بسمه تعالی

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

جمهوری اسلامی ایران

دانشگاه پیام نور

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
در رشته زیست شناسی گرایش بیوشیمی
دانشکده پیام نور مشهد
گروه علمی زیست شناسی گرایش بیوشیمی

عنوان:

تهیه و تعیین ویژگیهای لیپوزومهای حاوی Bevasizumab (Anti-VEGF IgG) جهت تزریق داخل چشمی (داخل ویتره)

استاد راهنمای اول:

جناب آقای دکتر بیژن ملائکه نیکویی

استاد راهنمای دوم:

جناب آقای دکتر محمودرضا جعفری

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر مسعود صالح مقدم

نگارش:

دینا سروش اول

زمستان ۱۳۸۷

تاریخ: ۱۳۸۷/۱۲/۲۲

شماره: ۸۸۱۲/۴۸۷۳۱

پیوست:

جمهوری اسلامی ایران

وزارت علوم تحقیقات و فناوری

دانشگاه پیام نور

بسمه تعالی

تصویب نامه پایان نامه

پایان نامه تحت عنوان **تهیه و تعیین ویژگیهای لیپوزومهای حاوی Bevasizumab (Anti-VEGF IgG) جهت تزریق داخل چشمی (داخل ویتره)** که توسط دینا سروش اول تهیه و به هیئت داوران ارائه گردیده است مورد تایید می باشد.

تاریخ دفاع: ۱۳۸۷/۱۱/ ۱۶ نمره: ۱۹/- نوزده درجه ارزشیابی: عالی

اعضای هیئت داوران:

نام و نام خانوادگی	هیئت داوران	مرتبه علمی	امضاء
دکتر بیژن ملائکه نیکوئی	استاد راهنما	استادیار	
دکتر محمود رضا جعفری	استاد راهنما	دانشیار	
دکتر مسعود صالح مقدم	استاد مشاور	استادیار	
دکتر اسکوئی	استاد داور ۱	استادیار	
دکتر افسانه جامی الاحمدی	استاد داور ۲		
جواد محمدی پور	نماینده گروه امور آموزشی		

۱۳۸۷ /۱۲/ ۲۲

تاریخ:

شماره: ۴۱۷۲۹/۰۱۱

پیوست: ــــــ

جمهوری اسلامی ایران

وزارت علوم تحقیقات و فناوری

دانشگاه پیام نور

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه

پایان نامه تحت عنوان **تهیه و تعیین ویژگیهای لیپوزومهای حاوی Bevasizumab (Anti-VEGF IgG) جهت تزریق داخل چشمی (داخل ویتره)** که توسط دینا سروش اول تهیه و به هیئت داوران ارائه گردیده است مورد تایید می باشد.

تاریخ دفاع: ۱۶/ ۱۱/۱۳۸۷ نمره: ۱۹/- نوزده درجه ارزشیابی: عالی

اعضای هیئت داوران:

نام و نام خانوادگی	هیئت داوران	مرتبه علمی	امضاء
دکتر بیژن ملائکه نیکوئی	استاد راهنما ۱	استادیار	
دکتر محمود رضا جعفری	استاد راهنما ۲	دانشیار	
دکتر مسعود صالح مقدم	استاد مشاور	استادیار	
دکتر اسکوئی	استاد داور ۱	استادیار	
دکتر افسانه جامی الاحمدی	استاد داور ۲		
جواد محمدی پور	نماینده گروه امور آموزشی		

تقدیم به پدر فداکارم

تمام تکیه گاهم، او که آزاد زیستن را به من آموخت و افق های روشن زندگی را در مقابل چشمانم گشود، دست های همواره خسته اش را می بوسم.

تقدیم به مادر مهربانم

انسانی به زلالی آب، دلیل من برای زندگی ام، یگانه ای که آرامش ام را مدیون آرامش اویم.

تقدیم به زیباترین امید زندگی ام، همسر مهربانم

به پاس پاک ترین و خالصانه ترین محبت هایش به خاطر تمام لحظات خوش با او بودن .
هدیه به او که همه عشق و زندگی من است.

تقدیم به یگانه برادرم نیما

آسمانی ترین، مهربانترین و بی دریغ ترین
به پاس تمام خوبیها و مهربانی هایش

تقدیم به آنوشای عزیزم

که وجودش برایم همه مهر است و امید

با ژرف ترین سپاس ها از استادان گرانقدرم

جناب آقای دکتر بیژن ملائکه نیکوئی

جناب آقای دکتر محمودرضا جعفری

و جناب آقای دکتر مسعود صالح مقدم

برای همه کمک ها و رهنمودهای ارزنده شان و به خاطر صبر و حوصله ایشان .

با تشکر فراوان از همکاری بی دریغ جناب آقای افشین سمیعی که از راهنمایی‌شان بهره بردم.

چکیده

تزریق داخل ویتره یک روش معمول برای درمان بیماریهای بخش قدامی چشمی می باشد. متاسفانه تزریق متعدد ماهانه داخل ویتره می تواند باعث عوارض مرتبط با این تزریقات نظیر خونریزی داخل ویتره، اندوفتالمیت، جداشدگی شبکیه، آب مروارید و باز ماندن محل اسکلروتومی شود. داروی بواسیزوماب (اوستین) یک آنتی بادی مونوکلونال فراساخته علیه عامل رشد اندوتلیوم عروقی با وزن مولکولی ۱٤۹ کیلو دالتون است. بواسیزوماب یک داروی کاملا موثر در طیف وسیعی از بیماریهای چشمی است، ولی متاسفانه اثر آن کوتاه مدت بوده (نیمه عمر آن در مطالعات حیوانی و انسانی در داخل ویتره ۳ تا ۵ روز اندازه گیری شده است) و نیاز به تزریقات مکرر داخل ویتره برای حفظ اثر درمانی وجود دارد. لذا آزاد سازی اولیه سریع دارو و به دنبال آن آزاد سازی کنترل شده آن در هر یک از اختلالات ذکر شده یک وضعیت آیده ال محسوب می شود که می تواند منجر به افزایش کارایی درمان و کاهش عوارض جانبی شود. با هدف دستیابی به یک سیستم دارورسانی با روند آزاد سازی کنترل شده، لیپورومهای حاوی بواسیزوماب به روش دهیدراسیون و هیدراسیون مجد(DRV) تهیه و مورد ارزیابی قرار گرفت. ویژگیهای ظاهری لیپوزومها پس از تهیه به وسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. سپس جهت تعیین سایز لیپوزومها از دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر (Particle Size Analyzer) استفاده شد. همچنین درصد احتباس دارو در لیپوزمها توسط روش BCA تعیین شد. پس از بررسی درصد احتباس دارو در لیپوزوم، فرمول EPC:CHOL حاوی بواسیزوماب برای بررسیهای بعدی و تزریق داخل چشمی انتخاب شد. در نهایت، روش الایزا (ELISA) جهت سنجش میزان بواسیزوماب طراحی شد و بهترین رقت مورد استفاده برای آنتی بادی کوتینگ ۱/۵۰۰۰، جهت بلاکینگ با آلبومین ۲٪ و برای کونژوگه رقت ۱/۱۰۰۰۰ به دست آمد که در بررسی نمونه ها به وسیله الایزا مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به نتایج حاصله امکان تهیه لیپوزوم حاوی بواسیزوماب و سنجش میزان دارو توسط الایزا در شرایط in vitro و در نمونه های حیوانی فراهم شد، که این لیپوزومها جهت تزریق داخل چشمی در نمونه های حیوانی مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

کلمات کلیدی: لیپوزوم، بواسیزوماب (اوستین)، تزریق داخل ویتره، الایزا.

هدف

تزریق داخل ویتره روش متداول جهت درمان موضعی بیماریهای سگمان خلفی چشم محسوب می شود. در بیماریهای مختلف چشمی از جمله دژنراسیون ماکولای وابسته به سن (AMD) از نوع نئوواسکولار، گلوکوم نئوواسکولار، رتینوپاتی دیابتی، انسداد ورید شبکیه و... بواسیزوماب (اوستین) به عنوان یک آنتی بادی مونوکلونال علیه عامل رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF) به صورت تزریق داخل ویتره مورد استفاده قرار گرفته است. این روش زمانی به کار می رود که به علت شدت ضایعه احتمال تخریب ویتره و یا رتین وجود دارد. یکی از مزایای تزریق داخل ویتره این است که ضمن امکان تامین غلظت دارو در داخل چشم، عوارض جانبی سیستمیک دارو را به حداقل می رساند ولی به علت کوتاه مدت بودن زمان حضور دارو در داخل ویتره (نیمه عمر آن در مطالعات حیوانی و انسانی در داخل ویتره بین ۳ تا ۵ روز اندازه گیری شده است) استفاده از چندین تزریق دارو ضروری به نظر می رسد. نگرانی عمده در مورد دشواری تزریقات متعدد و عوارض مرتبط با این تزریقات مانند ایجاد خونریزی داخل ویتره، اندوفتالمیت، جدا شدگی شبکیه و آب مروارید وجود دارد. به همین دلیل ارائه یک سیستم دارو رسانی با رهش طولانی دارو ضروری به نظر می رسد. آزاد سازی اولیه سریع و به دنبال آن آزادسازی کنترل شده دارو در هریک از اختلالات ذکر شده ایده آل ترین وضعیت محسوب می شود.

لیپوزوم ها وزیکولهای میکروسکوپی شامل دو لایه فسفولیپیدی هستند که فضاهای مائی را احاطه می‌کنند و اندازه آنها بین۲۰ نانومتر تا چندین میکرون متغیر است. این وزیکول ها به دلیل خصوصیات آمفی پاتیک امکان دارو رسانی جهت داروهای هیدروفیل و لیپوفیل را فراهم می نماید. بسیاری از ویژگیهای لیپوزوم ها نظیر سمیت ذاتی پایین، زیست تجزیه پذیری، فقدان ایمونوژنیسیته سبب شده است که به عنوان یک سیستم دارو رسانی مورد توجه قرار گیرند. هدف اصلی این پایان نامه تهیه فرم لیپوزومی از داروی بواسیزوماب است که به عنوان یک سیستم دارو رسانی جدید از این دارو معرفی شود.

همچنین با توجه به ساختار پروتئینی دارو و احتمال تغییر ساختار و یا تغییر فعالیت بیولوژیک آن در طی روند تهیه به فرم لیپوزومی ضروری است تا یک روش اختصاصی با حساسیت بالا جهت این دارو مورد استفاده قرار گیرد به همین دلیل در بخشی از این پایان نامه به ارائه یک روش اختصاصی مبتنی بر ELISA جهت این دارو پرداخته شد.

فهرست مطالب

عنوان ..... **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی ۱

۱-۲. بواسیزوماب ۴

۱-۲-۱. عملکرد بواسیزوماب ۵

۱-۲-۲. انسانی کردن مونوکلونال آنتی بادی برای درمان سرطان‌ها ۶

۱-۲-۳. اشکال داروئی موجود و اجزاء مورد استفاده ۷

۱-۲-۴. موارد مصرف بواسیزوماب ۷

۱-۲-۴-۱. شیمی درمانی ۸

۱-۲-۴-۲. سایر کاربردها ۹

۱-۲-۵. فارماکوکینتیک بواسیزوماب ۱۰

۱-۲-۶. متابولیسم و دفع بواسیزوماب ۱۱

۱-۲-۷. نیمه عمر ۱۱

۱-۲-۸. مقدار دوز مصرفی بواسیزوماب ۱۱

۱-۲-۹. اثرات جانبی دارو ۱۱

۱-۲-۱۰. مقایسه ماکوژن لوسنتیس، آوستین ۱۳

۱-۲-۱۰-۱. ماکوژن (Pegaptanib sodium) ۱۳

۱-۲-۱۰-۲.لوسنتیس (رانیبیزوماب) ۱۴

۱-۲-۱۱. فارماکوکینتیک بواسیزوماب در استفاده داخل چشمی ۱۵

۱-۳. لیپوزومها ۱۷

۱-۳-۱. دلایل به کارگیری لیپوزم‌ها به عنوان حامل داروئی ۱۸

۱-۳-۲. تقسیم بندی لیپوزوم‌ها ۱۸

۱-۳-۳. مکانیسم تشکیل لیپوزوم‌ها ۲۰

۱-۳-۴. روش‌های تهیه لیپوزوم‌ها ۲۱

۱-۳-۴-۱. لیپوزوم های چند جداره ای بزرگ (MLVs) ۲۱

۱-۳-۴-۲. لیپوزوم های چند جداره ای کوچک \(SUVs) ۲۲

۱-۳-۴-۳. لیپوزوم های تک جداره ای بزرگ (LUVs) ۲۳

۱-۳-۴-۳-۱. روش دهیدراسیون و هیدراسیون مجدد (DRVs) ۲۳

۱-۳-۴-۳-۲. روش رقیق سازی دترژنت (Detergent dilution) ۲۳
۱-۳-۴-۳-۳. روش تبخیر فاز معکوس (Reverse phase evaporation) ۲۴
۱-۳-۵. دمای تغییر فاز (Tm) ۲۴
۱-۳-۶. بررسی خصوصیات لیپوزوم ها ۲۵
۱-۳-۶-۱. تعیین تعداد جدارهای لیپوزوم ها ۲۵
۱-۳-۶-۲. تعیین اندازه لیپوزوم ها ۲۵
۱-۳-۶-۳. تعیین حجم محصورشده (Trapped volume) ۲۵
۱-۳-۶-۴. بررسی تراوایی لیپوزومها ۲۶
۱-۳-۶-۵. پایداری لیپوزومها ۲۷
۱-۳-۶-۶. منجمد ساختن لیپوزومها ۲۷
۱-۳-۷. لیوفیلیزاسیون ۲۸
۱-۳-۸. کاربرد لیپوزومها ۲۹
۱-۳-۸-۱. انتقال دارویی ۲۹
۱-۳-۸-۲. حامل واکسن ۳۰
۱-۳-۹. راههای تجویز لیپوزومها ۳۰
۱-۳-۹-۱. تزریق وریدی ۳۰
۱-۳-۹-۲. تزریق عضلانی ۳۱
۱-۳-۹-۳. تزریق داخل صفاقی ۳۱
۱-۳-۹-۴. تزریق داخل مفصلی ۳۱
۱-۳-۹-۵. تجویز خوراکی ۳۱
۱-۳-۹-۶. تجویز داخل شریان ۳۱
۱-۳-۹-۷. تجویز داخل ریه ۳۲
۱-۳-۹-۸. تجویز زیر جلدی ۳۲
۱-۳-۹-۹. تجویز موضعی لیپوزومها ۳۲

فصل دوم :روش کار

۲-۱. مواد لازم ۳۴
۲-۲. وسایل و تجهیزات مورد نیاز ۳۵
۲-۳. تهیه لیپوزومهای حاوی بواسیزوماب ۳۹
۲-۳-۱. تهیه MLVهای فاقد بواسیزوماب ۴۰
۲-۳-۲. تهیه لیپوزومها با اندازه های مختلف ۴۱
۲-۳-۳. رهیدراسیون ۴۲
۲-۴. تعیین اندازه لیپوزومها ۴۳

۲-۵. تعیین درصد احتباس لیپوزمهای تهیه شده ۴۳
۲-۵-۱. روش BCA ۴۴
۲-۶. بررسی پایداری بواسیزوماب در فرم لیپوزومی با استفاده از روش سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) ۴۴
۲-۶-۱. محلولهای لازم ۴۵
۲-۶-۲. روش تهیه ژل ۴۷
۲-۶-۳. روش رنگ آمیزی نیترات نقره ۴۹
۲-۷. الایزا ۵۰
۲-۷-۱. روش الایزا ۵۰

فصل سوم: نتایج

۳-۱. طراحی الایزا جهت سنجش میزان بواسیزوماب در مایعات بیولوژیک ۵۲
۳-۱-۱. بهینه نمودن شرایط انجام تست ELISA ۵۲
۳-۱-۲. طراحی قالب آزمایش ۵۲
۳-۱-۳. مراحل انجام تست ۵۴
۳-۱-۴.نتایج حاصل از تست الایزای بواسیزوماب ۵۵
۳-۲. بخش لیپوزومی ۵۷
۳-۲-۱. محاسبه درصد احتباس لیپوزومی ۵۷
۳-۲-۱-۱. نتایج مربوط به لیپوزوم DPPC:CHOL ۵۷
۳-۲-۱-۲. نتایج مربوط به Egg-PC-CHOL ۵۹
۳-۲-۱-۳. نتایج مربوط به بواسیزوماب ۶۱
۳-۲-۱-۴. محاسبه درصد احتباس ۶۳
۳-۲-۲. تعیین سایز ذرات لیپوزومی ۶۴
۳-۳ بررسی SDS-PAGE لیپوزومهای حاوی بواسیزوماب ۶۶

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

۴-۱. بحث ۶۸
۴-۲. نتیجه گیری ۷۲

پیوست ها

ضمیمه الف : ۷۳
فهرست منابع ۷۴

فصل اول

مقدمه

۱-۱ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی(VEGF)

آنژیوژنز (رشد عروق خونی جدید از عروق موجود) در حین امبریوژنز و رشد استخوانهای طویل در بچه ها و جوانان ضروری می باشد. در زندگی بالغین، آنژیوژنز در شرایط پاتولوژیکی محدودی مثل التیام زخم، آندومتروزیز و رشد سرطان و متاستاز آن دیده می شود. آنژیوژنز در شروع تومور، حفظ و متاستاز آن حیاتی می باشد. اولین عامل تحریک آنژیوژنز اکسیژن است. که باعث آزادسازی فاکتورهای پیش آنژیوژنز می گردد. تشکیل عروق جدید خونی از طریق یک سری روندها نظیر تکثیر، مهاجرت سلولهای اندوتلیال واسکولار، حفظ سلولهای اندوتلیال نارس و القاء نفوذپذیری درکپیلاریها صورت می گیرد (Midgley & Kerr., 2005; Hussain et al., 2007).

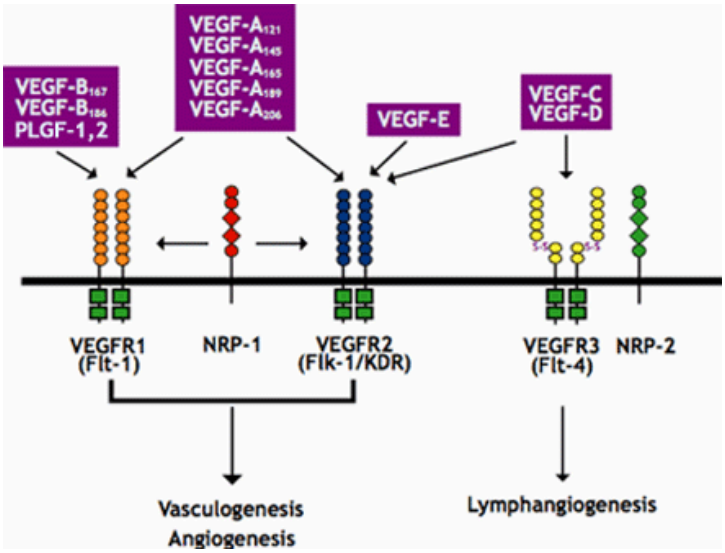
فرضیه هدف قرار دادن آنژیوژنز برای درمان سرطان ابتدا در سال ۱۹۷۱ توسط Judah Folkman مطرح شد. تحقیقات متعددی جهت درمان سرطان با مهار آنژیوژنز انجام شده است. تعدادی از مهارکننده های آنژیوژنز مثل مولکولهای کوچک، پپتیدها، آنتی بادی ها و پروتئین های کمپلکس (پیچیده) ارائه شده اند(Hurwitz., 2004).

فاکتورهای پرو- آنژیوژنیک شامل، فاکتور رشد اندوتلیال واسکولار (VEGF)، فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (bFGF) و فاکتور رشد تغییر شکل دهنده α و β (β و TGF-α) می باشد که مهمترین آنها VEGF است. VEGF یک فاکتور پروآنژیوژنیک است که نقش کلیدی در آنژیوژنز تومورها دارد و هدف اصلی در درمان های پزشکی محسوب می شود. استراتژی VEGF در دست تحقیق می باشد. بهترین مطالعه شامل مهار VEGF و فعالیت رسپتور VEGF با آنتی بادی مونوکلنال و مهار سیگنال های رسپتور از طریق مهار تیروزین کیناز است (Midgley & Kerr., 2005).

٦ عضو از خانواده VEGF شناسایی شده اند، این ٦ عضو در شکل ۱-۱ نشان داده شده اند، VEGF-A (فاکتور نفوذ پذیری و اسکولار یا فقط VEGF می باشد) بیشترین تاثیر آنژیوژنز را در طی روند کارسینوژنیک دارد. VEGF-A تاثیر خود را از طریق اتصال به رسپتورهایش ایفاء می کند.VEGF یک گلیکوپروتئین هوموديمریک با وزن مولکولی ٤٦ KDa می باشد که در ابتدا در تومورهای واسکولار در سال ۱۹۸۳ شناسایی شد. چهار ایزوفرم VEGF (۱۲۱، ۱٦٥، ۱۸۹، ۲۰٦) شناسائی شده که از اسپلایسینگ[1] mRNA یک ژن مشترک ناشی می شوند. ۱٦٥ VEGF یکی از بیشترین نسخه‌های آن در بافتها می باشد، که محرکی قوی برای آنژیوژنز است و بیشتر مراحل آنژیوژنز مثل

[1] . Splicing

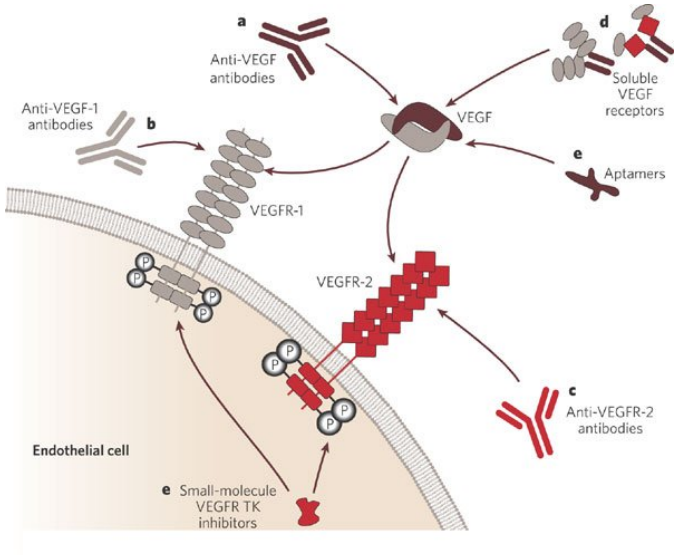
تکثیر، مهاجرت، فعالیت پروتئولیتیک و تشکیل لوله هـای کپـیلاری در سـلولهای انـدوتلیال را پـیش می‌برد.



شکل ۱-۱: ٦ عضو از خانواده VEGF شناسایی شده اند:

VEGF- A (فاکتور نفوذ پذیری و اسکولار یا فقط VEGF می باشد) بیشترین تاثیر آنژیوژنز را در طی رونـد کارسینوژنیک دارد. VEGF-A تاثیر خود را از طریق اتصـال بـه رسـپتورهایش ایفـاء مـی کنـد.VEGF یـک گلیکوپروتئین هوموديمريک با وزن مولکولی ٤٦ KDa می باشـد. چهـار ایزوفـرم VEGF (۱۲۱، ۱٦٥، ۱۸۹، ۲۰٦) شناسائی شده که از اسپلایسینگ mRNA یک ژن مشترک ناشـی مـی شـوند. VEGF عمـل خـود را از طریق ۲ رسپتور سطح سلولی انجام می دهـد: ۱. VEGF-R-1 (fms– مثـل تیـروزین کینـاز 1(Flt-1)) و ۲. VEGFR-2 (رسپتورهای حاوی دومین القاء کننده کیناز [KDR]).

VEGF همانطور که گفته شد عمل خود را از طریق ۲ رسـپتور سـطح سـلولی انجـام مـی دهـد: ۱. VEGF-R-1 (fms– مثل تیروزین کینـاز 1(Flt-1)) و ۲. VEGFR-2 (رسـپتورهای حـاوی دومـین القاء کننده کیناز [KDR]). این رسپتورها در سلولهای اندوتلیال و به مقدار کمتر روی ماکروفاژهـا و مونوسیتها بیان می شوند. اتصال VEGF به رسپتورش باعث القاء سیگنالهایی به صورت آبشاری برای نفوذ پذیری واسکولار می شود (Ichhpujani et al., 2007). فعـال شـدن رسـپتورها بـه طـور نرمـال فسفریلاسیون تیروزین را القاء می کند و این القاء باعث ایجاد سیگنالهای میتوژنیـک بـرای سـلولهای اندوتلیال عروقی می شود (Dvorak et al., 1995; Ferrara and Davis., 1997) (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲: انواع رسپتورهای VEGF و عملکرد آنها:

اتصال VEGF به رسپتورش باعث القاء سیگنالهایی به صورت کاسکید برای نفوذ پذیری واسکولار می شود. فعال شدن رسپتورها به طور نرمال فسفریلاسیون تیروزین را القاء می کند و این القاء باعث ایجاد سیگنالهای میتوژنیک برای سلولهای اندوتلیال عروقی می شود. این رسپتورها حاوی دومین خارج سلولی شبیه ایمونوگلوبین، ناحیه بین غشایی و دم داخل غشایی است. بواسیزوماب به عنوان یک آنتی VEGF باعث مهار سیگنال داخل سلولی و مهاجرتهای متعاقب و تکثیر سلولهای اندوتلیال می شود.

این رسپتورها خصوصیات مشابهی با بقیه رسپتورها با فعالیت تیروزین کینازی نشان می دهد که حاوی دومین خارج سلولی شبیه Ig، ناحیه بین غشایی و دم داخل غشایی است که فعالیت تیروزین کینازی دارند. القاء فعالیت کینازی با اتصال VEGF باعث یک فسفریلاسیون پی در پی در حداقل٤٦ مولکول سیگنالی می شود (Midgley and Kerr., 2005).

نقش کلیدی VEGF در سرطان ها از طریق یک سری شواهدی تائید می شود که عبارتند از:

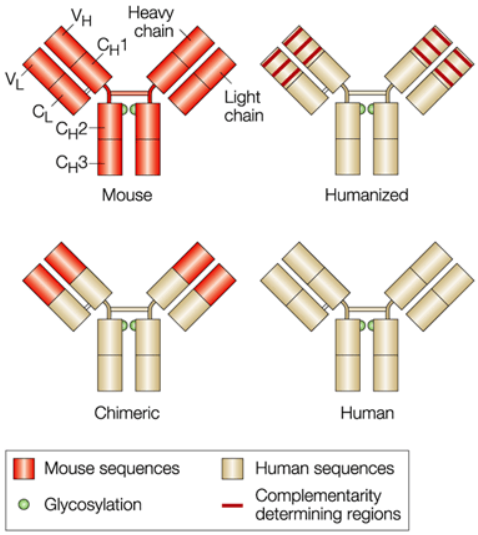
۱- یک ارتباط مهمی بین سطح VEGF پلاسما و بیماری یا متاستاز دیده می شود (Medgley and Kerr., 2005 Karayiannakis et al., 2003). ۲- بیان VEGF در بافتهای تومووری بالا می رود (1, Brown et al., 1999). ۳- آنتی بادیهای ضد VEGF رشد تومور انسانی تزریق شده به موش را مهار می کند(1, Kim., 1993). بواسیزوماب (rhuMAb VEGF) یک آنتی بادی مونوکلونال انسانی نوترکیب است که به VEGF متصل می شود. با مهار فعالیت VEGF ، بواسیزوماب باعث مهار سیگنال داخل سلولی و مهاجرتهای متعاقب و تکثیر سلولهای اندوتلیال

می‌شود. مطالعات پزشکی نشان می‌دهد که این اثر بواسیزوماب می تواند باعث مهار تشکیل عروق تومور و در نهایت مهار رشد تومور شود. در کنفرانسی در سال ۲۰۰۲، مقالات درمان آنژیوژنز از طرق مختلف مثل بواسیزوماب را در درمان سرطان نشان دادند. در مقاله ای توسط Napoleone Ferrara مروری بر آنژیوژنز توموری و نقش مهم VEGF در این پروسه و هدف قرار دادن VEGF در درمان سرطان شده است. Alan Sandler و Roy Herbst به هدف قرار دادن VEGF در درمان سرطان non-small cell lung cancer اشاره کرده اند. همچنین مطالعاتی برای سرطان پستان از طریق مهار VEGF انجام شده است (Anonymus., 2008 b).

مطالعات جدید نشان می دهند ، زمان آن رسیده است که از بواسیزوماب همراه با داروهای شیمی درمانی برای درمان سرطان استفاده شود (Hurwilz., 2004).

۱-۲ بواسیزوماب

بواسیزوماب بانام تجاری آوستین یک آنتی بادی مونوکلونال انسانی شده می باشد که اولین مهارکننده آنژیوژنز است و در مقیاس تجاری تولید می شود(شکل ۱-۳). بواسیزوماب در واقع یک IgG انسانی نوترکیب (۹۳٪ انسانی، ۷٪ موشی) می باشد که از طریق مهندسی ژنتیک و موتاژنز نقطه ای تولید می شود و در رده سلولی تخمدان هامستر چینی زیاد می گردد. این دارو باعث توقف رشد تومور از طریق مهار تشکیل عروق خونی جدید توسط هدف قرار دادن و مهار عملکرد یک پروتئین طبیعی به نام VEGF می شود. این آنتی بادی پس از تولید در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک جنتامایسین بیان می گردد، و وزن مولکولی آن ۱٤۹ کیلودالتون است. از این دارو برای درمان سرطان استفاده می شود.اولین بار مصرف آن همراه با سایر داروهای شیمی درمانی در بیماران با سرطان کلورکتال متاستازی مورد بررسی قرار گرفت و توسط FDA در اواخر فوریه ۲۰۰٤ در امریکا و در اوایل ۲۰۰۵ در اروپا تائید شد. این دارو توسط شرکت Genetech در امریکا و همچنین شرکت Roche تولید می شود. استفاده از این دارو برای بقیه سرطان ها مثل سرطان پستان، ریه، کلیه و ... مورد بررسی قرار گرفته است (Ferrara and Gerber., 2001; Anonymus., 2008 c; Anonymus., 2008 c; Anonymus., 2008 a; Middleton and Lapka., 2004).

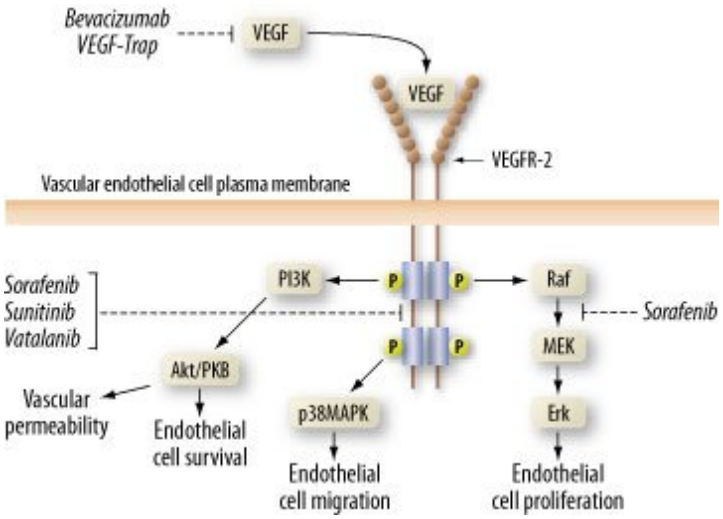


شکل ۱-۳: ساختار بواسیزوماب:

بواسیزوماب بانام تجاری آوستین یک آنتی بادی مونوکلونال انسانی شده می باشد که اولین مهارکننده آنژیوژنز است و در مقیاس تجاری تولید می‌شود. در این روش شش recordable compact disc format (CDR) از MuMabVEGF به چهارچوب آنتی بادی انسانی منتقل شد. هفت ریشه در دومین (VH) سنگین متغیر انسانی و یک ریشه در دومین سبک متغیر انسانی (VL) از حالت انسانی به موشی تغییر یافتند تا اتصال مشابهی به muMabVEGF پیدا کنند. البته نه تنها آن ٦ منطقه CDR بلکه نواحی اطراف هم شامل حال این تغییر می شدند. Anti-VEGF انسانی شده و انواع IgG به VEGF با تمایلی مشابه با آنتی بادی موشی اصلی متصل می شوند

۱-۲-۱ عملکرد بواسیزوماب

بواسیزوماب یک آنتی بادی مونوکلونال انسانی است که به فاکتور VEGF متصل شده و از اتصال VEGFبه گیرنده‌اش ممانعت می‌کند. عدم اتصال VEGF به گیرنده‌اش مانع افزایش و تکثیر سلول اندوتلیال و تشکیل عروق خونی می‌شود (Middleton and Lapka., 2004; Anonymus., 2008a).(شکل ۱-٤).



شکل ۱-٤: عملکرد رسپتور VEGF:

القاء فعالیت کینازی با اتصال VEGF باعث یک فسفریلاسیون پی در پی در حداقل٤٦ مولکول سیگنالی می شود. بواسیزوماب به عنوان یک آنتی VEGF به فاکتور VEGF متصل شده و از اتصال آن به گیرنده اش ممانعت می کند. عدم اتصال VEGF به گیرنده اش مانع افزایش و تکثیر سلول اندوتلیال و تشکیل عروق خونی می شود

۱-۲-۲ انسانی کردن مونوکلونال آنتی بادی برای درمان سرطان ها

یک مشکل اساسی در استفاده از آنتی بادیهای موشی در روندهای درمانی در انسانها ایجاد پاسخ ایمنی است . یک روش برای غلبه بر این محدودیت در استفاده های کلینیکی از مونوکلونال آنتی بادی، انسانی کردن آنتی بادی موشی است که این روش توسط Riechman , Jones ابداع شد. کسانی که برای اولین بار CDRهای آنتی بادی موشی را به داخل دومین V آنتی بادی انسانی انتقال دادند. در این روش شش CDR از MuMabVEGF به چهارچوب آنتی بادی انسانی منتقل شد. هفت ریشه در دومین (VH) سنگین متغیر انسانی و یک ریشه در دومین سبک متغیر انسانی (VL) از حالت انسانی به موشی تغییر یافتند تا اتصال مشابهی به muMabVEGF پیدا کنند. البته نه تنها آن ٦ منطقه CDR بلکه نواحی اطراف هم شامل حال این تغییر می شدند. Anti-VEGF انسانی شده و انواع IgG به VEGF با تمایلی مشابه با آنتی بادی موشی اصلی متصل می شوند (Presta et al., 1997).

۱-۲-۳ اشکال داروئی موجود و اجزاء مورد استفاده

بواسیزوماب به صورت محلولی غلیظ برای تزریق در ویالی یکبار مصرف تهیه می شود که حاوی مقدار ۱۰۰ mg از بواسیزوماب در ٤ ml و یا ٤۰۰ mg از بواسیزوماب در ١٦ ml (با غلظت ۲۵mg/ml) می باشد(شکل ۱-۵). بواسیزوماب با فسفات سدیم ۵۱ mM در pH=٦/۲ و α ,α-تری هالوز دهیدرات ٦۰ mg/ml و ٤./۰٪ پلی سوربات ۲۰ فرموله شده است. این محصول داروئی به صورت شفاف تا حد کمی کدر، بدون رنگ تا متمایل به قهوه ای رنگ پریده و محلولی مایع و استریل است که باید با محلول ۰/۹٪ سدیم کلراید رقیق شود. دانشمندان براساس یک سری مطالعات و شواهد به این نتیجه رسیده اند که محصول به صورت حجم‌های ٤ ml و ١٦ ml در ویال تهیه شود. ویال ۱۰۰ mg، با حجم ٤/۳ ml حاوی ۱۰۷/۵ mg از بواسیزوماب است. و ویال ٤۰۰ mg، ١٦/۲۸ml حاوی ٤۰۷ mg از بواسیزوماب می باشد، حجم اضافی به خاطر هدر رفتن به هنگام کشیدن با سرنگ می باشد (Middleton and Lapka., 2004; Ancng mus., 2008e).

برای مصرف بهتر است به صورت استریل، مقدار لازم از بواسیزوماب را کشیده و در حجم کل ۱۰۰ml از سدیم کلراید ۰/۹٪ رقیق شود.

شکل ۱-۵: ویال بواسیزوماب:

بواسیزوماب به صورت محلولی غلیظ برای تزریق در ویالی یکبار مصرف تهیه می شود که حاوی مقدار mg ۱۰۰ از بواسیزوماب در ٤ ml و یا ٤۰۰ mg از بواسیزوماب در ١٦ ml (با غلظت۲۵ mg/ml) می باشد.

۱-۲-٤ موارد مصرف بواسیزوماب

۱- شیمی درمانی

۲- سایر کاربردها

۱-۲-٤-۱ شیمی درمانی

بواسیزوماب به عنوان اولین مهار کننده آنژیوژنز راهی نوین در درمان برخی سرطان ها گشود. بواسیزوماب در فوریه ۲۰۰٤ توسط US FDA و در اوایل سال ۲۰۰۵ در اروپا مورد تایید قرار گرفت (Anonymus., 2008 c)). این دارو به عنوان خط اول درمان همراه با FU – ۵ برای بیماران با سرطان کلورکتال متاستازی مورد استفاده قرار گرفت (۸)

سپس EMEA در ژانویه ۲۰۰۵ استفاده از بواسیزوماب را همراه با هر داروی شیمی درمانی برای سرطان کلورکتال تایید کرد(۸ و ۲). این سرطان کلورکتال، کلون، روده بزرگ و رکتوم را تحت تاثیر قرار می دهد، دومین سرطان در آمریکا می باشد که موجب مرگ و میر می شود و جزء ۱۵٪ از کل سرطان هائی است که هر ساله محاسبه می گردد (Anonymus., 2008 d).

در واقع FDA، بواسیزوماب را در فوریه سال ۲۰۰٤ جهت استفاده همراه با داروی (oxaliplatin, Leucovorin 5-fluorouracil) داخل وریدی برای شیمی درمانی در درمان سرطان کلورکتال متاستازی درجه اول تایید کرد. و در June سال ۲۰۰٦، بواسیزوماب توسط FDA در الحاق با داروی شیمی درمانی ذکر شده داخل وریدی در درمان بیماران با سرطان کلورکتال متاستازی که مرحله دوم درمان را می گذرانند، نیز مورد تصویب قرار گرفت (Cohen et al., 2007; Anonymus., 2008 d).

منشاء و دلیل تصویب بواسیزوماب توسط FDA بر مبنای اطلاعاتی است که از یک مطالعه بزرگ همراه با کنترل صورت گرفته است. در این مطالعه نشان داده شده که بیمارانی که بواسیزوماب را همراه با داروی شیمی درمانی IFL(5-fu/lucovorin/CPT 11) دریافت کرده اند، ۵ ماه بیشتر از کسانی که IFL را به تنهایی گرفته اند عمر می کنند (۲۰/۳ ماه در مقابل ۱۵/٦ ماه)، که این یکی از بزرگترین پیشرفتها برای حفظ بقای بیماران با سرطان کلورکتال محسوب می شود.

دومین دلیل تصویب براساس مطالعه روی ۸۲۹ بیماربا سرطان کلورکتال متاستازی پیشرفته است که قبلاً یکبار با irinoteean, 5-FU به عنوان درمان ابتدایی مورد درمان قرار گرفتند. مطالعات نشان داد، کسانی که بواسیزوماب را همراه با داروی شیمی درمانی (Oxaliplatin/5-Fu/leucovorin) FOLFOX4 مصرف کرده اند، در مقایسه با بیماران که FOLFOX4 را به تنهایی مصرف کرده‌اند ۲۵٪ کاهش در ریسک مرگ و میر داشته اند. نیمه عمر بیمارانی که بواسیزوماب را همراه با FOLFOX4 مصرف کرده اند، ۱۳ ماه بود در حالی که در آنهانی که FOLFOX4 را به تنهایی گرفته اند، نیمه عمر تنها ۱۰/۸ ماه بود (Anonymus., 2008 d).