مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۳۳/هفته‌ی اول مرداد ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۲۱

ارزیابی درون‌تن ایمنی فیوژن پروتئین DT386-BR2 به عنوان یک کاندیدای دارویی ضد سرطان در مدل موشی

فاطمه شفیعی[۱]، راضیه انتشاری[۲]، محمد ربانی[۳]، علی جهانیان نجف‌آبادی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان یکی از بزرگ‌ترین مشکلات مرتبط با سلامتی می‌باشد و با توجه به گسترش روزافزون مقاومت‌های دارویی و عوارض جانبی درمان‌های شیمیایی فعلی، تولید داروهای هدفمند با عوارض جانبی محدود، موضوع تحقیقات بسیاری در علوم پزشکی می‌باشد. در مطالعات قبلی، فیوژن پروتئینی مرکب از بخش کاتالیتیک و داخل غشایی سم دیفتری، به عنوان عامل کشنده و پپتید ضد میکروبی BR2 به عنوان عامل هدفمند کننده (DT386-BR2) تولید شد. مطالعات اولیه برون‌تن، اثرات ضد سرطانی انتخابی بر روی رده‌های سلولی سرطانی نشان داد. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، ارزیابی درون‌تن سمیت ناشی از پروتئین DT386-BR2 بر روی موش‌های سفید سالم بود.

روش‌ها: در ابتدا، فیوژن پروتئین DT386-BR2 با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب در باکتری Escherichia coli تولید و با استفاده از کروماتوگرافی بر پایه‌ی ستون نیکل خالص‌سازی گردید و سپس، با غلظت‌های مختلف (۱۵، ۳۰، ۶۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم/روز) در موش‌های سفید سالم به صورت داخل صفاقی و به مدت ۵ روز متوالی تزریق گردید. هر گروه سه تایی از موش‌ها، از نظر وضعیت زنده ماندن، دمای بدن، میزان تغییرات وزن و میزان مصرف غذا برای دو هفته بعد از آخرین تزریق مورد ارزیابی قرار گرفتند. به گروه شاهد منفی نیز نرمال‌سالین تزریق شد.

یافته‌ها: هیچ تفاوت معنی‌داری بین میزان زنده ماندن، دمای بدن و میزان تغییرات وزن موش‌های مواجه شده با فیوژن پروتئین در غلظت‌های مختلف در مقایسه با شاهد منفی وجود نداشت ($P > ۰/۰۵$) و با افزایش غلظت پروتئین، هیچ گونه عوارض سویی در موش‌های سالم مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: این فیوژن پروتئین، می‌تواند به عنوان یک کاندیدای دارویی مناسب در مطالعات درون‌تن پیش بالینی به منظور تعیین ویژگی‌های فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک آن در مدل موشی زنوگرافت مورد ارزیابی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ایمنوتوکسین، سم دیفتری، سمیت، ایمنی، موش

ارجاع: شفیعی فاطمه، انتشاری راضیه، ربانی محمد، جهانیان نجف‌آبادی علی. **ارزیابی درون‌تن ایمنی فیوژن پروتئین DT386-BR2 به عنوان یک کاندیدای دارویی ضد سرطان در مدل موشی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۳۳): ۶۶۱-۶۵۵

مقدمه

ایمنوتوکسین‌ها، پروتئین‌های نوترکیبی هستند که از دو جزء مختلف تشکیل یافته‌اند؛ جزء هدفمند کننده (Targeting moiety) که باعث شناسایی یک لیگاند خاص بر روی سلول‌های ویژه می‌شود و جزء سمی (Toxic moiety) که باعث از بین رفتن سلول‌های انتخاب شده می‌شود (۱). بوفورین (Buforin)، یک پپتید ضد میکروبی است که با ایجاد منافذ موقتی در غشای سلول‌های سرطانی به سلول وارد می‌شود، بدون این که روی سلول‌های طبیعی اثر سوئی اعمال کند و این باعث شده است که این پپتید، در طراحی ایمنوتوکسین‌های جدید مورد استفاده قرار گیرد (۴-۲). از طرف دیگر، توکسین دیفتری (Diphtheria toxin یا DT)، پرکاربردترین توکسین باکتریایی در طراحی و تولید ایمنوتوکسین‌ها به شمار می‌آید؛ به گونه‌ای که با

۱- متخصص بیوتکنولوژی دارویی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات بیوانفورماتیک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: علی جهانیان نجف‌آبادی
Email: jahanian@pharm.mui.ac.ir

جایگزین کردن دمین متصل شونده به گیرنده‌ی این توکسین با موتیف‌های هدفمند کننده، می‌توان ایمنوتوکسین‌های مختلفی تولید کرد (۵). بر این اساس، در مطالعات قبلی فیوژن پروتئینی ایجاد گردید که حاوی BR2 (پپتیدی از مشتقات بوفورین که سلول‌های سرطانی را به صورت اختصاصی‌تر از بوفورین مورد هدف قرار می‌دهد) (۶)، دمین‌های کاتالیتیک (Catalytic domain) و ترانس‌ممبران (Trans-membrane) توکسین دیفتری (DT386) می‌باشد (۷).

مطالعات مرتبط با ارزیابی اثرات سمیت اختصاصی این فیوژن پروتئین بر روی رده‌های سلولی نشان داد که این پروتئین، دارای اثرات سیتوتوکسیک معنی‌داری بر روی رده‌های سلولی سرطانی Michigan cancer foundation-7 (MCF-7) و HeLa (به ترتیب با Inhibitory concentration 50% یا IC50 در حدود ۲/۰۸ و ۰/۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) است؛ در حالی که روی رده‌های سلولی طبیعی Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) و Human embryonic kidney 293 (HEK 293) فاقد اثرات سیتوتوکسیک معنی‌داری بود (۷). بنابراین، با توجه به نتایج امیدبخش مطالعات سلولی، به عنوان اولین قدم در انجام مطالعات پیش بالینی درون تن، در مطالعه‌ی حاضر، ارزیابی ایمنی و سمیت اختصاصی این فیوژن پروتئین بر روی مدل موشی سالم انجام شد تا بتوان از نتایج آن در طراحی مراحل بعدی مطالعات شامل تعیین ویژگی‌های فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک این ترکیب بهره برد.

روش‌ها

مواد: فیوژن پروتئین DT386-BR2 طی مطالعات قبلی تولید، خالص‌سازی و تعیین مقدار گردید که در زیر به صورت خلاصه ذکر گردیده است. موش‌های سفید نژاد آلبینو (Albino) که همگی نر و دارای محدوده‌ی وزنی ۳۰-۲۰ گرم بودند. از لانه‌ی حیوانات دانشکده‌ی داروسازی اصفهان تهیه شدند. مواد شیمیایی مختلف مورد استفاده در این طرح از شرکت‌های معتبر خریداری گردیدند.

تولید و خالص‌سازی فیوژن پروتئین DT386-BR2: همان‌طوری که در مطالعات قبلی ذکر گردید (۷)، برای تولید پروتئین نوترکیب DT386-BR2 از باکتری‌های پذیرای Escherichia coli BL21 (DE3) استفاده گردید. برای این منظور پلاسمید نوترکیب pET28-DT386-BR2 در این باکتری ترانسفرم گردید. القای بیان نیز به وسیله‌ی Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) با غلظت ۱ میلی‌مولار انجام شد و در نهایت، خالص‌سازی این پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی بر پایه‌ی ستون نیکل صورت گرفت. در هر مرحله، تأیید بیان و خالص‌سازی با استفاده از تکنیک Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) مورد ارزیابی قرار گرفت.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعات درون‌تن: حذف لیپوپلی‌ساکارید از پروتئین خالص شده با استفاده از تکنیک تریتون X114 و ارزیابی کارایی این روش در حذف آن با استفاده از روش Limulus amebocyte lysate (LAL) انجام شد (۸). به صورت خلاصه، تریتون X114 با غلظت نهایی ۱ درصد به محلول پروتئینی اضافه گردید و پس از مخلوط شدن، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در آخرین مرحله، سانتریفیوژ نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ دقیقه و با دور g ۲۰۰۰۰ انجام گردید. کلیه‌ی این مراحل، ۳ مرتبه تکرار شد. در هر مرحله، بخش مایع که حاوی فیوژن پروتئین مورد نظر بود، جمع‌آوری شد و برای اضافه کردن مجدد تریتون X114 مورد استفاده قرار گرفت. بعد از اتمام این مراحل، عملیات تعویض بافر به وسیله‌ی دیالیز و با Phosphate buffered saline (PBS) (pH = ۷/۴) انجام شد. در نهایت، غلظت پروتئین با استفاده از معرف Bradford اندازه‌گیری شد (۹) و همچنین، نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری مقدار اندوتوکسین باقی‌مانده، به انستیتو پاستور ایران ارسال گردید. در نهایت، باقی‌مانده‌ی نمونه‌ها در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید تا برای مراحل بعدی مطالعه مورد استفاده قرار گیرد.

ارزیابی سمیت غیر اختصاصی فیوژن پروتئین DT386-BR2 به صورت درون‌تن: همه‌ی آزمایش‌های حیوانی توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (Ethics Committee of Isfahan University of Medical Sciences) مورد ارزیابی قرار گرفت و بر طبق دستورالعمل مؤسسه‌ی ملی محافظت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) اجرا گردید (۱۰). به منظور تعیین سمیت غیراختصاصی فیوژن پروتئین DT386-BR2، موش‌های سفید سالم مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور، موش‌های مورد استفاده در دو گروه مورد و شاهد منفی تقسیم شدند و غلظت‌های مختلفی از فیوژن پروتئین (۱۵، ۳۰، ۶۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم/روز) به صورت داخل صفاقی به موش‌های گروه مورد تزریق گردید. هر موش، برای ۵ روز متوالی مورد تزریق غلظت مشخصی از فیوژن پروتئین قرار گرفت و برای ۱۵ روز از نظر دمای بدن، وضعیت زنده ماندن، میزان وزن و میزان مصرف غذا مورد ارزیابی قرار گرفت. موش‌های گروه شاهد منفی نیز با PBS مورد تزریق قرار گرفتند.

آنالیزهای آماری: نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) به منظور آنالیز

داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. آزمون ANOVA و به دنبال آن آزمون Post hoc مناسب (Tukey) برای تعیین تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها استفاده شد و $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

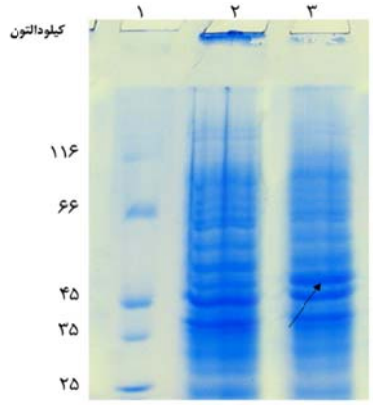
بیان و خالص‌سازی فیوژن پروتئین DT386-BR2

همان‌طور که در شکل ۱ آمده است، پروتئین DT386-BR2 به صورت موفقیت‌آمیزی بیان گردید که از روی حضور یک باند ۴۷ کیلودالتونی در ژل SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. حضور این باند در نمونه‌های خالص شده، نشان دهنده‌ی موفقیت‌آمیز بودن مراحل تخلیص پروتئین نیز بود (داده‌ها نشان داده نشده است). بر اساس نتایج ارسالی از طرف انستیتو پاستور ایران، مقدار لیپوپلی‌ساکارید باقی‌مانده در نمونه‌ها، کمتر از حداکثر مقدار مجاز [۵ Endotoxin unit (EU)] بود و بنابراین، نمونه‌ها جهت مطالعات حیوانی بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی سمیت غیر اختصاصی فیوژن پروتئین DT386-BR2

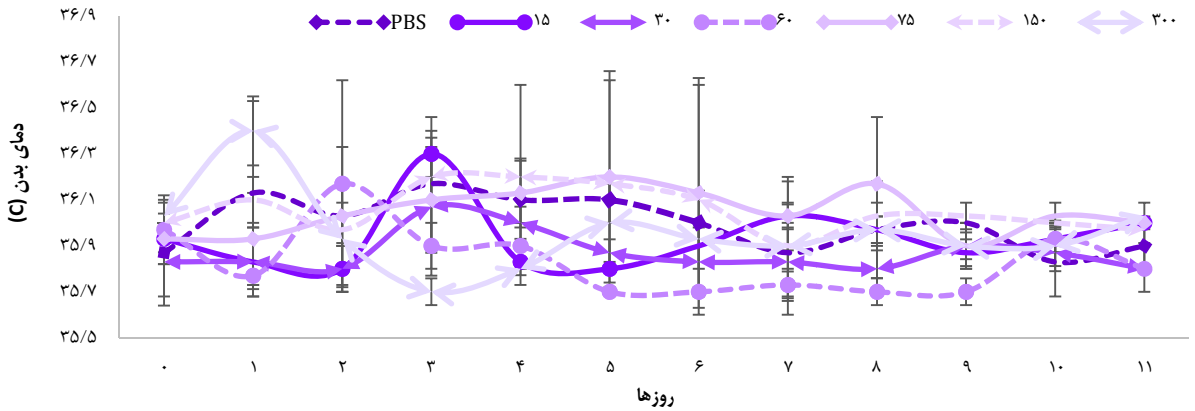
آزمون‌های ANOVA و Tukey نشان دادند که تزریق فیوژن پروتئین در هیچ کدام از غلظت‌ها، منجر به بروز تب و افزایش دما در هیچ یک از گروه‌های مورد در مقایسه با گروه شاهد منفی نشد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۲).

همچنین، ارزیابی روزانه‌ی موش‌هایی که مورد تزریق با دز ثابتی از فیوژن پروتئین قرار گرفته بودند، نشان داد که با گذشت زمان و استفاده از دزهای مکرر، هیچ افزایش دمایی در موش‌های گروه مورد (که تحت تزریق با بالاترین غلظت از فیوژن پروتئین قرار گرفتند و دمای متوسط بدن آن‌ها ۳۵/۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد بود) نسبت به شاهد منفی (به طور متوسط دمای ۳۶ درجه‌ی سانتی‌گراد) مشاهده نمی‌شود ($P > ۰/۰۵$).

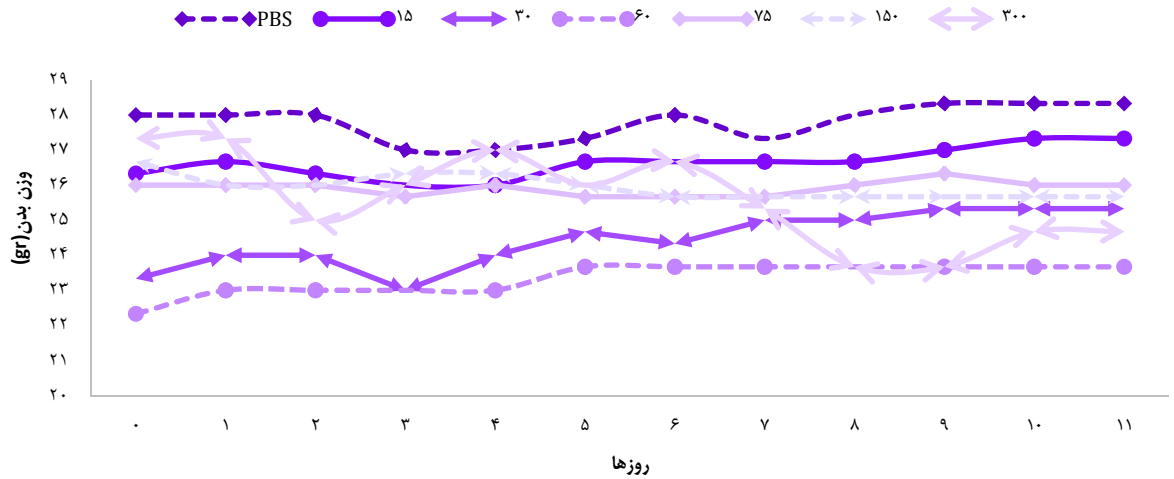


شکل ۱. آنالیز ژل Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) پروتئین نوترکیب بیان شده. خط ۱: نشانگر پروتئینی با وزن مولکولی مشخص. خط ۲: باکتری Escherichia coli BL21 (DE3) حاوی وکتور نوترکیب pET28a-DT386-BR2 قبل از القا به وسیله‌ی Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). خط ۳: باکتری Escherichia coli BL21 (DE3) (DE3) حاوی وکتور نوترکیب pET28a-DT386-BR2 بعد از القا به وسیله‌ی IPTG.

همچنین، آنالیز داده‌های مربوط به وزن موش‌ها نشان داد که با افزایش غلظت فیوژن پروتئین تزریقی، هیچ کاهش وزن معنی‌داری در موش‌ها مشاهده نمی‌شود و ارزیابی موش‌هایی که با یک دز ثابت از فیوژن پروتئین مواجه شده بودند، نشان داد که در طول زمان، کاهش وزنی در این موش‌ها دیده نشد ($P > ۰/۰۵$) (شکل ۳).



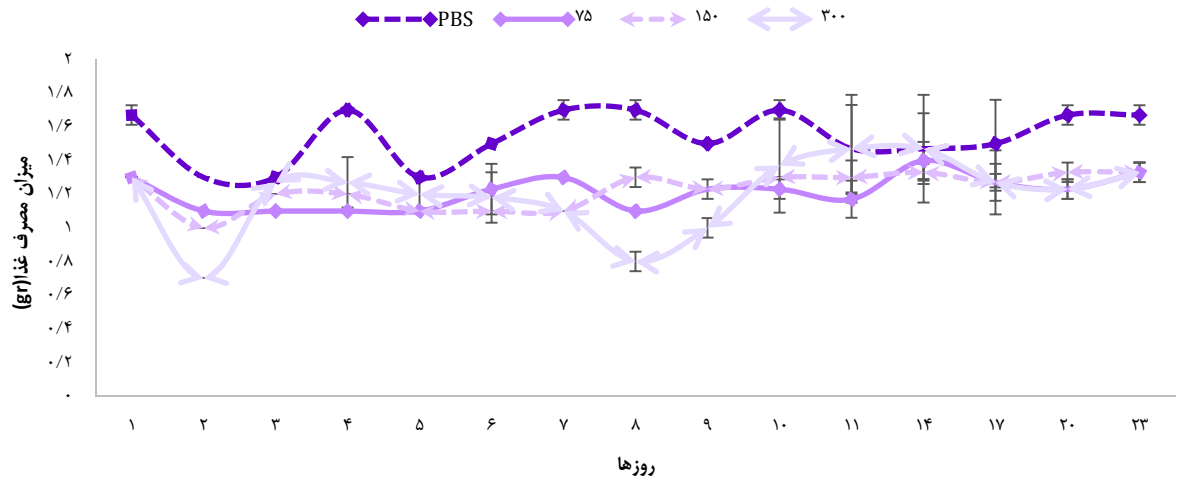
شکل ۲. تأثیر تزریق داخل صفاقی غلظت‌های مختلف از فیوژن پروتئین DT386-BR2 بر روی دمای بدن موش‌ها. تغییر معنی‌داری روی دمای بدن موش‌هایی که با غلظت‌های مختلف از فیوژن پروتئین (۱۵، ۳۰، ۶۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم/روز) مورد تزریق قرار گرفتند، در مقایسه با موش‌های گروه شاهد منفی مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$). داده‌ها مربوط به بعد از اولین تزریق تا یک هفته بعد از پنجمین تزریق می‌باشد. داده‌ها مربوط به میانگین دمای سه موش در هر گروه است.



شکل ۳. تأثیر تزریق داخل صفاقی غلظت‌های مختلف از فیوژن پروتئین DT386-BR2 بر روی وزن بدن موش‌ها. تغییر معنی‌داری روی وزن بدن موش‌هایی که با غلظت‌های مختلف از فیوژن پروتئین (۱۵، ۳۰، ۶۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم/روز) مورد تزریق قرار گرفتند، در مقایسه با موش‌های گروه شاهد منفی مشاهده نشد ($P > ۰/۰۵$). داده‌ها مربوط به بعد از اولین تزریق تا یک هفته بعد از پنجمین تزریق می‌باشد. داده‌ها مربوط به میانگین وزن سه موش در هر گروه است.

آنالیزهای داده‌های مربوط به میزان مصرف غذا در موش‌ها، نشان داد که با افزایش غلظت فیوژن پروتئین تزریقی به موش‌ها، میزان مصرف غذا نسبت به موش‌های گروه شاهد کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$). در موش‌های گروه شاهد به طور متوسط مقدار مصرف غذا در طول زمان برابر با ۱/۵۴ گرم بود که در مقایسه با موش‌های دریافت کننده‌ی بالاترین غلظت از فیوژن پروتئین که میزان مصرف غذای روزانه‌ی آن‌ها به طور متوسط ۱/۲ گرم بود، به طور معنی‌داری بیشتر بود. از طرفی، در موش‌هایی که دز ثابتی از فیوژن پروتئین را دریافت کرده بودند، در طول ۱۵ روز بررسی، میزان مصرف غذای موش‌ها کاهش معنی‌داری نشان نداد (شکل ۴).

در مورد قابلیت بقای موش‌ها، مشاهدات حاکی از آن بود که با گذشت زمان و افزایش غلظت فیوژن پروتئین، هیچ کدام از موش‌ها دچار مرگ و میر نشدند. بنابراین، فیوژن پروتئین مورد بررسی، فاقد سمیت غیر اختصاصی بر روی موش‌های سالم می‌باشد.



شکل ۴. تأثیر تزریق داخل صفاقی غلظت‌های مختلف از فیوژن پروتئین DT386-BR2 بر روی میزان مصرف غذای موش‌ها. همان‌طور که در نمودار نیز مشهود است، با افزایش غلظت پروتئین تزریقی به موش‌های گروه مورد، میزان مصرف غذا نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. این در حالی است که میزان مصرف غذا در موش‌های یک گروه در طول زمان و با افزایش دزهای تزریقی، تغییر معنی‌داری نداشت ($P > ۰/۰۵$). داده‌ها مربوط به بعد از اولین تزریق تا دو هفته بعد از پنجمین تزریق می‌باشد. داده‌ها مربوط به میانگین مصرف غذای سه موش در هر گروه است.

بحث

هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی سمیت غیر اختصاصی و ایمنی فیوژن پروتئین DT386-BR2 به عنوان یک داروی شیمی‌درمانی بر روی موش‌های سالم بود که به صورت هدفمند باعث مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود.

سلول‌های موشی در حالت طبیعی نسبت به توکسین دیفتری حتی در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم مقاوم هستند که این به دلیل عدم حضور گیرنده‌های توکسین دیفتری بر روی سلول‌های موشی می‌باشد (۱۱)؛ به گونه‌ای که در مطالعه‌ای، موش‌های ترانس‌ژنیک که در آن‌ها توانایی تولید نوترکیب گیرنده‌ی توکسین دیفتری القا شده بود، نسبت به توکسین دیفتری حساسیت بالایی کسب کردند تا حدی که این موش‌ها، در مواجهه با توکسین دیفتری با غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر کیلوگرم، دچار مرگ شدند (۱۳-۱۲). در حالی که این دز، با دز حساس برای انسان و سایر موجودات حساس به توکسین دیفتری، برابر است.

موش‌های ترانس‌ژنیک که به این صورت تولید شدند، بعدها به عنوان مدلی برای مطالعه‌ی جنبه‌های مختلف توکسین دیفتری مورد استفاده قرار گرفتند (۱۲)، اما در مطالعه‌ی حاضر با توجه به این که نفوذ فیوژن پروتئین DT386-BR2 به داخل سلول‌های سرطانی به حضور BR2 در این پروتئین نسبت داده می‌شود، از موش‌های سالم به عنوان حیوان آزمایشگاهی مناسب جهت ارزیابی سمیت غیر اختصاصی فیوژن پروتئین ذکر شده استفاده گردید؛ چرا که انتظار می‌رود این فیوژن پروتئین به داخل سلول‌های طبیعی قابلیت نفوذ نداشته باشد و ورود آن به صورت اختصاصی به داخل سلول‌های سرطانی و آن هم از طریق قسمت BR2 انجام شود.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که موش‌هایی که غلظت‌های افزایشی از فیوژن پروتئین DT386-BR2 دریافت کرده بودند، حتی در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در روز که معادل ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم/روز بود نیز تغییری از نظر دمای بدن، وزن بدن و میزان مرگ و میر نشان ندادند. باید توجه نمود که دز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم/روز، بسیار بالاتر از دز قابل تحمل از توکسین دیفتری طبیعی در موش‌ها می‌باشد که برابر ۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم است (۱۴).

همچنین، با توجه به این که دز کشنده‌ی توکسین دیفتری طبیعی در انسان ۱۰۰ نانوگرم بر کیلوگرم است، می‌توان این فیوژن پروتئین هدفمند شده را با توجه به ایمنی بالای آن در مراحل بعدی مطالعات پیش‌بالینی در مدل‌های حیوانی زنوگرافت واجد تومورهای انسانی مورد بررسی قرار داد تا از جهت ریشه‌کن سازی سلول‌های سرطانی بدون تأثیر سوء بر روی سلول‌های سالم ارزیابی گردد.

نتیجه‌گیری نهایی این که ایمنوتوکسین DT386-BR2 که اثرات ضد تکثیری آن بر روی سلول‌های سرطانی به اثبات رسیده و فاقد مسایل ایمنی بر روی موش‌های سفید سالم حساس به این پروتئین است، می‌تواند برای مطالعات بیشتر پیش بالینی و بالینی به عنوان یک کاندیدای مناسب داروی هدفمند ضد سرطان مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دکتری عمومی داروسازی به شماره‌ی طرح تحقیقاتی ۱۹۳۰۳۸ می‌باشد در دانشکده‌ی داروسازی تصویب و با حمایت مالی معاونت پژوهش و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از زحمات سرکار خانم فاطمه مؤذن کارشناس آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی دارویی به خاطر همکاری فنی ایشان قدردانی کنند.

References

1. Reiter Y. Recombinant immunotoxins in targeted cancer cell therapy. Adv Cancer Res 2001; 81: 93-124.
2. Bustillo ME. A Modular Approach to the characterization of histone H2A-derived antimicrobial peptides [Thesis]. Wellesley, MA: Wellesley College; 2013.
3. Pavia KE, Spinella SA, Elmore DE. Novel histone-derived antimicrobial peptides use different antimicrobial mechanisms. Biochim Biophys Acta 2012; 1818(3): 869-76.
4. Lee HS, Park CB, Kim JM, Jang SA, Park IY, Kim MS, et al. Mechanism of anticancer activity of buforin IIb, a histone H2A-derived peptide. Cancer Lett 2008; 271(1): 47-55.
5. Shapira A, Benhar I. Toxin-based therapeutic approaches. Toxins (Basel) 2010; 2(11): 2519-83.
6. Lim KJ, Sung BH, Shin JR, Lee YW, Kim DJ, Yang KS, et al. A cancer specific cell-penetrating peptide, BR2, for the efficient delivery of an scFv into cancer cells. PLoS One 2013; 8(6): e66084.
7. Shafiee F, Rabbani M, Jahanian-Najafabadi A. Production and evaluation of cytotoxic effects of DT386-BR2 fusion protein as a novel anti-cancer agent. J Microbiol Methods 2016; 130: 100-5.
8. Savar NS, Jahanian-Najafabadi A, Mahdavi M, Shokrgozar MA, Jafari A, Bouzari S. In silico and in vivo studies of truncated forms of flagellin (FliC) of enteroaggregative Escherichia coli fused to FimH from uropathogenic Escherichia coli as a vaccine candidate against urinary tract infections. J Biotechnol 2014; 175: 31-7.
9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein

utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
10. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 7th ed. Washington, DC: The National Academies Press; 2010.
11. Cha JH, Brooke JS, Eidels L. Toxin binding site of the diphtheria toxin receptor: loss and gain of diphtheria toxin binding of monkey and mouse heparin-binding, epidermal growth factor-like growth factor precursors by reciprocal site-directed mutagenesis. Mol Microbiol 1998; 29(5): 1275-84.
12. Cha JH, Chang MY, Richardson JA, Eidels L. Transgenic mice expressing the diphtheria toxin receptor are sensitive to the toxin. Mol Microbiol 2003; 49(1): 235-40.
13. Saito M, Iwawaki T, Taya C, Yonekawa H, Noda M, Inui Y, et al. Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. Nat Biotechnol 2001; 19(8): 746-50.
14. Holmes RK. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. J Infect Dis 2000; 181(Suppl 1): S156-S167.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 28.06.2017
Vol. 35, No. 433, 1st Week, August 2017
Accepted: 12.07.2017

In-vivo Evaluation of DT386-BR2, A Promising Anticancer Fusion Protein, in Mice Model

Fatemeh Shafiee[1], Razieh Enteshari[2], Mohammad Rabbani[3], Ali Jahanian-Najafabadi[4]

Original Article

Abstract

Background: Cancer is one of the greatest health-related problems and due to increasing drug resistance and severe side effects of chemotherapeutic agents, production of targeted anticancer agents with lower side effects is under consideration. Previously, we produced a fusion protein consisted of catalytic and translocation domains of diphtheria toxin (DT386) fused to BR2, a cancer specific cell penetrating peptide. First steps of this study showed selective antiproliferative effects of DT386-BR2 on cancer cells but not on normal cell lines. The aim of the present study was evaluation of its in-vivo non-specific toxicity in healthy mice.

Methods: The fusion protein was produced and purified through recombinant DNA technology. Intraperitoneal injections with various concentrations of DT386-BR2 were done in healthy mice for five consecutive days and they observed for 14 days after the last injection inspecting their food consumption, body weight, body temperature, and finally being dead or alive. Negative controls were injected with normal saline solution.

Findings: There was not any significant effect on temperature, body weight, and viability of mice received various concentrations of DT386-BR2 ($P < 0.05$), and increasing the protein concentration did not show any adverse effects on mice.

Conclusion: DT386-BR2 can be used for further pre-clinical studies to determine its pharmacokinetics/pharmacodynamics profiles and evaluation of its anticancer efficacy in suitable xenograft animal models.

Keywords: Immunotoxins, Diphtheria toxin, Toxicity, Mice

Citation: Shafiee F, Enteshari R, Rabbani M, Jahanian-Najafabadi A. **In-vivo Evaluation of DT386-BR2, A Promising Anticancer Fusion Protein, in Mice Model.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(433): 655-61.

1- Pharmaceutical Biotechnologist, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Student of Pharmacy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology AND Bioinformatics Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Ali Jahanian-Najafabadi, Email: jahanian@pharm.mui.ac.ir