگ در یک کپک معمولی در سال ۱۹۲۸ بر می گردد که توسعه آن - ناشی از آسیب های جنگ جهانی دوم - با روش های تولید در مقیاس بزرگ اتفاق افتاد. زیست فناوری دارویی از آن زمان به بعد به شدت تغییر کرده است. زیست فناوری دارویی مدرن شامل شبیه سازی ژن و فناوری DNA نو ترکیب می شود. شبیه سازی ژن شامل جداسازی یک بخش از مولکول DNA است که مربوط به یک ژن منفرد و سنتز ("کپی") آن بخش است. فناوری DNA نو ترکیب یا پیوند ژن، شامل تغییر مواد ژنتیکی در خارج از ارگانیسم

است. بدین معنی که بخشی از یک مولکول DNA بسیار متفاوت را وارد یک مولکول DNA هدف می کنند و باعث تولید یک ژن تغییر یافته (DNA نوترکیب) می شوند. فناوری DNA نوترکیب امکان اصلاح میکروارگانیسم‌ها، حیوانات و گیاهان را می‌دهد تا مواد مفید پزشکی، به‌ویژه پروتئین‌های کمیاب انسانی را تولید کنند. به عنوان مثال برای تولید پروتئین های کمیاب انسانی می توان با انتقال ژن های انسانی به حیواناتی مانند گاو ها شرایط تولید پروتئین های درمانی در شیر آنها را فراهم آورد.

زیست فناوری همچنین در ابداع روش‌هایی که به کمک آن‌ها بتوان بیماری‌هایی با منشأ ژنتیکی از جمله تالاسمی، سندرم داون را قبل از تولد شناسایی نمود، مؤثر بوده است. تا به امروز، بیش از ۴۰۰ محصول دارویی و واکسن برای بیماری های مختلف از جمله انواع مختلف سرطان‌ها و بیماری‌های آلزایمر، قلبی، دیابت.....با استفاده از روش های نوین زیست فناوری تولید شده است و در حال حاضر در مرحله‌ی آزمایش‌ها بالینی<sup>۱</sup> می‌باشند. با توجه به کاربرد وسیع محصولات حاصل از زیست فناوری در تشخیص و درمان بیماری ها، در سال های اخیر روند تولید و فروش این محصولات افزایش قابل توجهی داشته است به طوری که می توان آنتی بادی های تولیدی حاصل از این تکنولوژی را پرفروش ترین داروها به شمار آورد.

اقدام صحیح و سریع دانشمندان و جامعه علمی منجر به تفاوت پیشرفت سلامت بین کشورهای در حال توسعه و کشورهای توسعه یافته می شود. روش های جدید علمی و زیست فناوری نقش موثری در بهبود و دانش بهداشت

---

<sup>۱</sup> Clinical trai

عمومی داشته است. امروزه، با پتانسیل فوق‌العاده ژنومیک و پیشرفت‌های دیگر در علوم زیستی، سهم علم در بهبود بهداشت عمومی و کاهش ناهماهنگی‌های بهداشت جهانی بیش از هر زمان دیگری برجسته است. طی ۱۰۰ سال گذشته، نوآوری در علم و فناوری منجر به بهبود سلامتی، کیفیت زندگی و افزایش امید به زندگی در سراسر جهان شده است. با این حال هنوز مزایای پزشکی مدرن به میلیون‌ها نفر در کشورهای در حال توسعه نرسیده است. تشخیص این که دانش و فناوری می‌تواند در مشارکت با اقدامات بهداشت عمومی در کشورهای در حال توسعه به‌طور مؤثری مورد استفاده قرار گیرد و کار آیی آن‌ها را افزایش دهد، بسیار مهم است.

مبارزه برای بهبود نیازهای بهداشت جهانی، علاوه بر اقدامات مؤثر بهداشت عمومی، به ابزارهای تشخیصی سریع و کارآمد، واکسن‌ها و داروها، روش‌های کارآمد و رویکردهای جدید در زمینه درمان‌ها و احیای کم‌هزینه‌ی آب، خاک و سایر منابع طبیعی نیز نیاز دارد. در رویارویی با این چالش‌ها، زیست فناوری پتانسیل فوق‌العاده‌ای برای پرداختن به مسائل بهداشتی و پیشرفت در کشورهای در حال توسعه دارد. چند فناوری برتر زیست فناوری برای بهبود سلامت شامل تشخیص مولکولی، واکسن‌های نو ترکیب و پروتئین‌های درمانی نو ترکیب، واکسن و دارورسانی، تصفیه بیولوژیکی، تعیین توالی ژنوم عوامل بیماری‌زا هست. از اینرو، در ادامه فناوری‌های مرتبط با زیست فناوری دارویی در زمینه تشخیص، کنترل و درمان بیماری‌ها را توضیح داده خواهند شد که چگونه می‌توان از آن‌ها برای بهبود سلامت استفاده کرد.

## ۲- زیست فناوری در تشخیص بیماری‌ها:

همانطور که پیش تر ذکر شد، تشخیص مولکولی بیماری‌ها یکی از رویکردهای مهم زیست فناوری مدرن در حوزه پزشکی و دارو می باشد.

تشخیص، فرآیند تعیین ماهیت یک بیماری یا اختلال و تمایز آن از سایر شرایط ممکن است. فرآیند تشخیص روشی است که به وسیله آن متخصصان سلامت، یک بیماری را از دیگری تمایز داده و یکی را به عنوان محتمل ترین علت علائم فرد تشخیص می دهند. علائمی که در اوایل دوره بیماری ظاهر می شوند، اغلب مبهم تر از علائمی هستند که با پیشرفت بیماری ظاهر می شوند و این باعث می شود که این زمان برای تشخیص دقیق سخت ترین زمان باشد. رسیدن به یک نتیجه دقیق بستگی به زمان و توالی علائم، سابقه پزشکی گذشته و عوامل خطر بیماری های خاص و مواجهه اخیر با بیماری دارد. ابزارهای تشخیصی به طور متداول برای تشخیص عفونت‌ها به کار گرفته می شوند یا شواهدی از قرار گرفتن در معرض یک عامل بیماری‌زا را نشان می دهند. پیشرفت در زیست فناوری به طور قابل توجهی کار آیی سیستم‌های تشخیصی موجود را افزایش داده است.

به طور کلی، روش های تشخیص بیماری مبنی بر DNA و پروتئین ها می باشد. هر کدام از این موارد شامل تکنیک های مولکولی مختلفی می باشند که در ادامه توضیح داده خواهند شد.

از جمله روش های تشخیص مبنی بر پروتئین الایزا می باشد. می توان گفت، پر کاربردترین روش‌ها بر اساس تنوع روش الایزا (ELISA) است. این روش برای تشخیص و تعیین کمیت مواد محلول مانند پپتیدها، پروتئین ها، آنتی



بادی ها و هورمون ها طراحی شده است. در ELISA، آنتی ژن (ماکرومولکول هدف) روی یک سطح جامد (میکروپلیت) بی حرکت می شود و سپس با یک آنتی بادی، که به یک آنزیم گزارشگر متصل گردیده است، کمپلکس می شود. تشخیص با اندازه گیری فعالیت آنزیم گزارشگر و با تولید یک محصول قابل اندازه گیری انجام می شود. مهمترین عنصر روش ELISA برهمکنش بسیار اختصاصی آنتی بادی-آنتی ژن است. آنتی ژن به هر ترکیبی اطلاق می شود که باعث ایجاد پاسخ ایمنی در بدن و به ویژه تولید آنتی بادی می شود. آنتی بادی که ایمونوگلوبولین نیز نامیده می شود، یک پروتئین محافظ است که توسط سیستم ایمنی در پاسخ به حضور یک ماده خارجی تولید می شود. اگرچه الایزا دقیقاً یک فن آوری زیستی نیست، اما پیشرفت آن با پیشرفت در تکنیک های شبیه سازی و بیان ژن به شدت تسهیل شده است. بنابراین اکثر سیستم های الایزا اکنون از آنتی ژن های نو ترکیب برای تشخیص آنتی بادی ها استفاده می کنند و در نتیجه، بهبود قابل توجهی در حساسیت و ویژگی آنها حاصل شده است. به علاوه با پیشرفت علوم ایمنی شناختی محل های اصلی برهم کنش بین آنتی ژن و آنتی بادی به صورت دقیق قابل شناسایی می باشد که در طراحی روش های تشخیصی موثر بر پایه روش الایزا موثر می باشد. بدین صورت که برای طراحی روش تشخیصی بر پایه الایزا از آنتی بادی هایی استفاده می شود که دقیقاً برای یک بخش خاص از آنتی ژن طراحی شده اند و برهمکنش تداخلی با سایر آنتی ژن های مزاحم نخواهند داشت و بدین طریق کیفیت تشخیص را افزایش می دهند. الایزا می تواند به صورت مستقیم یا غیرمستقیم انجام شود.

## روش الایزا مستقیم:

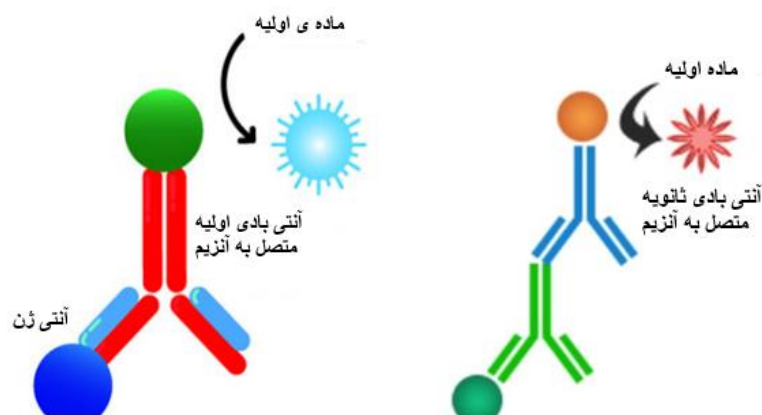
سنجش ایمنوسوربنت متصل به آنزیم (ELISA) برای اولین بار توسط Engvall و Perlmann توصیف شد. الایزا یک روش سریع و حساس برای تشخیص و کمی سازی یک آنتی ژن با استفاده از یک آنتی بادی نشاندار شده با آنزیم است. علاوه بر استفاده معمول آزمایشگاهی، الایزا در زمینه پزشکی و صنایع غذایی به عنوان ابزار تشخیصی و کنترل کیفیت مورد استفاده قرار گرفته است. این فناوری که به طور سنتی در صفحات پلی استایرن ۹۶ چاهی یا ۳۸۴ چاهی انجام می شود، با افزایش اتوماسیون به پلتفرم های دیگر نیز گسترش یافته است. بسته به اپی توپ آنتی ژن و در دسترس بودن آنتی بادی خاص، تغییراتی در تنظیم ELISA وجود دارد. چهار فرمت اصلی عبارتند از الایزای مستقیم، غیر مستقیم، ساندویچی و رقابتی.

الایزای مستقیم ساده ترین فرمت است که به یک آنتی ژن و یک آنتی بادی مزدوج با آنزیم مخصوص آنتی ژن نیاز دارد. در این روش ابتدا آنتی ژن مد نظر را در کف چاهک ها می پوشانند و در ادامه آنها را در معرض آنتی بادی نشان دار اختصاصی قرار می دهند. در صورت ایجاد برهم کنش بین آنتی ژن و آنتی بادی بر اثر اضافه کردن سوبسترای آنزیم متصل به آنتی بادی یک پیام رنگی ایجاد شده و حضور آنتی ژن را تایید می کند.

## الایزا غیرمستقیم (Indirect ELISA)

هدف الایزای غیرمستقیم تشخیص کمیت و کیفیت آنتی بادی علیه آنتی ژن خاص می باشد. برای این منظور ابتدا آنتی ژن مورد نظر در چاهک پوشش داده می شود. پس از اشغال فضاهای خالی با شیر خشک، سرم و یا

نمونه‌های دیگر حاوی آنتی‌بادی اولیه به چاهک‌ها اضافه‌شده و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه می‌شود تا با آنتی‌ژن کوت شده برهمکنش دهد. آنتی‌بادی‌های متصل نشده با چندین بار شستشو حذف می‌شوند. در ادامه آنتی‌بادی ثانویه اضافه می‌شود که اختصاصی آنتی‌بادی اولیه می‌باشد این آنتی‌بادی با آنزیم نشان‌دار شده می‌باشد. بعد از حذف آنتی‌بادی‌های ثانویه با شستشو، سوبسترای مخصوص آنزیم به چاهک‌ها اضافه می‌شود. سوبسترای اضافه‌شده در اثر واکنش‌های آنزیمی به محصول رنگی تبدیل می‌شود که توسط دستگاه (ELISA reader) مورد خوانش و اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. عدد به دست آمده از خوانش میزان آنتی‌ژن اولیه را مشخص می‌کنند. (شکل ۱).



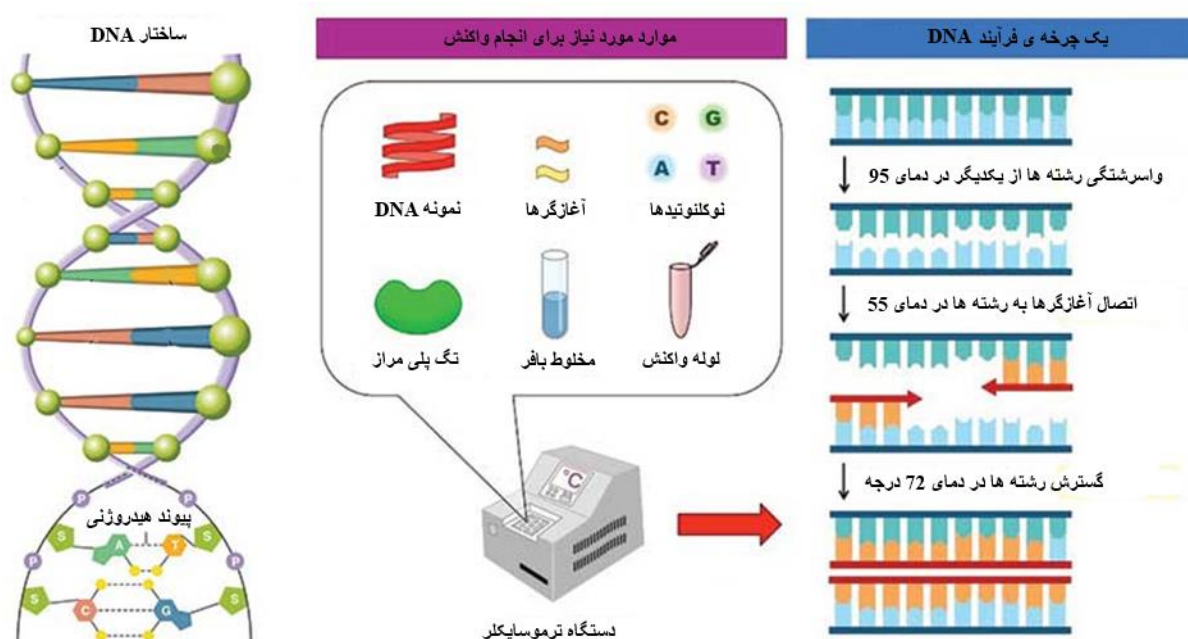
شکل ۱. الایزای مستقیم (سمت چپ) و الایزای غیرمستقیم (سمت راست). در الایزای مستقیم پس از کوت کردن آنتی‌ژن مورد نظر و اضافه کردن آنتی‌بادی، به‌وسیله شستشو، آنتی‌بادی‌های آزاد و متصل نشده از محیط خارج می‌شوند. سپس سوبسترا مناسب آنزیم به محیط اضافه‌شده و یک سیگنال رنگی تولید می‌شود که به‌طور مستقیم با مقدار آنتی‌ژن در نمونه در ارتباط است. در الایزای غیرمستقیم پس از کوت کردن

آنتی ژن و افزودن سرم و یا نمونه‌های دیگر حاوی آنتی‌بادی اولیه، نوبت به اضافه کردن آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار شده با آنزیم می‌رسد. یک مرحله شستشو منجر به حذف آنتی‌بادی‌های ثانویه اتصال نیافته می‌شود. در نهایت سوپسترای مخصوص آنزیم به محیط آزمون اضافه می‌شود. با انجام یک واکنش هیدرولیز، آنزیم سوپسترا را به محصولات رنگی تبدیل می‌کند که توسط دستگاه (ELISA reader) مورد خوانش و اندازه‌گیری قرار می‌گیرد.

در سالهای اخیر پیشرفت‌های زیست فناوری منجر به ایجاد و افزایش استفاده از روش‌های جدید تشخیصی در جهت تشخیص زودهنگام عفونت‌ها شده است. اساس برخی از این روش‌ها مبنی بر شناسایی DNA می‌باشد. بعد از کشف PCR و استفاده از DNA در این تکنیک برای تشخیص بیماری‌ها، کاربردهای دیگر تشخیص DNA مطرح و توسعه داده شد. در این روش‌ها مکمل بودن DNA هدف و یک DNA نشاندار منجر به شناسایی می‌شود. تشخیص DNA به صورت ساده شامل تثبیت DNA نمونه روی یک فاز جامد (معمولاً غشای نیترو سلولز یا نایلون) و هیبرید سازی آن با یک رشته کوتاه پروب نشان‌دار است. البته روش‌های بسیار متنوع تشخیصی بر پایه برهم کنش بین دو رشته ی DNA مکمل نیز طراحی شده و در موارد گوناگون به کار برده می‌شوند. با این وجود اصل اساسی همه این روش‌ها هیبرید شدن دو رشته مکمل می‌باشد. از آنجاکه کارایی هیبریداسیون به میزان مکمل بودن توالی بستگی دارد، این روش‌ها در شرایط مناسب می‌توانند بسیار کاربردی باشند.

عملکرد PCR همانند دستگاه فتوکپی می‌باشد. با استفاده از این روش یک نسخه DNA هزاران برابر تکثیر می‌شود تا به اندازه ای برسد که با روش‌هایی مثل الکتروفورز قابل مشاهده باشد. اساس این روش مانند واکنش همانندسازی DNA در موجودات زنده توسط آنزیم DNA پلیمراز می‌باشد. در موجودات زنده، در فرآیند

همانندسازی چند پروتئین و آنزیم DNA پلیمراز نقش دارند درحالی که در واکنش PCR تنها نوع خاصی آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت به نام Taq polymerase به همراه بافر، کلرید منیزیم و نوکلئوتیدها استفاده می‌شود. ترکیبی از محصولات PCR با پروب‌های الیگونوکلئوتید خاص نشان‌دار، دارای پتانسیل قابل توجهی در زمینه تشخیصی است. به این ترتیب می‌توان محصولات تکثیرشده را با استفاده از آنتی‌بادی یا سایر معرف‌های خاص تشخیص داد. از این روش برای توسعه تعدادی سیستم مبتنی بر الایزا، برای تشخیص DNA استفاده شده است.



شکل ۲. نحوه انجام واکنش PCR. در انجام واکنش PCR یک مرحله واسرشتگی اولیه برا تک رشته ای شدن کلیه مولکول های DNA انجام می گیرد. سپس تکرار سه مرحله واکنش چرخه های واکنش را ایجاد می کند. واسرشتگی، اتصال پرایمر، گسترش رشته ی DNA در امتداد پرایمرها مراحل بعدی این واکنش می باشند که در نهایت منجر به تولید رونوشت های فراوان از ژن مورد نظر می گردد. در مرحله واسرشتگی دو رشته DNA از هم جدا و آماده اتصال به پرایمر ها می شوند. در مرحله ی اتصال پرایمر، پرایمرهای طراحی شده بخش مکمل

خود روی تک رشته های ایجاد شده را یافته و بدان متصل میشوند. در مرحله امتداد نیز آنزیم DNA پلی مراز به انتهای 3' فراهم شده

توسط پرایمر متصل و رشته ی مکمل را تولید می کنند و منجر به تکثیر رشته های می شوند.

استفاده از تکنیک های تشخیص DNA محدود به تشخیص ساده عوامل بیماری زا نیست. از چندشکلی های ژنی

(Gene polymorphism) می توان برای تمایز بین گونه های بیماری زا و بین سویه های مختلف یک گونه خاص

استفاده کرد. پلی مورفیسم ژنتیکی تفاوت در توالی DNA در افراد، گروه ها یا جمعیت ها است. یک ژن زمانی

چند شکلی نامیده می شود که بیش از یک آلل جایگاه آن ژن را در یک جمعیت اشغال کند. این سطح از آنالیز

در طراحی رویکردهای کنترل بیماری به ویژه در سیستم هایی که شامل پاتوژن های چندشکلی هستند بسیار مهم

است. ژن های rRNA که RNA ریبوزومی هستند به دلیل فراوانی و حفاظت نسبی درون گونه ها، هدف عمده ای

برای تمایز بین گونه ها در عوامل بیماری زای پروکاریوتی و یوکاریوتی هستند. تکنیک های تشخیصی به استفاده از

پروب های الیگونوکلوئوتیدی مختص گونه، متکی هستند. این پروب ها بر اساس آنالیز توالی های ژنی rRNA از

گونه های بیماری زا طراحی شده اند و در واقع توالی پروب مکمل توالی ژنی rRNA می باشد. توالی ها را می توان از

ژن های RNA زیر واحد بزرگ یا کوچک ریبوزوم انتخاب کرد. در روش تشخیصی پروب ها با DNA نمونه یا

توالی های ژن rRNA که توسط PCR تکثیر می شوند واکنش نشان می دهند. چندین روش از این قبیل برای

تشخیص انگل های تیلریا و تریپانوزوم و تمایز کودریا از گونه های ارلیشیا با موفقیت به کاررفته است.

تشخیص باید در مناطقی از ژنوم صورت گیرد که درجه بالاتری از چندشکلی دارند. احتمالاً ساده ترین روش برای

تشخیص چندشکلی ژنومی، تخریب کل DNA با آنزیم های محدودکننده باکتری است. این آنزیم ها، توالی های

نوکلئوتیدی خاصی را تشخیص می‌دهند. این توالی‌های تشخیصی با فراوانی متفاوت در DNA وجود دارند. بنابراین جداسازی محصولات حاصل از تخریب آنزیمی در ژل‌های تفکیک کننده (بر اساس اندازه قطعات DNA ایجاد شده پس از تخریب آنزیمی) باعث ایجاد الگویی اختصاصی می‌شود که ویژگی منحصر به فرد ژنوم مورد بررسی قرار می‌گیرد. این روش به‌عنوان آنالیز چندشکلی طول قطعه محدود<sup>1</sup> (RFLP) شناخته می‌شود. این تکنیک منجر به تشخیص وجود پلی مورفیسم‌ها مخصوصاً تغییرات تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژنوم به وسیله آنزیم‌های محدودگر می‌شود. بدین معنی که اگر یک تغییر تک نوکلئوتیدی در یکی از محل‌های برش آنزیمی رخ داده باشد یک ژنوتیپ جدید وجود خواهد داشت. با تخریب آنزیمی این ژنوم جدید به سبب جهش ایجاد شده یکی از برش‌ها اتفاق نخواهد افتاد و یا یک برش جدید معرفی خواهد شد که در اثر این تغییر یک تغییر متناظر در الگوی تخریبی ایجاد خواهد شد که در نهایت منجر به تشخیص ژنوتیپ جدید خواهد گردید.

اگرچه بررسی مستقیم چنین الگوهایی در پاتوزن‌هایی با اندازه‌های کوچک ژنوم از ارزش قابل توجهی برخوردار است، اما تفسیر در مورد عوامل بیماری‌زای یوکاریوتی مانند انگل‌های پروتوزوئید می‌تواند دشوار باشد؛ زیرا تعداد زیادی از قطعات مشابه از تخریب با بسیاری از آنزیم‌های موجود ناشی می‌شوند. با این حال، می‌توان با استفاده از ترکیبی از پروب‌های نشان‌دار برای توالی‌های چندشکلی شناخته‌شده، این مشکل را برطرف کرد. این روش به‌طور گسترده‌ای برای بررسی تنوع درون گونه T. Parva، بکار رفته است. این روش با تکثیر توالی‌های چندشکلی با

---

<sup>1</sup> restriction fragment length polymorphism

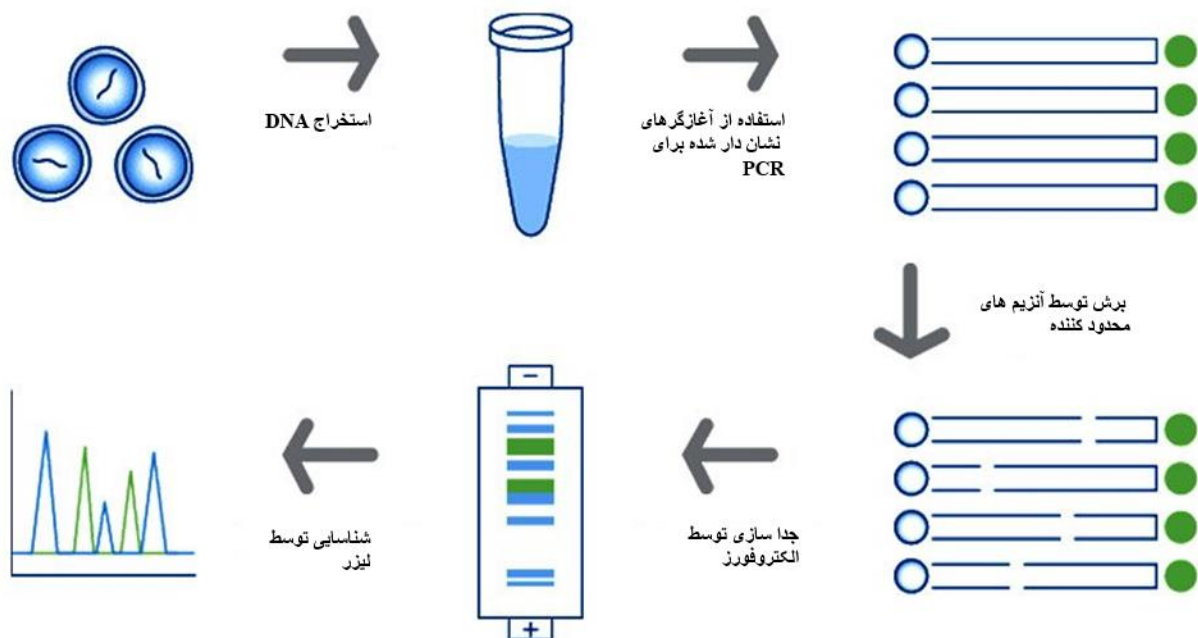
استفاده از PCR و تخریب تکثیرشده‌ها با آنزیم‌های محدودکننده انجام می‌شود و با نام PCR-RFLP شناخته می‌شود. این روش در تعدادی از بیماری‌ها اعمال شده است.

ظرفیت تکثیر فوق‌العاده واکنش PCR امکان ایجاد یک رویکرد ابتکاری را برای تمایز سویه‌های پاتوژن فراهم می‌کند. اختصاصیت روش PCR حاصل استفاده از جفت پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی می‌باشد که به الگوی DNA متصل می‌شوند و واکنش پلیمریزاسیون را آغاز می‌کنند. تحت شرایط خاص دمایی و غلظت نمک، می‌توان پرایمرهای تصادفی را ایجاد کرد که در توالی خود در موقعیت‌های مختلف به صورت تصادفی دارای نوکلئوتیدهای متفاوت هستند. با استفاده از این پرایمرهای تصادفی یک مجموعه مشخص از محصولات PCR با اندازه‌های مختلف و با یک الگوی خاص تولید می‌شود. ژنوتیپ‌های چندشکلی با توجه به استفاده از پرایمرهای تصادفی به سبب تغییراتی که در توالی آنها وجود دارد منجر به تولید الگوهای متفاوت می‌شوند. این فرآیند به‌عنوان چندشکلی قطعات DNA حاصل از تکثیر تصادفی<sup>۱</sup> (RAPD) شناخته می‌شود و برای تمایز انواع T. Parva از هم استفاده شده است.

---

<sup>1</sup> random amplified polymorphic DNA





شکل ۳. نحوه انجام RFLP. در روش PCR-RFLP، در این روش قطعه حاوی جهش (همچنین قطعه فاقد جهش) را با

واکنش زنجیره پلی مرز و استفاده از دو پرایمر مخصوص که به همین منظور طراحی شده تکثیر می نمایند.

تکنیک های تشخیصی مبتنی بر DNA، علی رغم اینکه قادر به بررسی قرار گرفتن در معرض عفونت و وضعیت ایمنی نمی باشند، توانایی عظیمی برای توسعه دارند. با پیشرفت فناوری های مولکولی، کاربردهای این تکنیک ها به طرز چشمگیری افزایش می یابد. در حال حاضر، تعداد روزافزون بیماری های انسان و حیوان در ارتباط با نقایص ژنی خاص، استفاده از فن آوری تشخیصی را برای تشخیص صفات میزبان و همچنین عوامل بیماری زا گسترش داده است. در مورد دام ها، توجه بیشتر در این زمینه به صفات مقاومت در برابر بیماری معطوف شده است. این روش ها برای ارزیابی پتانسیل یک حیوان خاص برای موفقیت یا عدم موفقیت در برابر واکسن نیز به کار رفته اند.

بیماری‌های عفونی و انگلی هرساله منجر به ۱۷ میلیون مرگ می‌شوند. سه قاتل اصلی ایدز، مالاریا و سل است که روی هم رفته حداقل ۵ میلیون نفر را سالانه به کام مرگ می‌کشانند. تشخیص سریع و دقیق بیماری‌ها نه تنها شانس زنده ماندن را افزایش می‌دهد، بلکه از اتلاف منابع در درمان‌های نامناسب جلوگیری می‌کند و به جلوگیری از شیوع بیشتر بیماری کمک می‌کند. بسیاری از ابزارهای مرسوم تشخیصی معمولاً دست‌وپا گیر، وقت‌گیر، گران و گاهی نادرست هستند. آزمایش PCR علاوه بر حساسیت فوق‌العاده، می‌تواند نتایج را در چند ساعت ارائه دهد. این روش همچنین می‌تواند برای شناسایی موجودات عفونی که رشد در آن‌ها دشوار یا غیرممکن است (به‌عنوان مثال مایکوباکتریوم توبرکلوزیس<sup>۱</sup> یا پلاسمودیوم فالسیپاروم<sup>۲</sup>) یا کنترل آن خطرناک هستند (به‌عنوان مثال HIV / AIDS) استفاده شود. برای مثال در نیکاراگوئه یک آزمایش PCR برای سه گونه لیشرمانیا (Leishmania mexicana, braziliensis, Leishmania donovani) طراحی شد که باعث ایجاد طیفی از بیماری‌ها می‌شوند. با استفاده از این روش PCR ترکیبی بیش از یک بیماری را می‌توان به طور هم‌زمان آزمایش کرد که بدین طریق هم در زمان و هم در منابع صرفه‌جویی می‌شود.

یک گام فراتر از فن‌آوری رایج PCR، روش‌های بر پایه نانو تکنولوژی می‌باشد که اساس یک روش جدید را برای تشخیص بیماری‌های عفونی در سطح مولکولی، بدون نیاز به تکثیر DNA فراهم می‌کند. در این فن‌آوری از نانو ذرات طلا استفاده شده است که به الیگونوکلوئیدهای DNA (مکمل توالی‌های حاصل از پاتوژن) متصل هستند.

---

<sup>۱</sup> Mycobacterium tuberculosis

<sup>۲</sup> Plasmodium falciparum

یک نمونه خون بین دو الکتروود در حضور پروب قرار می‌گیرد. این پروب در صورت وجود توالی پاتوژن به آن متصل می‌شود و ذرات طلا مدار بین الکتروودها را می‌بندند تا سیگنال قابل تشخیص تولید کنند. این روش حساسیت بیشتری نسبت به روش‌های تشخیص متعارف دارد و دارای قابلیت مقرون به صرفه‌تری است.

درحالی‌که آزمایش‌های PCR در حال یافتن کاربردهایی در کشورهای در حال توسعه است، کاربردهای مبتنی بر آنتی‌بادی نیز بسیار مناسب کشورهای در حال توسعه هستند. در چند سال گذشته، توسعه آزمایش‌های ساده و سریع با آنتی‌بادی، این فناوری را برای کشورهای در حال توسعه افزایش داده است. تست آنتی‌بادی برای مالاریا، ایدز، سل و هپاتیت C و سایر بیماری‌ها در حال تولید و استفاده است.

### ۳- نقش زیست فناوری در کنترل بیماری‌ها از جمله سرطان:

در بخش اعظم تاریخ بشر، پزشکی مبتنی بر بیوشیمی بوده است که در آن پزشکان و دانشمندان از ترکیبات شیمیایی طبیعی و سنتز شده برای ایجاد اثرات درمانی در بدن استفاده می‌کردند. در حدود قرن بیست و یکم، تغییرات عظیمی در علم پزشکی رخ داد. این علم در حال حرکت به سمتی است که در آن ترکیبات درمانی به طور فزاینده‌ای از سلول‌های زنده مهندسی شده زیستی به دست می‌آیند. این سلول‌های مهندسی شده از دانش به سرعت در حال گسترش ژنتیک انسانی استخراج شده‌اند. اولین کاربردهای زیست فناوری در دهه‌های ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰ با توسعه فناوری DNA نو ترکیب ظهور کرد. در آن دوران دانشمندان توالی‌های ژنتیکی حاصل از ارگانیسم‌های مختلف را برای کمک به بیماران به کار بردند. امروزه صنعت زیست فناوری به طور قابل توجهی

پیچیده تر شده است و مهارت های منحصر به فرد زیست فناوری تبدیل به ستون فقرات پزشکی مدرن شده است. به عنوان مثال، امروزه، انکولوژیست ها می توانند برنامه های درمانی را با استفاده از اطلاعات موجود در کدهای ژنتیکی خود بیمار شخصی سازی کنند. آنها می توانند جهش های DNA خاصی را که در خود تومورها یافت می شوند هدف قرار دهند و می توانند سیستم ایمنی بدن برخی از بیماران را برای حمله به سلول های سرطانی تقویت کنند. در مواجهه با نیاز و انگیزه باورنکردنی که برای نوآوری در انکولوژی وجود دارد، محققان زیست فناوری در سرتاسر جهان روش های درمانی بالقوه جدید، از ایمنی درمانی و مولکول های کوچکی که جهش های خاص در DNA تومور را هدف قرار می دهند تا ویروس های اصلاح شده ژنتیکی (که عوامل مبارزه با سرطان را به سلول های سرطانی می رسانند) را به دقت بررسی می کنند. پلتفرم های درمانی انعطاف پذیری که می توانند برای رفع نیازهای هر بیمار تکامل یابند در حال توسعه می باشند.

دارورسانی یکی از عوامل مهمی است که در درمان سرطان می تواند موثر باشد. زیست فناوری نقش مهمی در طراحی سیستم های دارورسانی مناسب و جدید بر عهده دارد. یک سیستم دارورسانی موثر می تواند باعث افزایش زمان گردش دارو در بدن، کاهش سمیت درمان، افزایش نیمه عمر دارو، رهایش کنترل شده ی دارو، بهبود توزیع دارو، تطبیق پذیری با محیط، افزایش غلظت دارو در سلول و افزایش دسترسی به داروهایی که انحلال پذیری کمی دارند شود. در این روش باید هدف خاص در مرحله ی خاصی از بیماری، داروی درمان بیماری و حاملی که

دارو را تا محل تاثیر گذاری حمل کند شناسایی نمود تا از برهمکنش‌های غیرضروری جلوگیری شود و پایداری دارو طی درمان تضمین گردد.

یکی دیگر از مشکلات درمان سرطان، مقاومت به درمان‌های ضد سرطان در بیماران مبتلابه تومورهای جامد پیشرفته می باشد که نیاز به درمان‌های جدید را آشکار می‌سازد. در درمان ایده آل، سلول‌های سرطانی با حداقل عوارض جانبی ریشه کن خواهند شد.

زیست فناوری با دستکاری ژنتیکی باکتری ها راهکارهای جدیدی برای درمان و کنترل بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها پیشنهاد می‌دهد. باکتری‌ها به روش‌های مختلف در درمان سرطان به کار می‌روند. آنها می توانند اثرات مستقیم ضد توموری داشته و یا ناقل عواملی دارای این آثار باشند.

#### ۴-دستاوردهای زیست فناوری دارو در درمان بیماری ها:

در طول دو دهه اخیر پیشرفت های قابل توجهی در زمینه زیست فناوری در حوزه دارو رخ داده است. حدود ۳۵۰ داروی نو ترکیب در مراحل مختلف کارآزمایی بالینی قرار دارند و حدود ۲۰ پروتئین نو ترکیب دارویی به صورت تجاری در دسترس می باشند. این تعداد داروی تایید شده و در حال تایید نشان دهنده ی جهش بزرگ داروهای زیست فناوری می باشد که می توانند در درمان انواع بیماری هایی همچون انواع سرطان، ایدز، بیماری های دستگاه عصبی و ... کاربرد داشته باشند. باید توجه داشت که نقش فناوری های DNA نو ترکیب در تولید داروها و واکسن‌های زیست فناوری را نمی توان نادیده گرفت. انتظار می رود در آینده شیب انتقال به سمت داروی های

مختلف زیست فناوری از جمله انواع مختلف آنتی‌بادی‌ها، فاکتورهای رشد، پروتئین‌های تلفیقی (تلفیقی از بخش‌های مهم چند آنتی ژن برای ایمنی زایی چند آنتی ژنی و یا تشخیص چند آنتی ژنی)، پپتیدهای هورمونی، آنزیم‌ها، واکسن‌های نو ترکیب، و فاکتورهای انعقادی شدت بیشتری به خود گیرد.

همانطور که پیش‌تر هم ذکر شد، از آنجایی که این فن‌آوری‌ها از حساسیت و اختصاصیت تکنیک‌های تشخیصی بالایی برخوردار هستند، کاربرد دیگر این فن‌آوری جدید در تشخیص بیماری‌ها هست. از طرف دیگر سرعت تولید این نوع محصولات از جمله واکسن و پروتئین‌های نو ترکیب به دلیل ایجاد و بهبود روش‌های نوین افزایش قابل توجهی داشته است. این روش‌های نوین مخصوصاً روش‌های مولکولی باعث درک بهتر زیست‌شناسی سلولی و مولکولی شده و در نتیجه منجر به ایجاد و توسعه روش‌های جدید تر می‌شود که از جمله آنها به تراشه‌های DNA می‌توان اشاره کرد. تراشه‌های DNA می‌توانند صدها هزار الیگونوکلوئید را در خود جای دهند. با در دسترس بودن اطلاعات مربوط به توالی برای تعداد زیادی از ژنوم‌های بیماری‌زا، و با مشاهده ژنوم انسانی، این تراشه‌ها کاربرد های زیادی دارند.

از بین دستاوردهای بیولوژیکی حاصل از زیست‌فناوری واکسن‌های نو ترکیب، پروتئین‌های نو ترکیب و مونوکلونال آنتی‌بادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند که در ادامه با جزئیات بررسی می‌کنیم.

#### ۴-۱- پروتئین نو ترکیب:

روش های مهندسی ژنتیک و مهندسی پروتئین مزیت های قابل توجهی نسبت به روشهای سنتی و سنتز شیمیایی درشت مولکولها از جمله پروتئین ها دارند. از جمله این مزیت ها، تولید در مقیاس بالا در سیستم های زنده از جمله میکروارگانیسم ها یا میزبان های گیاهی و جانوری، ایزوله و تخلیص کردن پپتیدها و پروتئین ها را در حجم وسیع می توان نام برد. با استفاده از این تکنولوژی پروتئین های مورد نظر به صورت تجاری در صنایع تولید می شوند تا به حجم انبوه برسند و پاسخگوی تقاضای صنعت باشند. امروزه بسیاری از پروتئین ها، واکسن ها و داروی های درمانی با کمک مهندسی ژنتیک به روش نو ترکیب تولید می شوند. در استراتژی بیان پروتئین نو ترکیب، ابتدا وکتور DNA حاوی الگوی DNA نو ترکیب به یک سلول خاص ترانسفکت یا منتقل می شود. سپس سلول های حاوی DNA نو ترکیب، کشت داده می شوند، تا بتوانند پروتئین مورد نظر را رونویسی و ترجمه کنند. در مرحله بعد این سلولها با روش های مختلف از جمله سونیکاسیون شکسته یا لیز می شوند تا پروتئین تولید شده آزاد شود و سپس با استفاده از ستون های کروماتوگرافی تخلیص می شود. میزبان های DNA نو ترکیب میتواند سیستم پروکاریوتی و یوکاریوتی باشد. که هر کدام از آنها مزایا و معایب خود را دارند. انتخاب نوع میزبان به فاکتورهای مختلفی بستگی دارد که می توان بر اساس نوع پروتئین، فعالیت عملکردی و همچنین غلظت مورد نیاز انتخاب شود. در حدود ۳۰۰ داروی نو ترکیب برای سرطان، ایدز، بیماری های دستگاه عصبی در مراحل مختلف بالینی قرار دارند که مهم ترین ها آنها می توان به اریتروپویتین، واکسن هپاتیت ب، هورمون رشد انسانی، انسولین و اینترفرون آلفا اشاره کرد.

#### ۴-۲- واکسن:

واکسن بدون شک مهم‌ترین پیشرفت پزشکی در صدسال گذشته است. واکسیناسیون منجر به ریشه‌کن شدن بسیاری از بیماری‌ها از جمله آبله، ریشه‌کنی تقریبی فلج اطفال و کاهش چشمگیر شیوع بسیاری از بیماری‌های عفونی دیگر شده است. انتظار می‌رود پیشرفت در تحقیقات واکسن علاوه بر بیماری‌های واگیردار، بلکه بر بیماری‌های غیر واگیر مانند سرطان نیز تأثیر بگذارد. فن‌آوری نو ترکیب، وجود پروتئین‌های منفرد یک عامل بیماری‌زا را در میکروارگانیسم‌های غیر بیماری‌زا، امکان‌پذیر می‌کند. این امر ضمن ایجاد ایمنی در برابر بیماری، خطرات مرتبط با واکسن‌های زنده و ضعیف شده معمولی را کاهش می‌دهد. واکسن‌های نو ترکیب همچنین ممکن است به دلیل روش‌های ابتکاری تولید و به‌طور بالقوه، به دلیل بهبود ویژگی‌های ذخیره‌سازی (مانند طول عمر و مقاومت در برابر تجزیه) ارزان‌تر باشند. در ساخت واکسن نو ترکیب پیشرفت زیادی حاصل شده است اما چالش‌هایی مانند، ارائه صحیح آنتی‌ژن‌های نو ترکیب به سیستم ایمنی بدن و طولانی شدن عمر پروتئین مهندسی‌شده در بدن، همچنان وجود دارد. انواع مختلفی از واکسن‌های نو ترکیب وجود دارد که امیدوارکننده‌ترین آن‌ها واکسن‌های ناقل ویروسی، واکسن DNA برهنه و واکسن‌های گیاهی است.

سل در سراسر جهان و به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه به‌عنوان یک عفونت فرصت‌طلب در حال افزایش است. هرساله حداقل ۲ میلیون نفر جان خود را از دست می‌دهند. محققان در حال مطالعه برای تولید یک واکسن سل



نو ترکیب قوی هستند. پیشرفت تا به امروز شامل یک واکسن ساب یونیت<sup>۱</sup> بر پایه آنتی ژن سطحی Mtb8.4 است که از موش‌ها در برابر عفونت ویروس سل محافظت می‌کند.

بیشتر واکسن‌های ایدز که در حال حاضر در آزمایش بالینی قرار دارند، واکسن‌های نو ترکیب هستند. ۲۸ آزمایش در حال انجام است که شامل ۲۴ واکسن مختلف است. از این تعداد، ۸ مورد مبتنی بر DNA، ۸ مورد استفاده از ناقل ویروسی نو ترکیب، ۵ زیر واحد پروتئینی و ۳ مورد نیز لیپوپپتید (سازمان ابتکار بین المللی واکسن ایدز<sup>۲</sup>) است.

#### ۴-۲-۱- واکسن و دارورسانی:

روش‌های بهبود یافته واکسن و دارورسانی با پیشرفت واکسن‌ها مرتبط هستند. در حال حاضر، بیشتر واکسن‌ها و بسیاری از داروها با تزریق وارد بدن می‌شوند. سالانه هزاران کودک در اثر بیماری‌های قابل پیشگیری از واکسن می‌میرند؛ زیرا واکسن نیاز به امکانات گران قیمت و پرسنل پزشکی آموزش دیده دارد. کاهش هزینه‌ها از طریق استفاده مجدد از سوزن‌ها و سایر اقدامات غیر بهداشتی در انتشار عفونت‌های منتقل شده از خون، به ویژه ایدز و هپاتیت شناخته شده است. تخمین زده می‌شود که هر ساله ۸۰ هزار تا ۱۶۰ هزار مورد جدید ایدز، ۸ تا ۱۶ میلیون مورد جدید هپاتیت B و ۳/۲ تا ۶/۴ میلیون مورد جدید هپاتیت C ناشی از استفاده مجدد از سوزن باشد.

---

<sup>1</sup> Subunit vaccine

<sup>2</sup> International Aids Vaccine Initiative

سیستم‌های دارورسانی بدون تزریق و انتشار کنترل شده می‌توانند به حل بسیاری از این مشکلات کمک کنند. فناوری‌های بدون سوزن، واکسن یا دارو را با یک جت گاز پرسرعت وارد بدن می‌کند. محلول‌ها، ژل‌ها و پمادها از انتشار ساده برای ورود عوامل به بدن استفاده می‌کنند. یکی دیگر از راه‌های ورود به بدن، غشای مخاطی است که تمام حفره‌های داخلی بدن از جمله روده‌ها و ریه‌ها را می‌پوشاند. داروها و واکسن‌ها از طریق افشانه‌های استنشاقی می‌توانند از طریق دستگاه تنفسی وارد شوند.

حمل و نقل و نگهداری در یخچال هزینه بالایی نیاز دارد، که به‌طور کلی حداقل ۱۵٪ بودجه تولید واکسن را تشکیل می‌دهد. انواع ارگانایسم‌ها حاوی دی ساکارید غیر واکنشی ترهالوز هستند که هنگام استرس، آن‌ها را تثبیت می‌کند. به‌عنوان مثال ترهالوز باعث تثبیت پروتئین‌ها در سلول‌های ساکارومایسز سرویزیه در هنگام شوک گرمایی می‌شود. این به میگوهای شور (گونه‌های آرتمیا) کمک می‌کند تا در کمبود شدید آب زنده بمانند. خصوصیات قابل توجه ترهالوز منجر به بررسی کاربرد آن در تولید واکسن‌های پودر شده و داروهایی شده است که نیازی به یخچال ندارند. با این قندها و سایر قندهای پایدار، محققان توانسته‌اند واکسن‌ها و داروهای مایع را کم آب کرده و تا چند ماه در دمای اتاق بدون اینکه بر قدرت آن‌ها تأثیر بگذارد، ذخیره کنند. دستگاه‌های تزریق همراه برای واکسن‌های خشک، تولید شده است. برخی از آن‌ها بازسازی ماده خشک شده را به مایع، درست قبل از تزریق انجام می‌دهند؛ درحالی‌که برخی دیگر این ماده را با استفاده از سوزن یا جت گاز پرسرعت به‌صورت پودر وارد بدن می‌کنند.

دارورسانی همچنین می‌تواند با استفاده از فناوری‌های جدید که تعداد دوره‌ای موردنیاز برای درمان را کاهش می‌دهد، بهبود یابد. رعایت رژیم‌های دارویی طولانی و پیچیده دشوار است؛ به‌ویژه اگر شامل مراجعه به مراکز درمانی باشد. هنگامی که بیماران نتوانند درمان‌های خود را به پایان برسانند، نه تنها بهبود نمی‌یابند، بلکه درمان جزئی می‌تواند منجر به ظهور سویه‌های بیماری مقاوم به دارو شود. داروها و واکسن‌های با کنترل آزاد می‌توانند همراه با یک پلیمر قابل تجزیه زیستی وارد بدن شوند که با تجزیه توسط بدن، محتوای آن را به تدریج آزاد می‌کند. محققان اخیراً از توسعه موفقیت‌آمیز فرمولاسیون آزاد کنترل‌شده پایدار در دمای اتاق از مشتقات استر الیگوساکارید<sup>1</sup> (OED) ترهالوز و آنالوگ پپتید مصنوعی آنتی‌ژن سطح هیاتیت B خبر داده‌اند. یک نمونه شامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است که به سرعت در حال مقاومت به دارو است؛ زیرا بسیاری از بیماران، رژیم چندین ماهه آنتی‌بیوتیکی را کامل نمی‌کنند. بیماری سل مقاوم به چند دارو نیز در چندین کشور پیشرفته در حال تبدیل شدن به یک مشکل است. درمان‌های آنتی‌بیوتیکی با رهایش مداوم، که به‌طور خودکار محتوای آن‌ها را آزاد می‌کند، تعداد دوزهایی را که بیمار باید دریافت کند کاهش می‌دهد؛ در نتیجه میزان مطابقت را افزایش می‌دهد و ظهور سویه‌های مقاوم به دارو را محدود می‌کند. مطالعات مقدماتی در مورد آنتی‌بیوتیک‌های با کنترل، امیدوارکننده بوده‌اند.

---

<sup>1</sup> oligosaccharide ester derivatives

جدول ۱: انواع واکسن‌های تهیه‌شده به‌وسیله روش‌های مهندسی ژنتیک

| واکسن                                       | تاریخ |
|---------------------------------------------|-------|
| OspA واکسن بیماری لایم                      | ۱۹۸۶  |
| آنتی‌ژن سطحی نوترکیب هپاتیت B               | ۱۹۹۳  |
| توکسین B نوترکیب کلرا                       | ۱۹۹۸  |
| پاپیلوما ویروس انسانی نوترکیب (چهار ظرفیتی) | ۲۰۰۶  |
| پاپیلوما ویروس انسانی نوترکیب (دو ظرفیتی)   | ۲۰۰۹  |
| پروتئین‌های گروه B مننژیت                   | ۲۰۱۳  |

#### ۴-۲-۲- واکسن‌های درمانی:

واکسن‌ها را می‌توان به دودسته کلی تقسیم نمود: واکسن‌های کلاسیک و واکسن‌های مدرن؛ که هریک از آن‌ها

طبق جدول ۲ در زیرگروه‌های مختلف طبقه‌بندی شده‌اند.

جدول ۲. طبقه‌بندی انواع واکسن‌ها

| تکنولوژی | نوع                     | زنده/غیرزنده | ویژگی‌ها                                                     |
|----------|-------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------|
| کلاسیک   | واکسن زنده تضعیف‌شده    | زنده         | باکتری یا ویروس تضعیف‌شده در محیط کشت                        |
|          | واکسن غیرفعال           | غیرزنده      | ویروس یا باکتری غیرفعال شده به وسیله حرارت و یا مواد شیمیایی |
|          | واکسن زیر واحدی         | غیرزنده      | تهیه‌شده از اجزای ایجادکننده ایمنی محافظتی                   |
| مدرن     | واکسن زنده دست ورزی شده | زنده         | ویروس یا باکتری زنده تضعیف‌شده با حذف ژن‌های عامل بیماری‌زا  |

|                                       |         |                                                                    |
|---------------------------------------|---------|--------------------------------------------------------------------|
| واکسن زنده وکتوری <sup>۱</sup>        | زنده    | ویروس یا باکتری زنده بیان‌کننده<br>ایمونوژن خارجی (هترولوگ)        |
| واکسن زیر واحدی نو ترکیب <sup>۲</sup> | غیرزنده | شامل توکسین‌ها، پروتئین‌ها یا پپتیدهای<br>تولیدشده به روش نو ترکیب |
| واکسن‌های پپتیدی یا پروتئینی          | غیرزنده | شامل پپتید یا اپی‌توپ‌های پپتیدی<br>سنتزی                          |
| واکسن‌های اسید نوکلئیکی               | غیرزنده | شامل توالی DNA یا mRNA کد کننده<br>آنتی‌ژن                         |

واکسن‌های کلاسیک:

واکسن‌های کلاسیک واکسن‌هایی هستند که از ویروس‌ها و باکتری‌ها مشتق می‌شوند. سه شکل از این واکسن‌ها

عبارت‌انداز: واکسن‌های زنده ضعیف شده<sup>۳</sup> که شامل ویروس یا باکتری ضعیف شده هستند، واکسن‌های کشته‌شده

<sup>۱</sup> Live Vectored Vaccine

<sup>۲</sup> Recombinant Subunit Vaccine

<sup>۳</sup> Live Attenuated Vaccines

یا غیرفعال<sup>۱</sup> که شامل ویروس‌ها و باکتری‌های کشته‌شده و غیرفعال شده می‌باشند و واکسن‌های زیر واحدی<sup>۲</sup> که شامل یک یا برخی از اجزای ویروس یا باکتری بوده که قادر به ایمنی‌زایی هستند.

واکسن‌های مدرن:

واکسن‌های زنده تغییر ژنتیکی یافته یا دست ورزی شده: این گونه واکسن‌ها شامل ویروس‌ها یا باکتری‌های پاتوژن هستند که ژن‌های بیماری‌زا در آن‌ها حذف‌شده، بنابراین ضعیف شده هستند. برای اینکه احتمال برگشت به حالت پاتوژن وجود نداشته باشد، در چندین ژن مسیرهای مختلف بیماری‌زایی پاتوژن، حذف صورت می‌گیرد. بدین منظور ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی پاتوژن و آنتی‌ژن‌های دخیل در ایجاد ایمنی محافظتی باید به‌خوبی شناخته‌شده باشند و حذف ژن‌های بیماری‌زا به‌گونه‌ای باشد که باعث از بین رفتن ایمنی‌زایی نگردد. بهترین مثال در این زمینه واکسن خوراکی کلرا (وبا) است. ابتدا جهش‌یافته‌ای از کلرا انتخاب شد. سپس قسمتی از توکسین کلرا که مسئول بیماری‌زایی بود، با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک تغییر یافت تا توکسین به شکل غیرفعال (توکسوئید) بیان شود. سویه به‌دست‌آمده CVD103 نامیده شد.

---

<sup>1</sup> Killed or Inactivated Vaccines

<sup>2</sup> Subunit Vaccines

این گونه واکسن‌ها همانند واکسن‌های زنده ضعیف شده کلاسیک، قدرت ایمنی‌زایی مناسبی دارند و قادرند پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را به‌خوبی تحریک نمایند. اما همانند واکسن‌های زنده ضعیف شده کلاسیک، مهم‌ترین نگرانی در مورد آن‌ها ایمن بودن آن‌هاست.

واکسن‌های زنده حامل<sup>۱</sup> در این واکسن‌ها از ارگانیسم‌های تضعیف‌شده و غیر بیماری‌زا به‌عنوان حامل استفاده می‌شود تا آنتی‌ژن ایجادکننده ایمنی مربوط به پاتوژن موردنظر را بیان کنند. هم باکتری‌ها و هم ویروس‌ها را می‌توان بدین منظور بکار برد. در جدول ۳ به برخی از وکتورهای زنده اشاره شده است.

جدول ۳. انواع واکسن‌های زنده حامل

| وکتور         | منشأ آنتی‌ژن هترولوگ                                                              | مزایا                                                                      | معایب                                                                        |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ویروسی</b> |                                                                                   |                                                                            |                                                                              |
| واکسینیا      | RSV, HIV, VSV, rabies virus, virus, EBV, HSV, influenza Plasmodium spp. (malaria) | ایمن بودن (عدم ایجاد بیماری، غیر سمی بودن)، توانایی پذیرش DNA تا حدود 41kb | عوارض جانبی بالا در برخی موارد، محدودیت استفاده مکرر به دلیل ایمنی‌زایی بالا |

<sup>1</sup> Live Vectored Vaccines



|                |                                                                                                                        |                                                      |                                                                                                   |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| آوی پاکس ویروس | Rabies virus, measles virus                                                                                            | نقص در همانندسازی،<br>ایمنی‌زایی پایین بر علیه وکتور | پاسخ ایمنی نسبت به<br>واکسینیا ضعیف تر است                                                        |
| پولیو ویروس    | Vibrio cholerae, influenza<br>Chlamydia virus, HIV,                                                                    | ایمن بودن، قابل استفاده به صورت<br>خوراکی            | داشتن ژنوم کوچک                                                                                   |
| آدنو ویروس     | RSV, HBV, EBV, HIV, CMV                                                                                                | قابل استفاده به صورت خوراکی                          | داشتن ژنوم کوچک                                                                                   |
| هرپس ویروس     | EBV, HBV                                                                                                               | داشتن ژنوم بزرگ                                      | عوارض جانبی زیاد<br>مانند ایجاد سمیت، بیان<br>موقت ژن واکسن، سطح<br>بالای ایمنی پیشین با<br>ویروس |
| باکتریایی      |                                                                                                                        |                                                      |                                                                                                   |
| سالمونلاها     | B. pertussis, HBV,<br>Plasmodium spp.,<br>E. coli, influenza virus,<br>Streptococci, Vibrio cholerae,<br>Shigella spp. | ایجاد پاسخ قوی موکوسی                                | امکان بازگشت به حالت<br>بیماری زایی اولیه، سابقه<br>ی ایمنی با باکتری منجر به                     |

|                                                                                                                             |                                             |                                            |              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------|
| کاهش تاثیر واکسن، امکان<br>ناپایداری ژنومی                                                                                  |                                             |                                            |              |
| امکان بازگشت به حالت<br>بیماری زایی اولیه، سابقه<br>ی ایمنی با باکتری منجر به<br>کاهش تاثیر واکسن، امکان<br>ناپایداری ژنومی | ایمن بودن، توانایی پذیرش<br>DNA با طول زیاد | Borrelia burgdorferi (Lyme<br>disease)     | مایکوباکتریا |
| امکان بازگشت به حالت<br>بیماری زایی اولیه، سابقه<br>ی ایمنی با باکتری منجر به<br>کاهش تاثیر واکسن، امکان<br>ناپایداری ژنومی | تولید ارزان تر                              | Bordetella pertussis; Shigella<br>flexneri | اشریشیا کولی |

واکسن‌های زنده حامل با استفاده از تکنولوژی DNA نو ترکیب به وجود می‌آیند که در آن‌ها یک یا چندین ژن از وکتور (میکروارگانسیم میزبان) با یک یا چندین ژن بیان‌کننده ایمنی محافظتی از پاتوژن موردنظر جایگزین می‌شود. در چنین حالتی بیان پایدار و بالایی از آنتی‌ژن به وجود می‌آید. در بین ویروس‌ها، بیشتر از همه ویروس واکسینیا<sup>1</sup> و به‌عنوان وکتور مورد استفاده قرار گرفته است.

واکسن‌های پروتئینی انواعی از واکسن‌ها می‌باشند که در آنها پروتئین‌های عامل بیماری‌زا به عنوان عامل ایمنی زایی تولید و به صورت مستقل از خود عامل بیماری‌زا تزریق می‌گردند. این پروتئین‌ها عموماً از میان مهمترین پروتئین‌های بیماری‌زایی انتخاب شده و کل پروتئین و یا بخشی از آن که بیشترین اهمیت ایمنی زایی دارد تولید و به صورت واکسن فرموله می‌شود. اولین نمونه از این نوع واکسن‌ها را می‌توان واکسن هپاتیت B در نظر گرفت که حاوی یکی از آنتی‌ژن‌های سطحی این ویروس بود. در مقابل، واکسن‌های پپتیدی یک استراتژی جایگزین جذاب هستند که با استفاده از قطعات کوتاه پپتیدی برای مهندسی القای پاسخ‌های ایمنی بسیار هدفمند طراحی می‌گردند. نتیجه استفاده از این نوع واکسن‌ها اجتناب از توالی‌های آلرژی‌زا و یا واکنش‌زا می‌باشد. با این وجود، واکسن‌های پپتیدی که بدون حامل مورد استفاده قرار می‌گیرند، اغلب دارای ایمنی زایی ضعیفی هستند و به همین دلیل اغلب برای ایمنی زایی مناسب نیاز به حامل اختصاصی دارند.

---

<sup>1</sup> Vaccina Virus

واکسن‌های بر پایه اسیدهای نوکلئیک: یکی از کاربردهای تکنولوژی DNA نو ترکیب، معرفی و ایجاد واکسن‌های اسید نوکلئیکی بوده است. در این نوع واکسن‌ها توالی DNA یا mRNA کد کننده پروتئین ایمنونوژن با کلون شدن در یک پلاسمید به فرد گیرنده واکسن تجویز می‌شود. این توالی در سلول‌های فرد میزبان به پروتئین ترجمه شده و باعث ایمنی‌زایی می‌شود. راه انتقال عمده در تجویز این نوع واکسن‌ها، تزریق داخل عضلانی<sup>۱</sup> (I.M) است. انتخاب عضله به این دلیل است که این سلول‌ها تقسیم نمی‌شوند و لذا احتمال رقیق شدن واکسن و از بین رفتن کارایی آن پائین است. بعد از تزریق واکسن، پروتئین در سطح سلول‌های میزبان بیان می‌شود و منجر به تحریک پاسخ ایمنی می‌شود. بیان پروتئین در سطح این سلول‌ها تا یک سال هم می‌تواند پایدار باشد. علاوه بر مسیر داخل عضلانی، این واکسن‌ها به صورت داخل جلدی<sup>۲</sup> (I.D)، زیر جلدی<sup>۳</sup> (S.C) و استنشاقی نیز تجویز می‌شوند. زمانی که این واکسن‌ها به صورت کوت شده بر سطح نانوذرات طلا به پوست تزریق می‌شوند، کار آیی تا ۱۰۰۰ برابر در مقایسه با روش تزریق داخل عضلانی افزایش می‌یابد. این واکسن‌ها دارای مزایا و معایبی هستند که در جدول ۴ آورده شده است. مزیت واکسن‌های DNA نسبت به واکسن‌های mRNA این است که پایدار هستند. در نقطه مقابل، واکسن‌های mRNA خطر ادغام شدن در ژنوم میزبان را ندارند.

جدول ۴: مزایا و معایب واکسن‌های اسید نوکلئیکی

---

<sup>1</sup> Intramuscular (I.M)

<sup>2</sup> Intradermal (I.D)

<sup>3</sup> Subcutaneous (S.C)

| مزایا                                                           | معایب                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| خود نوکلئیک اسید بکار رفته خاصیت ایمنی‌زایی ذاتی پائینی دارد.   | اثرات مربوط به بیان بلندمدت آن به‌خوبی مشخص نشده است. |
| تحریک و القاء طولانی‌مدت پاسخ ایمنی                             | احتمال تحریک آنتی‌بادی علیه اسیدنوکلئیک وجود دارد.    |
| تحریک هر دو نوع پاسخ سلولی و هومورال                            | محدود به آنتی‌ژن‌های پپتیدی و پروتئینی است.           |
| امکان ساخت ساختارهایی که چندین اپی‌توپ را به‌طور هم‌زمان دارند. | احتمال وارد شدن توالی DNA به ژنوم میزبان وجود دارد.   |
| تولید آن در مقادیر زیاد نسبتاً راحت صورت می‌گیرد.               | انتقال آن به بدن به‌خوبی صورت نمی‌گیرد.               |
| پایداری در برابر حرارت                                          |                                                       |

#### ۴-۳- آنتی‌بادی‌های منوکلونال:

طبق بررسی‌های صورت گرفته در خصوص فروش محصولات دارویی زیست فناوری، بیشترین فروش محصولات مربوط به گروه‌های دارویی فاکتور رشد، آنتی‌بادی‌های منوکلونال و هورمون‌های نوترکیب بوده است. در این بین آنتی‌بادی‌های منوکلونال بیش از ۹۵٪ کل فروش فرآورده‌های زیست فناوری را به خود اختصاص داده‌اند.

آنتی‌بادی‌ها پروتئین‌های بزرگ Y شکل به نام ایمونوگلوبولین‌ها هستند که توسط سلول‌های B به عنوان بخشی از پاسخ ایمنی تطبیقی در هنگام مواجهه با یک مولکول خارجی تولید می‌شوند. با توجه به میل قوی یک آنتی‌بادی به یک توالی خاص یا همان بخش اپی‌توپ (معمولاً به طول ۴-۶ اسید آمینه) یک آنتی‌ژن، آنها به طور گسترده در تحقیقات برای شناسایی و تشخیص پروتئین‌های مورد علاقه در کاربردهای مختلف استفاده می‌شوند. از بین ایزوتیپ‌های آنتی‌بادی موجود، IgG بیشتر برای تحقیقات استفاده می‌شود. برای پاسخ به نیازهای تحقیقاتی مختلف، دو نوع آنتی‌بادی در دسترس دانشمندان وجود دارد: پلی‌کلونال و منوکلونال. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال حاوی مخلوط ناهمگون از IgG‌ها علیه کل آنتی‌ژن هستند، در حالی که آنتی‌بادی‌های منوکلونال از یک IgG در برابر یک اپی‌توپ اختصاصی تشکیل شده‌اند. مخلوط آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال از آنتی‌بادی‌هایی تشکیل شده‌اند که مختص تعداد زیادی از اپی‌توپ‌های مختلف موجود بر روی آنتی‌ژن‌ها (حتی آنتی‌ژن‌های ساده) هستند. زیرجمعیت‌هایی از آنتی‌بادی‌ها با تمایل اتصال متفاوت حتی در زیرمجموعه‌ای که مختص یک اپی‌توپ است وجود دارد. با توجه به واکنش متقاطع آنتی‌بادی‌ها و نیاز به سنجش‌های قابل کنترل تر، گاهی اوقات داشتن یک آنتی‌بادی همگن که مخصوص یک اپی‌توپ منفرد و با میل ترکیبی بالا است، مزیت

زیادی دارد. در سال ۱۹۷۵ جورج کوهلر و سزار میلشتاین روشی را برای ساخت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ابداع کردند (یعنی همه آنتی‌بادی‌ها از یک سلول پلاسما پیش‌ساز منفرد گرفته می‌شوند به طوری که همه آنتی‌بادی‌ها یکسان هستند؛ MAb<sup>۱</sup>). روش‌های مهندسی ژنتیک اکنون امکان تولید آسان و سریع آنتی‌بادی‌های مونوکلونال را با تعویض توالی‌های انسانی با کاربرد پروتئین همولوگ فراهم می‌کنند. این آنتی‌بادی‌های مونوکلونال امروزه یکی از مهم‌ترین داروهای زیستی در درمان هدفمند بسیاری از بیماری‌ها همچون سرطان به شمار می‌روند. وجود بیش از ۵۰ آنتی‌بادی مونوکلونال درمانی که دارای مجوز سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA<sup>۲</sup>) می‌باشند و چندین مورد دیگری که در حال گذراندن تست‌های بالینی هستند نشان دهنده ی نقش مهم این مولکول‌ها در درمان بیماری‌ها می‌باشد. توانایی بالای این آنتی‌بادی‌ها در شناسایی اپی‌توپ اختصاصی و با تمایل اتصال بالا، امکان کاربرد گسترده آنها در درمان بیماری‌ها را فراهم آورده است. همچنین به دلیل سازمان‌دهی آنها به دومین‌های مجزای ساختاری و عملکردی پایداری و امکان مهندسی نمودن آنها وجود دارد. بر اساس اختلافات ساختمانی پنج کلاس از آنتی‌بادی‌ها وجود دارد که از بین آنها، IgG فراوان‌ترین ایمونوگلوبین در خون بوده و نیمه‌عمر بالایی دارد و در زیست فناوری کاربرد زیادی دارد. از نظر عملکرد، آنتی‌بادی‌ها به دو بخش متصل شونده به آنتی‌ژن (Fab) و یک منطقه ثابت (Fc) تقسیم می‌شود که از طریق یک لولای انعطاف پذیر به هم متصل هستند. دومین‌های VL و VH در بخش انتهای آمینه Fab به آنتی‌ژن‌ها متصل می‌شوند. درون هر دومین سه ناحیه وجود دارد که

---

<sup>۱</sup> Monoclonal anti-body

<sup>۲</sup> Food and Drug administration

سکانس‌های بسیار متغیری دارند و لوپ‌هایی را در انتهای صفحات بتا تشکیل می‌دهد. این لوپ‌ها مناطق بسیار متغیر<sup>۱</sup> (CDR) هستند و مسئول شناسایی‌اند. بقیه آمینواسیدهای ناحیه V به‌عنوان چهارچوبی برای حمایت از لوپ‌ها عمل می‌کنند. بخش Fc آنتی‌بادی عملکردهای اجرایی لیز سلولی با واسطه آنتی‌بادی<sup>۲</sup> (ADCC) و لیز سلولی با واسطه کمپلمان<sup>۳</sup> (CDC) را میانجی‌گری می‌کند.

قبل از توسعه فناوری هیبریدوما، محققان برای آزمایش‌هایی که شامل شناسایی و تعیین کمیت پروتئین‌های خاص مورد علاقه در محیط‌های پیچیده بیولوژیکی بود، بر آنتی‌بادی‌های پلی کلونال تکیه می‌کردند. در حالی که آنتی‌بادی‌های پلی کلونال مجموعه‌ای از مزایای خود را ارائه می‌کردند، به دلیل تفاوت خصوصیات آنها در بسته‌های تولیدی مختلف و سطوح بالای واکنش پس‌زمینه‌ای، نمی‌توان از آنها برای آزمایش‌های درون تنی یا درمانی استفاده کرد. زمانی که کوهرلر و میلشتاین از هیبریدوم‌ها برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده کردند، در سال ۱۹۷۵ بود که دنیای آنتی‌بادی‌ها و تحقیقات علمی درون تنی برای اولین بار تلاقی کردند. معرفی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به تحقیقات درون تنی منجر به برخی از بزرگترین دستاوردهای علمی قرن ۲۱ شد، از جمله تشخیص درون تنی، درمان‌های بر پایه ی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و ترکیب آنتی‌بادی-دارو. در حالی که فناوری‌های دیگری مانند کتابخانه‌های نمایشگر از آن زمان برای کشف آنتی‌بادی‌های مونوکلونال توسعه یافته‌اند، فناوری هیبریدوما پلتفرم اولیه کشفی است که توسط دانشمندان ترجیح داده می‌شود.

---

<sup>1</sup> Complementary Determining Region

<sup>2</sup> Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity

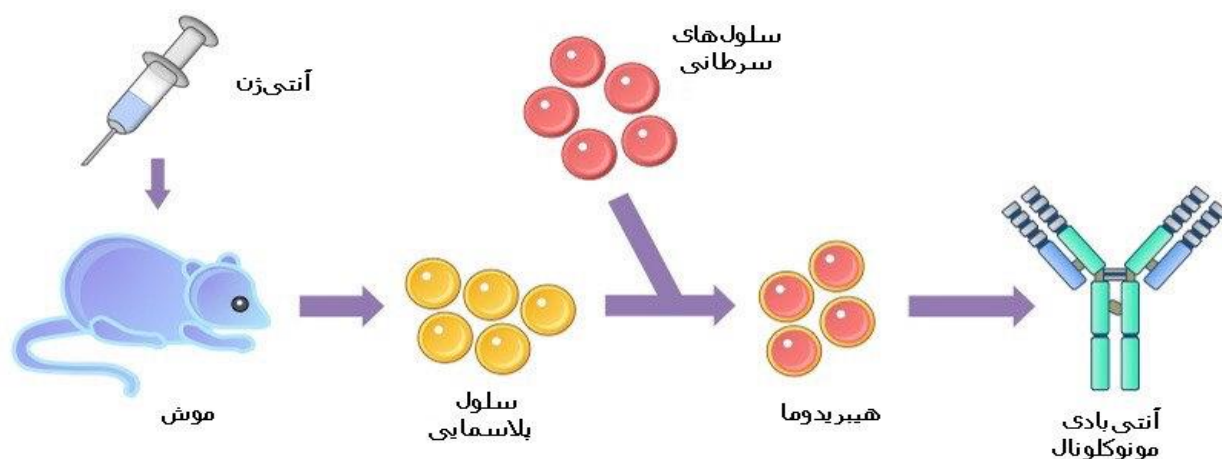
<sup>3</sup> Complement-Dependent Cytotoxicity



هیبریدوم ها سلول هایی هستند که از طریق همجوشی بین یک سلول B تولید کننده آنتی بادی با عمر کوتاه و یک سلول میلوم نامیرا تشکیل می شوند. هر هیبریدوم به طور اساسی مقدار زیادی از یک مولکول آنتی بادی خاص را بیان می کند، و رده های سلولی هیبریدوم مطلوب را می توان برای تولید طولانی مدت آنتی بادی مونوکلونال در حالت انجماد حفظ کرد. در نتیجه، محققان معمولاً تولید هیبریدوم ها را بر سایر روش های تولید آنتی بادی های مونوکلونال ترجیح می دهند تا بتوانند منبع راحت و بی پایان آنتی بادی های مونوکلونال مهم را حفظ کنند.

تولید هیبریدوم یک فرآیند پنج مرحله ای است که از توانایی طبیعی حیوان میزبان برای تولید آنتی بادی های مونوکلونال کاربردی، بسیار خاص و با میل ترکیبی بالا بهره می برد. به طور خلاصه، مرحله اول شامل توسعه و بهینه سازی یک آنتی ژن ایمنی زا است. در مرحله بعد، حیوان میزبان با آنتی ژن ایمن سازی می شود تا یک پاسخ ایمنی ایجاد کند و فرآیند بلوغ سلول B را آغاز کند. مرحله سوم شامل جداسازی این سلول های B از طحال حیوان میزبان و ادغام آنها با سلول های میلوما برای تولید هیبریدوم است. همانطور که بالا توضیح داده شد، بافت طحال که مملو از لنفوسیت های B است از موش استخراج شده و لنفوسیت های B جدا شده با سلول های میلوم ادغام می شوند. باوجودی که بسیاری از سلول ها در محیط کشت قادر به ادغام شدن و تکثیر هستند، تنها میزان بسیار کمی از آنها (سلول های هیبریدی تولید کننده پادتن) قادر به بقا هستند. روش تشخیص سلول های هیبریدی از سلول های دیگر به این صورت است که به محیط کشت هیپوکسانتین، آمینوپترین و تیمیدین (HAT) افزوده

می‌شود. این محیط تنها امکان تکثیر سلول های هیبریدی را فراهم می آورد. در مرحله چهارم، هیبریدوم های تولید شده تحت چندین دور غربالگری و انتخاب قرار می گیرند تا هیبریدوم هایی که بهترین آنتی بادی های مونوکلونال را تولید می کنند (دارای بیشترین میزان تمایل اتصال و بیشترین میزان اختصاصیت) برای کاربرد مورد نظر شناسایی کنند. پنجمین و آخرین مرحله، تقویت این هیبریدوم های خاص و به دنبال آن خالص سازی آنتی بادی های مونوکلونال است (شکل ۴).



شکل ۴. مراحل تولید آنتی بادی مونوکلونال به روش هیبریدوما.

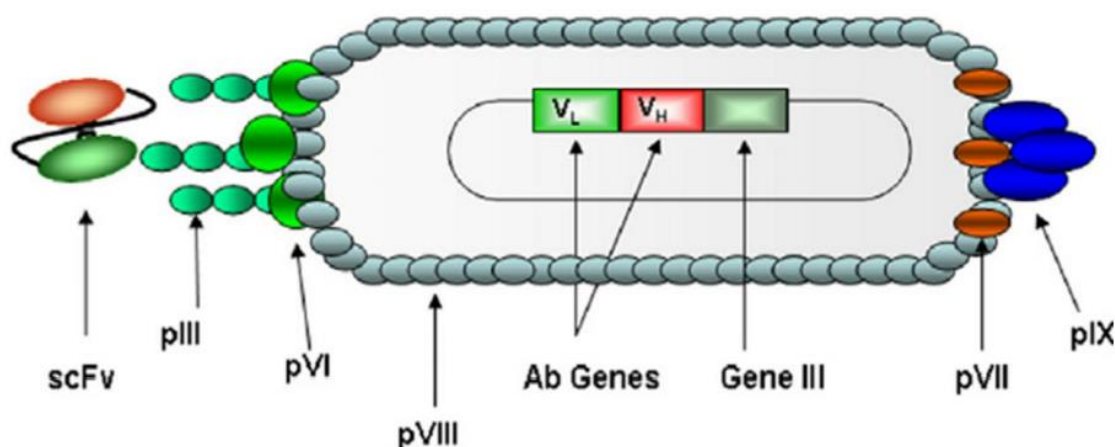
تولید آنتی بادی مونوکلونال با روش نمایش فاژی:

روش نمایش فاژ برای اولین بار توسط G. P. Smith و همکاران در سال ۱۹۸۵ برای بیان آنتی ژن های کلون شده روی سطح ویروسی تعریف شد. این روش یک فناوری ترکیبی است که توجه زیادی را برای آینده کشف دارو به خود جلب کرده است. به غیر از نمایش فاژ، تکنیک های مختلف نمایش مولکولی نیز می توانند در کشف پپتید

به کار روند، از جمله نمایش مخمر و باکتری، نمایش ریبوزوم، نمایش mRNA و نمایش آنتی بادی کووالانسی. در روش نمایش فاز، پروتئین پوششی فاز برای بیان توالی تصادفی پپتیدها یا آنتی بادی ها بر روی سطح فاز مهندسی می شود. بدین معنی که تنوع بسیار بالایی از پپتیدهایی که دارای توالی تصادفی هستند تولید می شوند و این تنوع توسط پروتئین پوششی فاز در سطح فاز بیان شده و نمایش داده می شود. پس از آن، کتابخانه فاز بر روی هدف مورد نظر از نظر اتصال هدف به لیگاند آزمایش می شود. در این برهم کنش، لیگاند همان پپتیدهای تصادفی تولید شده هستند که امکان برهم کنش با یک هدف خاص را خواهند داشت. بدین صورت که مولکول هدف را در معرض کتابخانه فاز نمایش دهنده ی پپتید ها قرار می دهند و پپتیدهایی که توانایی اتصال به هدف را دارند به روش مولکولی از میان کتابخانه غربال گری می شوند. این روش یک ابزار قوی در کشف دارو عمدتاً برای شناسایی داروی پپتیدی و نیز کشف آنتی بادی های دارای تمایل اتصال بالا به یک لیگاند خاص است. روش نمایش فاز محققان را قادر می سازد تا کتابخانه هایی بسازند و به سرعت اهداف مولکولی خاص را جدا کرده و شناسایی کنند. علاوه بر این، این تکنیک شناسایی لیگاند برای گیرنده ها، کشف مسدودکننده آنزیم، برهم کنش های پروتئین/DNA-پروتئین، غربالگری بیان cDNA، نقشه برداری اپی توپ آنتی بادی، مهندسی آنتی بادی و طراحی واکسن را تسهیل می کند. نمایش فاز دارای چندین مزیت نسبت به تکنیک های غربالگری سنتی است که با توجه به سهولت استفاده، مقرون به صرفه بودن، چابکی و مهمتر از آن توانایی غربالگری با کارایی بالا انواع پپتید یک روش مورد ترجیح زیست شناسان می باشد. در نمایش فاز، پس از اتصال فاز به هدف، فازهای انتخابی شسته شده

و DNA فاژ برای شناسایی توالی یابی می شود. پس از آن، لیگاندهای انتخاب شده را می توان به صورت ساختاری تجزیه و تحلیل کرد تا ویژگی های تعامل گیرنده-لیگاند را مشخص کرد.

قطعات آنتی بادی کامل انسانی نیز می توانند در سطح فاژها بیان شوند. سپس، طی یک فرآیند غربالگری، فاژهایی که پپتید با تمایل اتصال قوی تر به لیگاند خاص دارند، گزینش و تکثیر می شود. قبل از توسعه تکنیک نمایش فاژی، تحریک سیستم ایمنی و تکنولوژی هیبریدومای موشی تنها روش های در دسترس جهت تولید آنتی بادی های مونوکلونال جدید با کاربردهای تشخیصی و درمانی بودند. زمانی که آنتی ژن موردنظر توکسیک باشد و یا آنتی ژن خودی بوده و نتوان در موش سیستم ایمنی را تحریک نمود، تکنولوژی هیبریدوما مفید نخواهد بود. در حال حاضر با توسعه تکنیک نمایش فاژی به عنوان یک استراتژی گزینش آزمایشگاهی آنتی بادی ها، که مستقل از نوع آنتی ژن عمل می کند، محدودیت های روش های قبلی مانند تکنولوژی هیبریدوما از بین رفته است. (شکل ۵).



شکل ۵. ScFv نمایش داده شده بر روی فاز. ScFv به صورت متصل به پروتئین پوششی PIII در سطح فاز نمایش داده می شود. فاز توان آلوده کردن باکتری E.coli را از طریق اتصال PIII به پیلی F باکتری را حفظ کرده است.

#### ۴-۳-۱- استفاده های رایج تشخیصی و درمانی آنتی بادی های منوکلونال:

استفاده های تشخیصی:

- الف) ایمنواسی ها (Immunoassays): به تست هایی که در آن ها ماده ای در مایع تحت آزمایش با استفاده از آنتی بادی های نشا ندار شده ردیابی و یا اندازه گیری شود ایمنواسی می گویند.
- ب) ایمنوسیتوشیمی: یک روش آزمایشگاهی که از آنتی بادی ها برای بررسی آنتی ژن های خاص (مارکرها) در نمونه ای از سلول ها استفاده می کند. آنتی بادی ها معمولاً به یک آنزیم یا یک رنگ فلورسنت متصل هستند.
- ج) فلوسیتومتری: فلوسایتومتری روشی است که برای شناسایی و اندازه گیری ویژگی های فیزیکی و شیمیایی جمعیتی از سلول ها یا ذرات استفاده می شود. در این فرآیند، نمونه ای حاوی سلول یا ذرات در یک مایع معلق می شود و به دستگاه فلوسایتومتر تزریق می شود. یک یا چند آنتی بادی نشان دار شده با مواد مولد فلورسانس که به طور اختصاصی قادر به اتصال به اهداف خاص هستند، عامل شناسایی سلول ها و یا ذرات می باشند.

د) تشخیص: in-vivo: آزمایش‌های تشخیصی in vivo به ابزارها و تجهیزات تشخیصی تهاجمی‌تر اشاره دارد که معمولاً برای تصویربرداری یا نظارت بر اهداف درون بدن استفاده می‌شود، برخلاف آزمایش‌های in vitro که در خارج از بدن و بر روی نمونه‌های گرفته‌شده از افراد انجام می‌شود. در این روش آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مختلفی که قادر به شناسایی آنتی‌ژن اختصاصی بافت بیمار هستند به کار برده می‌شوند. معمولاً آنتی‌ژن‌های مورد شناسایی اشکال تغییریافته آنتی‌ژن طبیعی بوده و یا آنتی‌ژن‌هایی هستند که در حالت طبیعی در سطح سلول بیان نمی‌شود.

#### ۴-۳-۲- کاربردهای درمانی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال:

یکی از روش‌های مهم درمان بیماری‌هایی از جمله سرطان، بیماری‌های التهابی مثل آرتریت روماتوئید و انواع دیگر بیماری‌ها استفاده از فراآورده‌هایی است که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با دستگاه ایمنی سروکار دارند. این روش ایمونوتراپی نام دارد. آنتی‌بادی مونوکلونال، رایج‌ترین داروی درمان سرطان به روش ایمونوتراپی محسوب می‌شود. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌توانند به دو صورت نوع برهنه که هیچ داروی دیگر یا ماده رادیواکتیو به آن نچسبیده و نوع کونژوگه که به یک داروی شیمی‌درمانی، توکسین (سم) یا ماده رادیواکتیو چسبیده است برای اهداف درمان سرطان به کار روند. با شناخت بیشتر آنتی‌بادی‌ها و معایب آنها، امروزه برای جلوگیری از ایمنی‌زا بودن استفاده از آنتی‌بادی‌های موشی به عنوان دارو، قسمت‌های آنتی‌بادی‌های موشی را با قسمت مشابه

انسانی جایگزین می کنند که آنتی بادی هایی که به این شیوه به دست می آیند را آنتی بادی های مونوکلونال کایمیریک یا انسانی می نامند.

طبق گزارش های موجود بیش از ۵۰ تا آنتی بادی های مونوکلونال توسط سازمان غذا و دارو تأیید شده است که بیش تر آنها جهت درمان سرطان، بیماری های خود ایمن و التهابی تأیید شده اند. از جمله آنها آنتی بادی Remicade (آنتی بادی علیه  $\alpha$ -TNF)، آنتی بادی Rituxan برای بیماری های خود ایمنی و سرطان لنفوم، Avastin آنتی بادی علیه فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، آنتی بادی Herceptin (آنتی بادی علیه پروتئین محرک رشد)، آنتی بادی Humira (تنها آنتی بادی کامل انسانی علیه TNF)، آنتی بادی Abbottt (برای درمان آرتریت روماتوئید و بیماری کرون)، آنتی بادی Lucentis (علیه ضد فاکتور رشد اندوتلیال عروق) جهت درمان ادم ماکوآلی چشمی، بوده است.

ویژگی هایی که آنتی بادی ها را کاندیدهای دارویی جذابی کرده است اختصاصیت و تمایل بسیار بالا به هدف آنهاست که این موضوع در سرطان ها بیشتر کاربرد دارد. شناسایی آنتی ژن های جدید در سطح سلول های سرطانی، راه کارهای جدیدی را برای درمان سرطان ارائه می دهد. پس از شناسایی این هدف های مولکولی، با تولید آنتی بادی های مونوکلونال علیه آنها می توان سلول های سرطانی را به طور اختصاصی مورد حمله قرار داد .

هنگامی که یک آنتی بادی به عنوان دارو طراحی می شود، همه ویژگی های متفاوت مثل ایمنی زایی، افینیتی (میزان تمایل)، پایداری، عملکرد اجرایی، نیمه عمر، نفوذپذیری و توزیع بافتی باید در نظر گرفته شود و در نتیجه بهینه شود. از دیدگاه ساخت، سهولت تولید هم باید در نظر گرفته شود.

سیستم های مختلفی برای بیان و تولید آنتی بادی نو ترکیب وجود دارد از جمله سیستم های بیانی باکتریایی، سلول های مخمر، سلول های حشرات، قارچ ها و سلول های پستانداران. هر یک از این سیستم ها مزایا و معایبی دارند و انتخاب هر یک از آن ها به نوع آنتی بادی و کاربرد آن بستگی دارد. برای مثال، در سیستم بیانی باکتریایی مثل E.coli تاکنون IgG و قطعات آنتی بادی مختلف فعالی از جمله scFv و Fab و VHH به دلیل ساختار ساده تر و عدم نیاز به تغییرات پس از ترجمه و فرایند گلیکوزیلاسیون تولید شده است. سیستم E.coli یک انتخاب ترجیحی برای تولید قطعات آنتی بادی به صورت نو ترکیب در مقادیر بالا و هزینه کم است و نیز به دلیل وجود پری پلاسما به عنوان یک محیط اکساینده برای شکل گیری صحیح پیوندهای دی سولفیدی موجود در قطعات آنتی بادی، این سیستم به طور گسترده ای برای تولید آنتی بادی های نو ترکیب به کار می رود. در کنار این مزایا سیستم های بیانی باکتریایی محدودیت هایی دارند از جمله عدم امکان انجام تغییرات پس از ترجمه ای مانند گلیکوزیله شدن در تولید آنتی بادی کامل، همچنین تولید آنتی بادی ها به صورت inclusion body است که در واقع تجمعی از آنتی بادی ها می باشد که به صورت نادرست تاخوردگی یافته اند. غالباً تصحیح این تاخوردگی نادرست بسیار پرهزینه می باشد.



امروزه حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد پروتئین‌های درمانی نوترکیب در سلول‌های پستانداران تولید می‌شود. علی‌رغم فراوانی رده سلولی در دسترس، امروزه حدود ۷۰ درصد پروتئین‌های درمانی نوترکیب توسط سلول‌های تخمدان هامستر چینی (CHO) ساخته می‌شوند. ویژگی‌هایی که سلول‌های CHO را به یک رده سلولی مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب انسانی به‌ویژه با کاربردهای بالینی مناسب می‌کند، عبارت‌اند از: توانایی کشت به حالت معلق در تراکم بالا به‌جای حالت چسبیده، قابلیت اصلاحات ژنتیکی به‌گونه‌ای که اجازه ورود و بیان DNA خارجی را داده و به میزان زیادی پروتئین خارجی را بیان کند، قابلیت تولید پروتئین به‌صورت گلیکوزیله، انجام اصلاحات پس از ترجمه‌ای که برای فعالیت زیستی پروتئین لازم است، ایمن بودن سلول‌ها به‌گونه‌ای که هیچ ماده سمی اضافه‌ای به پروتئین تولیدشده نمی‌افزاید. بر اساس موارد گفته‌شده، تجربیات به‌دست‌آمده طی دو دهه و آزمایش‌ها ایمنی سازمان بهداشت جهانی، پروتئین‌های درمانی تولیدشده توسط این رده سلولی را بدون هیچ مشکلی تائید می‌کند. به‌نحوی که امروزه فروش سالانه محصولات تولیدی توسط سلول‌های CHO متجاوز از ۳۰ میلیارد دلار در سرتاسر جهان است. به دلیل ویژگی‌های مناسب رده سلولی CHO از جمله رشد سریع، انتقال راحت و مؤثر ژن به سلول و قابلیت سلول‌ها برای انجام اصلاحات پس از ترجمه امروزه به‌عنوان سیستم غالب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مخصوصاً با کاربردهای درمانی و در حجم وسیع می‌باشد.

اگرچه کشف آنتی‌بادی‌های مونوکلونال انقلابی در تحقیقات بیولوژیکی به وجود آورد، اما استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال محدودیت‌هایی دارد، از جمله این محدودیت‌ها، اندازه بزرگ آنتی‌بادی‌ها، تمایل کم اتصال آن‌ها به

هدف موردنظر، مناسب نبودن نیمه عمر آنتی بادی مورد استفاده و در نهایت ایجاد پاسخ ایمنی در بدن انسان هست.

دانشمندان برای حل این مشکلات از مهندسی آنتی بادی ها کمک می گیرند.

یکی از مهم ترین رسالت های مهندسی آنتی بادی بهینه سازی خصوصیات دومین های متصل شونده به آنتی ژن

است که از جمله آن ها می تواند افزایش افینیتی آنتی بادی به هدف موردنظر باشد. مهندسی آنتی بادی ها برای

افزایش تمایل اتصال به آنتی ژن موضوع مهمی است، چون صرف نظر از اینکه یک آنتی بادی توسط هیبریدوما،

کتابخانه فازی یا سایر تکنولوژی ها ساخته شده باشد، میل ترکیبی آنتی بادی برای هدفش به بهبود نیاز دارد.

افزایش افینیتی موجب افزایش فعالیت بیولوژیکی آنتی بادی و در نتیجه باعث بهبود درمان می شود. علاوه بر این

افزایش تمایل آنتی بادی به هدف موردنظر موجب کاهش مقدار مصرفی آنتی بادی شده، در نتیجه سمیت و هزینه

کمتری برای مصرف کننده دارد.

علاوه بر آن، قدرت یک آنتی بادی به تمایل اتصال آن آنتی بادی بستگی دارد. افینیتی آنتی بادی قدرت اتصال یک

مولکول به مولکول دیگر در یک جایگاه است. یک آنتی بادی با افینیتی بالا سریع تر به لیگاندش متصل خواهد شد

و یا زمان زیادی با لیگاند خودش متصل خواهند ماند یا هر دوی این ویژگی ها را باهم نشان خواهد داد. این

ویژگی ها توسط میزان ثابت های اتصال ( $k_a$  یا  $K_{on}$ ) و تفکیک ( $K_d$  یا  $K_{off}$ ) تعیین می شوند. اتصال بهتر، با بهبود

اثر کلینیکی ارتباط دارد. تحقیقات نشان داده است که افزایش افینیتی آنتی بادی ها با تحویل انتخابی به تومور

همراه بوده است، که احتمال کاربرد آن ها را در درمان تومور افزایش می دهد. در بحث تشخیص نیز افزایش افینیتی،

میزان آنتی‌ژن مورد نیاز برای پاسخ در ایمنواسی را کاهش و حساسیت آزمایش را افزایش می‌دهد. کاربرد آنتی‌بادی‌ها و قطعانشان در تحقیق، تشخیص و درمان موجب افزایش روش‌های بهبود افینیتی و اختصاصیت آنتی‌بادی‌ها شده و تقاضای زیادی برای ایجاد روش‌های کارآمد و موثرتری برای مهندسی واریانت‌های پروتئین به منظور مطالعه عملکردهای بیولوژیکی، ساختاری و ساخت دارو به وجود آورده است.

جهش‌زایی تکنیکی است که در زیست‌شناسی مولکولی برای ایجاد ژن‌ها، پروتئین‌ها و ارگانیسم‌های جهش یافته استفاده می‌شود. دو تکنیک جهش‌زایی اولیه عبارتند از: جهش‌زایی جهت‌دار (SDM)<sup>1</sup> و جهش‌زایی تصادفی و گسترده (REM)<sup>2</sup>. این روش‌ها تا حد زیادی با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام می‌شود. روش‌های دیگری نیز برای انجام جهش‌زایی وجود دارد که شامل فناوری نوین می‌باشد. روش‌های جهش‌زایی به میزان زیادی در فهم ارتباط ساختاری-عملکرد پروتئین و در اصلاح ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن‌ها سهمیم بوده‌اند. مطالعات نشان می‌دهد که اختصاصیت و تمایل آنتی‌بادی می‌تواند با استفاده از جایگزینی اسیدآمینه‌ها در منطقه تماس تغییر کند. از آنجایی که چندین اسیدآمینه مرکزی در اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی مسئول تمایل اتصال به آنتی‌ژن هستند، جایگزین کردن چنین اسیدآمینه‌های کلیدی می‌تواند به‌طور معنی‌داری افینیتی آنتی‌بادی را افزایش دهد. اسیدهای آمینه مؤثر در افینیتی می‌توانند به‌صورت آزمایشگاهی و یا با استفاده از ابزارهای

---

<sup>1</sup> Site Directed Mutagenesis

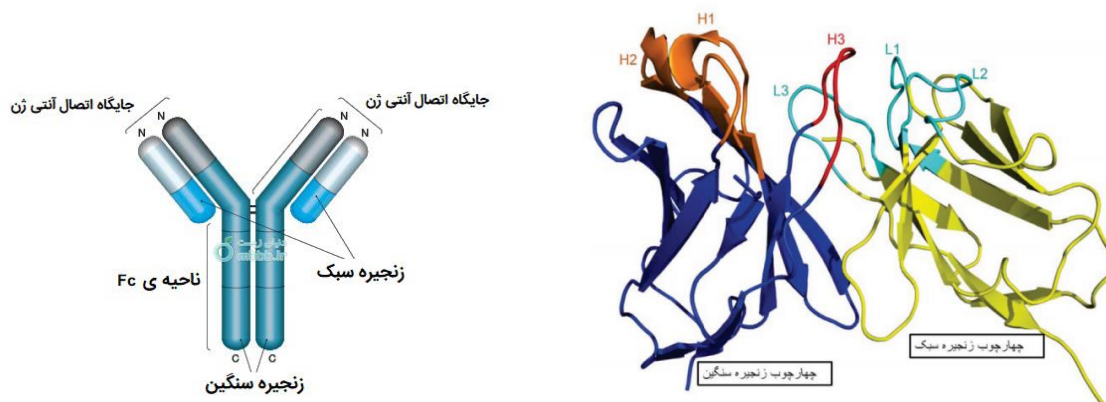
<sup>2</sup> Random-and-extensive mutagenesis

بیوانفورماتیکی تعیین و با اسید آمینه های مؤثرتر جایگزین شوند که در این راستا، رویکردهای بیوانفورماتیکی به کم کردن هزینه های مطالعاتی کمک خواهد کرد.

برای فهم کامل برهم کنش های کمپلکس های پروتئین-پروتئین، باید ارتباط ساختار دو مولکول باهم در سطح اتمی بررسی شود. اگرچه ساختار تعدادی از این کمپلکس ها به صورت آزمایشگاهی با روش کریستالوگرافی اشعه X تعیین شده اند و اطلاعات آن ها در بانک اطلاعاتی پروتئین (PDB) موجود است. ولی ساختار اکثر کمپلکس های شناخته شده موجود نبوده که در این صورت می توان از محاسبات و تکنیک های کامپیوتری برای این منظور استفاده کرد. روش های تئوری و محاسبات کامپیوتری در کنار پیشرفت در روش های آزمایشگاهی باعث تسریع درک ما از برهم کنش مولکول ها خواهد شد. استراتژی داکینگ مولکولی<sup>۱</sup>، که دو یا چند ساختار را به عنوان ورودی در نظر می گیرد و ساختار کمپلکس آن ها را پیش بینی می کند، برای این منظور به کار می رود. داکینگ روشی محاسباتی است که یک مولکول لیگاند را در جایگاه مولکول هدف قرار داده و تمایل به اتصال را تخمین می زند. در روش داکینگ هزاران شکل ممکن برای در کنار هم قرار گرفتن پروتئین و لیگاند بررسی می شود و حالتی که کمترین امتیاز انرژی اتصال را دارد به عنوان بهترین تطبیق و مولکولی با تمایل اتصال بالا پیش بینی می شود .

---

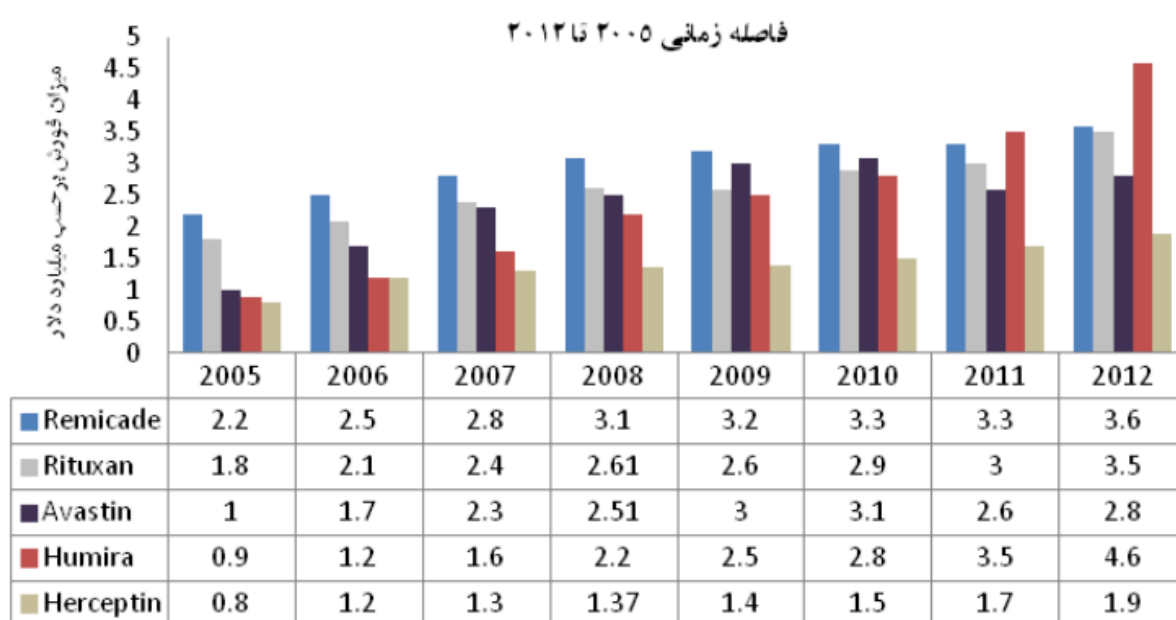
<sup>1</sup> Molecular docking



شکل ۶. ساختار آنتی‌بادی‌ها. شکل سه‌بعدی آنتی‌بادی (سمت راست) و شکل شماتیک (سمت چپ).

یکی دیگر از کاربردهای آنتی‌بادی‌های مونوکلونال این است که می‌توانند به‌عنوان مهارکننده‌های تیروزین کیناز عمل کنند. برای مثال بواسیزومب آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی علیه فاکتور رگ زایی A-بوده و از فعال شدن فاکتور رگ زایی ۱ و ۲ و در نتیجه تقسیم سلولی جلوگیری می‌کند. در یک آزمایش بالینی در فاز ۲، با بررسی ۵۱ بیمار با سرطان مرحله‌ی ۵، که قبلاً تحت پرتودرمانی قرار گرفته بودند تحت درمان با بواسیزومب قرار گرفتند و نتایج نشان داد که در ۱۱ بیمار، بعد از ۱ ماه، پیشرفت بیماری متوقف شد، ۳ بیمار پاسخ جزئی نشان دادند. در این آزمایش در بدن پاسخ ایمنی ایجاد نکرد و سمیت آن پایین بود. در آزمایش فاز ۲ دیگری، اثر درمانی ترکیب بواسیزومب با شیمی‌درمانی بررسی شد. بیماری در ۱۱ درصد بیماران در طی ۲ ماه و ۳۱ درصد بیماران در ۵ ماه به حالت پایدار رسید. مهارکننده‌های تیروزین کیناز محرک پاسخ ایمنی به دارو نبوده، باعث درمان هدفمند شده و سمیت پایینی دارند. این ویژگی‌ها باعث شده استفاده از مهارکننده‌های تیروزین کیناز نسبت به روش‌های معمول مزیت بیشتری داشته باشد.

نوآوری‌هایی مانند پگیله کردن (اضافه کردن پلی اتیلن گلیکول)، گلیکوزیله کردن آنالوگ‌های نوین که باعث افزایش نیمه‌عمر، افزایش اثرگذاری و آسان نمودن روش‌های استفاده گردیده، منجر شده است که سرعت رشد بازار فروش این داروها از روند افزایشی مناسب برخوردار باشد. به‌طور کلی سه عامل هزینه‌های درمانی بالا، فروش قابل توجه و قیمت‌های بالای محصولات به شرکت‌ها کمک می‌کند تا در سال فروش میلیارد دلاری این محصولات را داشته باشند.

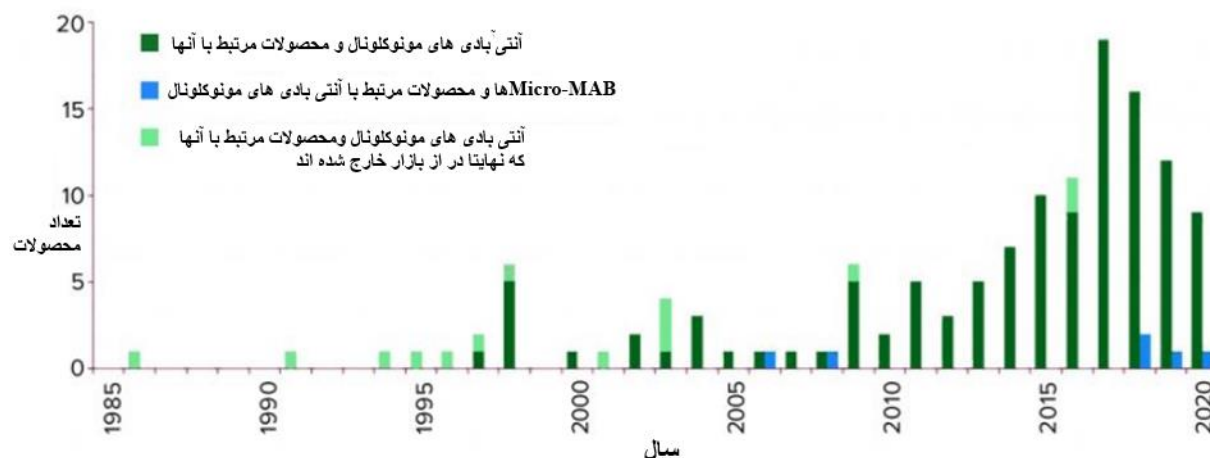


نمودار ۱. میزان فروش ۵ آنتی‌بادی مونوکلونال پرفروش در بازه زمانی ۲۰۰۵ الی ۲۰۱۲.

همان‌طور که نمودار ۱ نشان می‌دهد، تعداد محصولات آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مورد تأیید برای فروش تجاری در ایالات متحده و اروپا به‌طور قابل توجهی رشد کرده است، همان‌طور که در نمودار ۲ نیز نشان داده شده است از

سال ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۴ هر سال سه تا پنج محصول جدید تأیید شده است در حالی که بین سال‌های ۲۰۱۵ تا سال

۲۰۲۰ هر سال حدود ۱۰ الی ۱۹ محصول تأیید شده است.



نمودار ۲. تأییدیه‌های سالانه محصولات آنتی‌بادی مونوکلونال: نشانگرها تعداد آنتی‌بادی‌های مورد تأیید برای

فروش تجاری در ایالات متحده یا اروپا را از سال ۱۹۸۵ تا سال ۲۰۲۰ را هر ساله نشان می‌دهد.

از دیگر محصولات دارویی به‌دست‌آمده از زیست فناوری فاکتورهای رشد، هورمون‌های نو ترکیب، فیوژن پروتئین‌ها،

سایتوکاین‌ها، فاکتورهای خونی و آنزیم‌های نو ترکیب هستند که جز محصولات پر فروش به حساب می‌آید.

## ۵- زیست فناوری در ژن درمانی:

زیست فناوری دارویی شامل استفاده از میکروارگانیسم ها، ارگانیسم های ماکروسکوپی، یا ترکیب بین سلول های تومور (سلول نامیرا) و لکوسیت ها (سلول ایمنی) می باشد که برای ایجاد داروهای جدید، ایجاد نسخه های ایمن تر و مؤثرتر از داروهای تولید شده معمولی و تولید داروهای مقرون به صرفه تر به کار می روند. بزرگترین پتانسیل زیست فناوری دارویی در ژن درمانی نهفته است. ژن درمانی وارد کردن مواد ژنتیکی به سلول ها برای پیشگیری، کنترل یا درمان بیماری است که شامل ترمیم یا جایگزینی ژن های معیوب و مستعدتر کردن تومورها به انواع دیگر درمان ها است. ژن درمانی یکی از کاربردهای زیست فناوری و روش های نوین در جهت دست کاری های ژنومی به منظور تصحیح نقص های ژنتیکی می باشد. در دو دهه گذشته، پیشرفت های قابل توجهی در ژن درمانی انجام گرفته است. از جمله آن ها طراحی وکتور و ناقل هایی باهدف بیان ژن بلندمدت و پایدار می باشد. از کاربردهای دیگر ایجاد روشی دارای اختصاصیت بالا برای تحویل ژن و تنظیم بیان آن ژن ها می باشد.

هدف اصلی از انتقال ژن، مطالعه عملکرد ژن ها و یا محصولات این ژن ها از طریق افزایش یا جلوگیری از بیان ژن خاصی در سلول ها و یا تولید پروتئین های نو ترکیب در سلول های پستانداران می باشد. به این منظور روش های انتقال ژن مختلفی ایجاد شده است که هر یک از آن ها از دستاوردهای مختلفی که بر اساس نوع سلول و هدف مورد استفاده است بهره می گیرند به طور کلی یک روش انتقال ژن ایده آل باید کارایی بالایی در انتقال، سمیت سلولی اندک، تأثیر اندک در شرایط فیزیولوژیک، تسهیل در به کارگیری و قابلیت تولید مجدد را داشته باشد که با توجه به این موارد روش های انتقال ژن به سه روش بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی دسته بندی می شود.



روش فیزیکی:

روش‌های فیزیکی متنوعی جهت انتقال اسید نوکلئیک وجود دارد. این روش‌ها شامل و الکتروپوریشن، تفنگ ژنی میکرواینجکشن می‌باشند. به‌طور خلاصه در میکرواینجکشن اسید نوکلئیک به داخل هسته یا سیتوپلاسم منتقل می‌گردد، که این عمل به مهارت خاصی نیاز دارد زیرا در اغلب موارد باعث آسیب به سلول و مرگ سلولی می‌گردد و در نتیجه یک فرایند حساس و پرزحمت می‌باشد. در روش تفنگ ژنی از ذرات طلا متصل به اسید نوکلئیک استفاده می‌گردد سپس کونژوگه حاصل توسط تفنگ ژنی با شتاب بالا به سمت سلول پرتاب می‌گردد. به‌طور کلی این روش ساده و قابل‌اعتماد است. اما نیاز به ابزار گران قیمت دارد. الکتروپوراسیون یک روش انتقال فیزیکی است که از یک پالس الکتریکی برای ایجاد منافذ موقت در غشای سلولی استفاده می‌کند که از طریق آن موادی مانند اسیدهای نوکلئیک می‌توانند به سلول‌ها منتقل شوند. به سبب سادگی و سرعتی که در اجرای این روش وجود دارد و توانایی بالایی که این روش برای ترانسفکت نمودن تعداد زیادی سلول در مدت‌زمان کوتاه دارد، الکتروپوراسیون یک روش پرکاربرد در انتقال مواد به داخل سلول‌ها می‌باشد.

روش شیمیایی: پایه روش شیمیایی انتقال این است که DNA در محلول فسفات بافر شده به آرامی با کلرید کلسیم مخلوط می‌شود که باعث تشکیل یک رسوب همزمان DNA با فسفات کلسیم می‌شود. رسوب بر روی سلول‌ها می‌نشیند و برخی از ذرات توسط اندوسیتوز جذب می‌شوند. این روش به عنوان نخستین روش انتقال ژن خارجی به سلول‌های پستانداران شناخته می‌شوند. پایه شیمیایی این روش جذب شدن ترکیب اسید نوکلئیک و ماده شیمیایی (که دارای بار مثبت گردیده است) به سمت دیواره سلولی است که دارای بار منفی می‌باشد. اما

مکانیسم دقیق نحوه انتقال کمپلکس ماده شیمیایی با اسید نوکلئیک از دیواره سلولی همچنان نامشخص می‌باشد. در این مورد باور کلی بر این است که در این فرایند آندوسیتوز و فاگوسیتوز دخیل می‌باشند DNA. انتقال یافته جهت بیان می‌بایست وارد هسته سلول شود که در این مورد نیز مکانیسم دقیق دخیل در انتقال مشخص نمی‌باشد. کارایی روش‌های شیمیایی در انتقال DNA خارجی به سلول به میزان گسترده‌ای به فاکتورهای از قبیل نسبت اسید نوکلئیک به ماده شیمیایی، PH و شرایط دیواره سلولی بستگی دارد. با این حال این روش دارای مزیت‌هایی از جمله سمیت سلولی کمتر، عدم امکان بروز جهش، عدم نیاز به حمل DNA اضافی و عدم محدودیت در بسته بندی DNA می‌باشد. همچنین کار آبی فرایند ترانسفکشن به روش شیمیایی به میزان زیادی به نوع سلول بستگی دارد.

روش بیولوژیکی: غالب‌ترین روش مورد استفاده در روش‌های بیولوژیکی استفاده از ویروس‌ها می‌باشد که به این فرایند در اصطلاح ترانسداکشن نیز اطلاق می‌گردد. انتقال ژن به کمک ویروس‌ها دارای کارایی بسیار بالا در دستیابی به بیان پایدار ترانس ژن در داخل بدن با توجه به ماهیت ویروس در ادغام شدن آن در داخل سلول میزبان می‌باشد. به عنوان مثال رتروویروس یا همان ویروس لوکمی موش (MLV) به عنوان یک وکتور ویروسی جهت بیان پایدار ژن انتقالی در انسان مورد استفاده قرار گرفته است MLV. باعث ادغام شدن توالی DNA خود در ژنوم سلول میزبان می‌گردد که در نتیجه آن DNA ادغام شده در میزبان بیان می‌گردد. DNA ادغام شده ویروس هنگامی که سلول میزبان همانندسازی می‌کند در بین سلول‌های دختری تقسیم می‌گردد و امکان بیان پایدار ژن

را فراهم می‌کند. مهم‌ترین مشکل در روش انتقال ژن به کمک ویروس‌ها در ارتباط با ایمونوژنیسیته و سمیت آن‌ها می‌باشد.

## ۶- بهینه‌سازی و مهندسی وکتورهای بیانی:

تکنولوژی مرتبط با مهندسی وکتورهای بیانی برای تولید محصولات پروتئینی نو ترکیب در سلول‌های پستانداران شامل راهکارهایی از جمله به کارگیری توالی مربوط به ناحیه داخلی وارد شدن ریبوزوم جهت تسهیل بیان دو یا سه ژن می‌باشد. با توجه به اهمیت سیستم بیانی سلول‌های پستانداران در بیان پروتئین‌های نو ترکیب روش‌های متنوعی به منظور بهینه‌سازی بیان ژن در این سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله این روش‌ها می‌توان به بهینه‌سازی محیط کشت، مهندسی سلول، مهندسی وکتور و بهینه‌سازی اجزای وکتور بیانی اشاره کرد. در ارتباط با بهینه‌سازی محیط کشت سلول‌ها در آزمایش‌های افزایش بیان مختلف نشان داده شده است که غنی‌سازی محیط کشت سلول‌ها با ترکیبات مولکولی کوچک از جمله بوتیرات سدیم موجب افزایش بیان محصول پروتئینی می‌گردد. در واقع ترکیب بوتیرات سدیم به دلیل توانایی در جلوگیری از داستیلاسیون هیستون‌ها باعث افزایش در میزان بیان محصول پروتئینی می‌گردد. داستیلاسیون هیستون‌ها نقش مهمی در تنظیم بیان ژن دارد و این ویژگی بوتیرات سدیم باعث افزایش بیان پروتئین می‌گردد. ساختارهای وکتوری فراوانی جهت انتقال ژن‌ها و بیان آن‌ها در سلول‌های انسان و سایر سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفته است که به طور کلی این وکتور‌ها به دودسته ویروسی و وکتورهای پلاسمیدی تقسیم‌بندی می‌گردد. وکتورهای ویروسی ویروس‌های غیرفعال شده‌ای هستند که ژن مورد نظر در داخل آن‌ها کلون گردیده است و همانند وکتورهای پلاسمیدی دارای اجزای کاربردی از قبیل توالی‌های

تنظیمی و بیانی می‌باشند. عناصر پروکاریوتی وکتورها باعث تسهیل در تکثیر باکتری، بقاء و نگهداری وکتور می‌گردند. درحالی‌که عناصر یوکاریوتی و ویروسی وکتورها امکان رونویسی را فراهم آورده و شامل مارکرهای انتخابی می‌باشند. بهینه‌سازی وکتور می‌تواند باهدف افزایش میزان بیان و یا جلوگیری از کاهش بیان ژن خارجی در طول زمان انجام گردد. مطالعات متنوعی در زمینه طراحی مناسب وکتور بیانی بر پایه استفاده از پرموترهای قوی برای تشکیل مقادیر بیشتر رونوشت mRNA، سیگنال پپتید مناسب جهت بهبود ترشح پروتئین، به‌کارگیری مناطق اینترونی مشخص و بهینه‌سازی کدون های ژن مورد استفاده برای تولید محصول در سلول هدف انجام شده است. در روش‌های مهندسی وکتور جهت دستیابی به سطوح بالایی از بیان ژن در ساختار وکتورهای بیانی اغلب از توالی‌های پرموتری قدرتمند مانند پرموتر سایتومگالوویروس و پرموتور SV40 جهت دستیابی به میزان بالایی از رونوشت RNA پیامبر (mRNA) استفاده می‌گردد. همچنین نشان داده شده است که بهینه‌سازی کدون ها بر اساس نوع سلول هدف و بهینه‌سازی توالی سیگنال ترشحی باعث تسریع در فرایند پردازش mRNA و بهبود فرایند ترشح محصول می‌گردد.

## واژه نامه

**ژنومیکس:** یک رشته بین رشته ای از زیست شناسی است که بر ساختار، عملکرد، تکامل، نقشه برداری و ویرایش ژنوم تمرکز دارد.

**تصفیه بیولوژیک:** با استفاده از باکتری‌ها، نماتدها یا دیگر موجودات کوچک انجام می پذیرد که بر تجزیه ضایعات آلی با استفاده از فرآیندهای سلولی عادی متکی هستند.

**ایمونوسوربنت:** مربوط به روش هایی است که در آن از جذب آنتی بادی ها توسط آنتی ژن های نامحلول استفاده می شود.

**اپی توپ :** بخشی از یک پروتئین خارجی یا آنتی ژن است که قادر به تحریک یک پاسخ ایمنی است.

**پروپ:** توالی های کوتاه الیگونوکلئوتیدی که برای شناسایی یک توالی مکمل خاص به کار می رود

**عفونت های فرصت طلب:** عفونت هایی هستند که در افراد با سیستم ایمنی ضعیف تر با شدت و فراوانی بیشتر از افراد با سیستم ایمنی رخ می دهند.

**پاتوژن:** ارگانیسمی است که باعث بیماری می شود.

**توکسوئید:** یک سم غیرفعال (معمولاً یک اگزوتوکسین) است که سمیت آن توسط تغییرات شیمیایی (فرمالین)

یا عملیات حرارتی سرکوب شده است، در حالی که سایر خواص، معمولاً ایمنی زایی، حفظ می شود.

**ایمنی هومورال:** بخشی از ایمنی است که توسط ماکرومولکول ها - از جمله آنتی بادی های ترشح شده، پروتئین

های مکمل و برخی پپتیدهای ضد میکروبی - واقع در مایعات خارج سلولی ایجاد می شود.

**سیستم کمپلمان:** از تعداد زیادی پروتئین پلازما متمایز تشکیل شده است که با یکدیگر واکنش می دهند تا

پاتوژن ها را اپسونیزه کرده ( تحریک کردن سلول های ایمنی برای فاگوسیتوز) و یک سری پاسخ های التهابی را

القا کنند که به مبارزه با عفونت کمک می کند.

**سلول های میلوما:** سلول های جاودانه ای هستند که با ۸-آزاگوانین کشت می شوند تا از حساسیت آنها به

محیط انتخابی که پس از همجوشی سلولی استفاده می شود، اطمینان حاصل شود.

**افینیتی:** قدرت اتصال یک مولکول به لیگاند آن است.

**گلیکوزیلاسیون:** فرآیندی است که در آن یک کربوهیدرات به صورت کووالانسی به یک ماکرومولکول هدف،

معمولاً پروتئین ها و لیپیدها متصل می شود.

**پری پلاسمیک:** فضای پری پلاسمیک ناحیه بین دیواره سلولی و غشای پلاسمایی است.

**inclusion body:** در باکتری ها به عنوان ذرات پروتئین تجمع یافته وجود دارند.

**دومین:** واحدهای ساختاری و عملکردی پروتئین ها هستند.

**ثابت تفکیک (KD)** به عنوان مقدار واکنش دهنده ای تعریف می شود که به طور برگشت پذیر تجزیه می شود و محصولات جزء را تشکیل می دهد.

**ثابت اتصال:** حالت خاصی از ثابت تعادل  $K$  است و معکوس ثابت تفکیک است.

**لیگاند:** ماده ای است که با یک مولکول زیستی برای انجام یک هدف بیولوژیکی کمپلکس تشکیل می دهد.

**پگیله کردن:** یک فرآیند اصلاح بیوشیمیایی مولکول های فعال زیستی با پلی اتیلن گلیکول (PEG) است که چندین ویژگی مطلوب را به آنها می بخشد.

**آنالوگ ها:** در زیست شناسی، به ترکیباتی اطلاق می گردد که دارای ساختاری شبیه به ترکیب دیگر داشته، اما از نظر یک جزء خاص با هم متفاوت هستند.

**فیوژن پروتئین ها:** پروتئینی که از یک ژن همجوشی ساخته می شود که از اتصال بخش هایی از دو یا چند ژن مختلف ایجاد شده اند.

**سایتوکاین ها:** پروتئین های کوچکی هستند که در کنترل رشد و فعالیت سایر سلول های سیستم ایمنی و سلول های خونی بسیار مهم هستند.

**ترانس ژن:** یک ژن مصنوعی است که در آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دستکاری می شود و دارای تمام عناصر

ضروری برای بیان ژن حیاتی است که عموماً از گونه های مختلف مشتق شده اند.

**ایمونوژنیسیته:** توانایی یک مولکول یا ماده برای تحریک پاسخ ایمنی.

**استیلایسون هیستون:** یک اصلاح اپی ژنتیکی پویا است که در تنظیم واکنش های الگوی DNA مانند رونویسی

عمل می کند.

**کلون کردن:** شبیه سازی ژن یک روش رایج در آزمایشگاه های زیست شناسی مولکولی است که توسط محققان

برای ایجاد نسخه هایی از یک ژن خاص برای کاربردهای پایین دستی استفاده می شود.



## References:

- 1- Kayser, O., & Warzecha, H. (Eds.). (2012). Pharmaceutical biotechnology: drug discovery and clinical applications. John Wiley & Sons.
- 2- Walsh, G. (2003). Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55(1), 3-10.
- 3- Crommelin, D. J., Sindelar, R. D., & Meibohm, B. (Eds.). (2013). Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications. Springer Science & Business Media.
- 4- Brookes, G. and P. Barfoot. 2016. GM Crops: Global Socio-economic and Environmental Impacts 1996-2014. PG Economics Ltd, UK. pp 1-198
- 5- Villar, J. L., & Freese, B. (2008). Who benefits from GM crops?.
- 6- Kosten TR, Domingo CB. Can you vaccinate against substance abuse? *Expert Opin Biol Ther*. 2013 Aug;13(8):1093-1097.
- 7- Haynes BF, Moody MA, Alam M, Bonsignori M, Verkoczy L, Ferrari G, Gao F, Tomaras GD, Liao HX, Kelsoe G. Progress in HIV-1 vaccine development. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jul;134(1):3-10; quiz 11.

8- Plotkin S. History of vaccine development: Springer Science & Business Media; 2011