



[10.61186/gebsj.12.2.262](https://doi.org/10.61186/gebsj.12.2.262)

Research Article

Genetic Engineering and Biosafety
Journal 2024

Volume 12, Number 2, Pages: 262-280

<http://gebsj.ir/>

<https://ecc.isc.ac/showJournal/23064>

اینترفرون گامای انسانی (γ -hIFN): تولید نو ترکیب در سیستم‌های بیانی مختلف و کاربردهای بالینی آن

Human interferon gamma (γ -hIFN): Heterologously production in different expression systems and its clinical applications

نرجس اکبری^۱، رحیم حداد^{۲*}، رضا حیدری جاپلغی^۳، نعمت‌اله غیبی^۴

Narjes Akbari¹, Raheem Haddad^{2,*}, Reza Heidari-Japelaghi³, Nematollah
Gheibi⁴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، ۲- دانشیار گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع

طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۳- دانش‌آموخته دکتری تخصصی بیوتکنولوژی گیاهی از دانشگاه تبریز و کارشناس گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده

کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۴- دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

1- M.Sc. student in Agricultural Biotechnology, 2- Associate Professor, Department of
Biotechnology Engineering, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Imam Khomeini
International University, Qazvin, Iran.

3- Former Ph.D. Student in Plant Biotechnology from University of Tabriz. Expert,
Department of Biotechnology Engineering, Faculty of Agricultural and Natural Resources,
Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

4- Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Paramedical
Sciences, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

*Corresponding Author, Email: r.haddad@eng.ikiu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۷)

Received: 2023/05/22 | Accepted: 2023/08/29 | Published: 2024/03/14

چکیده

واژه‌های کلیدی

γ -hIFN

کارآزمایی بالینی،

ایمنی درمانی سرطان،

پروتئین نو ترکیب،

سیستم بیانی

اینترفرون گامای انسانی (γ -hIFN) به عنوان یک سیتوکین پلی‌تروپیک، علاوه بر تنظیم پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی، جهت فعالیت بیشتر سلول‌های ایمنی بدن به ویژه ماکروفاژها و لمفوسیت‌های T ضروری است. این سیتوکین ابتدا به عنوان یک عامل ترشحی مختل‌کننده تکثیر ویروس کشف و نام‌گذاری شد. γ -hIFN نقش‌های متعددی در تنظیم سیستم ایمنی و دفاع در برابر دامنه وسیعی از عوامل بیماری‌زا از قبیل آلودگی‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی بازی می‌کند. در سال ۱۹۸۶، اولین کارآزمایی‌های بالینی γ -IFN به منظور ارزیابی نقش دارویی بالقوه آن آغاز شد. مطالعات اولیه روی قابلیت پذیرش، داروشناسی و تعیین فعالیت‌های ضدتوموری و ضدعفونت متمرکز شد. امروزه γ -IFN نو ترکیب برای درمان بیماری‌های گرانولوماتوز مزمن و پوکی استخوان مادرزادی به اثبات رسیده و کاربردش به عنوان یک عامل ایمنی‌درمانی در برابر سرطان و اختلالات ارثی و خودایمنی امیدوارکننده است. γ -hIFN در سیستم‌های بیانی مختلف شامل پروکاریوت‌ها، پروتوزوا، مخمر، گیاهان، حشرات و سلول‌های پستانداران به شکل نو ترکیب بیان شده است. با این وجود، این سیستم‌های بیانی نتایج رضایت‌بخشی را از نظر عملکرد، فعالیت زیستی و صرفه اقتصادی نشان ندادند. بنابراین، یافتن یک سیستم بیانی کارآمد جهت تولید پروتئین نو ترکیب γ -hIFN گلیکوزیله با خاوردگی صحیح، فعال از نظر زیستی و نیمه‌عمر بالا در خون بسیار ضروری است. این مقاله مروری تلاش می‌کند تا آگاهی موجود از پژوهش‌های قبلی در زمینه تولید پروتئین نو ترکیب γ -hIFN را جمع‌آوری کرده و مسیری را برای پژوهش‌های آینده در این زمینه فراهم کند.

Akbari N, Haddad R, Heidari Japelaghi R, Gheibi N. Human interferon gamma (γ -hIFN): Heterologously production in different expression systems and its clinical applications. Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023; 12 (2): 262-280. Doi: [10.61186/gebsj.12.2.262](https://doi.org/10.61186/gebsj.12.2.262)

URL: <http://gebsj.ir/article-1-459-fa.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 2, 2024

Abstract

Human interferon gamma (hIFN- γ) as a pleiotropic cytokine, modulates both innate and adaptive immune networks and is important to the function of virtually most immune cells such as macrophages and T lymphocytes. It was originally discovered, and named, as a secretory factor that interferes with viral replication. The hIFN- γ has a multitude of roles in immune modulation and broad-spectrum pathogen defense including fungal, bacterial, and viral infections. In 1986, early clinical trials of IFN- γ initiated to evaluate its therapeutic potential. The initial studies focused on the tolerability and pharmacology of IFN- γ and systematically determined its antitumor and anti-infection activities. Nowadays, it has been approved for treatment of chronic granulomatous disease and malignant osteopetrosis, and its application as an immunotherapeutic agent against cancer and inherited and autoimmune disorders is an increasing prospect. The hIFN- γ has been heterologously expressed in different expression systems including prokaryotic, protozoan, fungal (yeasts), plant, insect and mammalian cells. However, these expression systems did not reveal satisfactory results in terms of yield, the biological activity of the recombinant protein or economic viability. Thus, it is essential to find an efficient expression system to produce glycosylated recombinant hIFN- γ with correct folding, biologically active and a high half-life in the bloodstream. The review aims to gather available information from previous studies on the production of hIFN- γ and provides direction to future researches in this field.

Key words: hIFN- γ , Clinical trials, Cancer Immunotherapy, Recombinant protein, Expression system

مقدمه

IFNها، به ویژه IFN- γ ، توسط سلول‌های ایمنی بدن مانند منوسیت‌ها و لمفوسیت‌ها ترشح شده و به طور معمول جهت درمان بیماری‌های ویروسی و برخی سرطان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. این پروتئین‌های گلیکوزیله به دلیل داشتن فعالیت‌های ضدویروسی و ضدتوموری برای استفاده بالینی به منظور درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌های ویروسی به ویژه COVID-19 و انواع مختلف سرطان از اهمیت بالایی برخوردار هستند (Jorgovanovic *et al.*, 2020; Myasnikov *et al.*, 2021). به دلیل اهمیت و کاربرد چشمگیر اینترفرون‌ها در بخش پزشکی و درمان بسیاری از بیماری‌های ویروسی و انواع سرطان، تولید مقادیر بالایی از آن‌ها بیش از پیش احساس می‌شود. بنابراین، یافتن یک میزبان ایده‌آل یکی از نیازهای اساسی در زمینه تولید اینترفرون‌های نوترکیب به ویژه IFN- γ است که این امر نیازمند انجام پژوهش‌های بیشتر برای جستجوی یک سیستم بیانی کارآمد و مناسب است. این پژوهش‌ها علاوه بر جنبه‌های تجاری مهم مانند عملکرد، کارایی سیستم و فرآیند خالص‌سازی، باید سایر عوامل از قبیل فعالیت زیستی، الگوهای گلیکوزیلاسیون و اندازه مولکولی محصول پروتئینی را نیز مورد توجه قرار دهند

اینترفرون‌ها (Interferon, IFN) انواعی از پروتئین‌های شبه-هورمونی تحت عنوان سیتوکین‌ها (Cytokine) هستند که در تحریک سیستم ایمنی بدن پستانداران در برابر عوامل بیماری‌زا از جمله ویروس‌ها نقش دارند. این پروتئین‌های گلیکوزیله به طور جداگانه توسط دو گروه پژوهشی در دهه ۱۹۵۰ کشف شدند. پس از شناسایی توانایی ایجاد اختلال در برابر تکثیر ویروس آنفلوانزا در سلول‌های آلوده، تحت عنوان اینترفرون نام‌گذاری شدند. در دهه‌های بعدی، جزئیات اینترفرون‌ها از جمله سازوکار-های القاء رونویسی، خواص ضدویروسی، فعالیت‌های ضدویروسی و کاربردهای درمانی‌شان در برابر انواع بیماری‌ها به طور دقیق مورد مطالعه قرار گرفتند. به دنبال آن، تلاش‌ها برای همسانه‌سازی و بیان ژن‌های اینترفرون در بسیاری از سیستم‌های بیانی مختلف مانند *Escherichia coli*، سلول‌های پستانداران، مخمر، پروتوزوا و گیاهان تراریخته انجام شد، اما تنها سیستم بیانی *E. coli* به دلیل کارایی و عملکرد بالا در کانون توجه دانشمندان قرار گرفت (Wirusanti *et al.*, 2022).

IFNهای نوع III حاوی IFN- λ 1، IFN- λ 2 و IFN- λ 3 هستند که قبلاً به عنوان اینترلوکین‌های (Interleukin, IL) ۲۹، ۲۸A و ۲۸B شناخته می‌شدند. ژن‌های این گروه از IFNها در یک خوشه روی کروموزوم شماره ۱۹ انسان قرار گرفته و از گیرنده هتروداایمری IL10R2/IFNLR1 استفاده می‌کنند. این گروه از IFNها به طور مستقیم یا توسط ویروس‌ها تحریک شده و یا به وسیله IFN- α یا IFN- λ القاء می‌شوند. بنابراین، آن‌ها به عنوان ژن‌های تحریک شده با IFN شناخته می‌شوند (Premzl, 2020).

تولید و ترشح hIFN- γ

پروتئین hIFN- γ به طور طبیعی توسط لنفوسیت‌های CD4⁺ T، لنفوسیت‌های سیتوتوکسی CD8⁺ و سلول‌های کشنده طبیعی (Natural killer, NK) ساخته می‌شود. همچنین به وسیله سلول‌های دیگری مانند سلول‌های B، سلول‌های NKT و سلول‌های ارائه دهنده پادتن‌های اختصاصی (Professional antigen-presenting cells, APCs) ترشح می‌شود. ترشح hIFN- γ توسط سلول‌های NK و APC در واکنش‌های اولیه میزبان در برابر عفونت مهم است، در حالی که تولید hIFN- γ توسط لنفوسیت‌های T در واکنش سازگار ایمنی اهمیت دارد (Gyurova et al., 2020).

hIFN- γ و ترانس‌اسانی پیام

به طور کلی، hIFN- γ دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضدویروسی و ضدتوموری بوده و در میان‌کنش‌های پیچیده سوخت و ساز سلولی و تمایز دخیل است. دو زیر واحد گیرنده برای hIFN- γ وجود دارد: IFNGR- α یا IFNGR1 (به عنوان جایگاه اتصال) و IFNGR- β یا IFNGR2 (دخیل در ترانس‌اسانی پیام) (شکل ۱). گیرنده دارای یک ساختار تترامر متشکل از دو مولکول IFNGR- α و IFNGR- β است. هر دو زیر واحد به دُمین-های اتصال یانوس کیناز ۱ (Janus kinase, JAK1) و یانوس کیناز ۲ (JAK2) متصل می‌شوند. با اتصال لیگاند-گیرنده، فسفوریلاسیون انتهای سیتوپلاسمی مولکول‌های گیرنده توسط کینازهای JAK رخ می‌دهد. اتصال لیگاند-گیرنده منجر به فعال سازی مولکول‌های درگیر در ترانس‌اسانی پیام و فعال‌کننده‌های رونویسی (The signal transducers and activators of

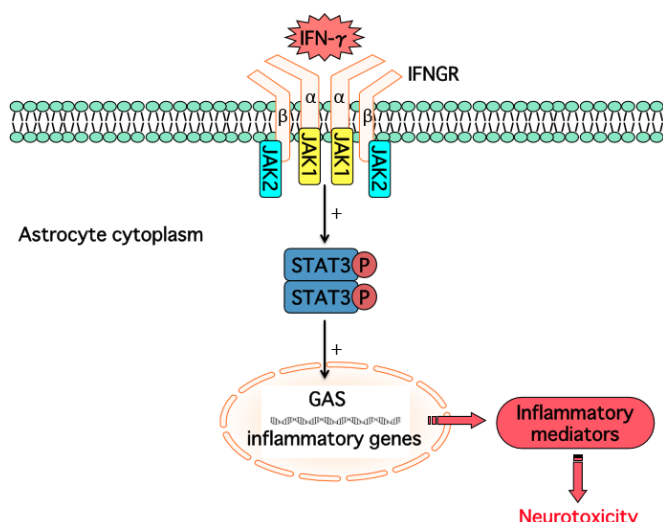
Razaghi et al., 2016a). در این مقاله مروری سعی بر آن است تا ضمن بیان نقش‌های فیزیولوژیکی IFN- γ در سلول‌های انسانی، نحوه ترانس‌اسانی پیام و ویژگی‌های ساختاری آن مورد توجه قرار گرفته و علاوه بر ذکر انواع سیستم‌های بیانی مورد استفاده جهت تولید پروتئین نوترکیب IFN- γ انسانی (hIFN- γ) و مقایسه این سیستم‌ها، جدیدترین کاربردهای بالینی آن جهت درمان انواع بیماری‌های ویروسی و سرطان‌ها نیز بیان شود.

انواع IFNها

IFNها، سیتوکین‌هایی هستند که توسط گروه متنوعی از ژن‌ها بیان می‌شوند. این ژن‌ها از مهره‌داران مختلف شامل پستانداران، پرندگان، ماهی‌ها و حتی دوزیستان جداسازی و همسانه‌سازی شده‌اند. پروتئین‌های ترجمه شده از این ژن‌ها به طور معمول بین ۱۶۵ تا ۲۰۸ اسیدآمینه طول داشته و فرآیند تغییرات پس از ترجمه آن‌ها عمدتاً شامل N-گلیکوزیلاسیون است (Bolko et al., 2021). در پستانداران، IFNها بر اساس توالی اسیدآمینه و گیرنده-هایشان به سه گروه اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند (جدول ۱):

IFNهای نوع I که به عنوان IFNهای ویروسی نیز شناخته می‌شوند (به علت تولید توسط عفونت ویروسی)، شامل بسیاری از زیرگونه‌های IFN- α (مشتق از لکوسیت‌ها)، IFN- β (مشتق از فیروبلست‌ها)، IFN- ω (حاصل از لکوسیت‌ها)، IFN- τ (از تروفوبلاست تخم مرغ)، IFN- ϵ ، IFN- κ و IFN- δ است. تمام انواع ژن-های IFN نوع I در خوشه‌ای روی کروموزوم شماره ۹ انسان قرار داشته و همگی با گیرنده هتروداایمر IFN- α/β (IFNAR) تعامل دارند.

IFNهای نوع II یا IFNهای ایمنی تنها شامل IFN- γ است که با دیگر IFNها متفاوت بوده و از گیرنده‌های هتروداایمری مجزایی تحت عنوان IFNGR استفاده می‌کنند. این گروه از IFNها توسط IFN- α و IFN- β (در مورد عفونت ویروسی) یا IFN- γ (در مورد محرک‌های میتوزی یا آنتی‌ژنیک) القاء می‌شوند. در مقایسه با سایر IFNها، IFN- γ دارای فعالیت زیستی به میزان ۱۰۰ تا ۱۰،۰۰۰ برابر سایر IFNها هستند.



شکل ۱- ساختار گیرنده IFNGR1/IFNGR2 و مسیر ترانساسی پیام IFN- γ در داخل سلول انسانی (Hashioka *et al.*, 2015).

Figure 1- IFNGR1/IFNGR2 structure and IFN- γ signal transduction in human cell (Hashioka *et al.*, 2015)

JAK (transcription, STAT) می‌شود که خود توسط کینازهای فسفریله و فعال می‌شوند. سپس مولکول‌های گیرنده، STAT‌های فسفریله شده را آزاد کرده و پس از انتقال به هسته، ژن‌های القاء‌شده با IFN یا عامل تنظیم‌شده با IFN را از طریق اتصال به توالی فعال‌شده با IFN- γ (γ-activated sequence, GAS) فعال می‌کنند. پروتئین‌های حاصل از ژن‌های تحریک‌شده با IFN، عفونت ویروسی را محدود کرده و ایمنی میزبان را افزایش می‌دهند. هنگامی که عفونت ویروسی به طور کامل از بین رفت، پاسخ IFN قبل از اینکه به سلول میزبان آسیب برساند توسط یک واکنش بازخورد (Feedback loop) مهار می‌شود (Hashioka *et al.*, 2015). به تازگی، ساختار کریستالی IFNGR-β، اهمیت N-گلیکوزیلاسیون را برای پایداری ساختاری و فعالیت اختصاصی نشان داده است (Mikulecky *et al.*, 2016).

جدول ۱- انواع IFN‌ها در انسان با موقعیت کروموزومی و شماره دستیابی NCBI GenBank

Table 1- Human IFNs with chromosomal locations and NCBI GenBank accession Nos.

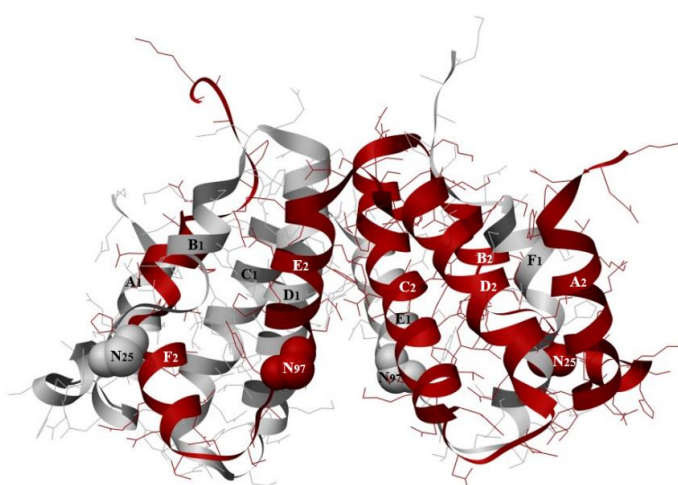
Type	Sub-type	Gene	Accetion No. (NCBI GenBank)	Chromosomal position	ORF (bp)	Protein (aa)	Molecular weight (Da)
I	α	hIFN- α 1/13	BC112302	9p22	570	189	19386.14
		hIFN- α 2	BC104164	9p22	567	188	19269.12
		hIFN- α 4	BC113640	9p22	570	189	19409.04
		hIFN- α 5	BC093757	9p22	570	189	19694.49
		hIFN- α 6	BC096730	9p22	570	189	20060.93
		hIFN- α 7	BC114000	9p22	570	189	19606.43
		hIFN- α 8	BC104830	9p22	570	189	19484.28
		hIFN- α 10	BC103972	9p22	570	189	19406.13
		hIFN- α 14	BC104159	9p22	570	189	19707.64
		hIFN- α 16	M28585	9p22	570	189	19282.04
	β	hIFN- β	BC098355	9p22	570	189	19299.02
		hIFN- β	BC101638	9p22	570	189	19312.09
		hIFN- β	M25460	9p21.3	564	187	19983.94
		hIFN- β	BC100872	9p21.3	627	208	22093.55
		hIFN- β	AY358855	9p21.2	624	207	22196.45
		hIFN- β	L25664		588	195	19620.33
II	γ	hIFN- γ	BC117290	9p21.3	588	195	20155.39
		hIFN- γ	α 21	12q14	501	166	16776.15
		hIFN- γ	V00543	19q13.2	603	200	20018.05
		hIFN- γ	BC074985	19q13.2	603	200	19754.90
	λ	hIFN- λ 1	BC113581	19q13.2	591	196	19584.72
		hIFN- λ 2	AY336717	19q13.2	540	179	17478.28
		hIFN- λ 3	JN806234				
		hIFN- λ 4					
		hIFN- λ 5					
		hIFN- λ 6					
		hIFN- λ 7					
		hIFN- λ 8					
		hIFN- λ 9					
		hIFN- λ 10					

فعالیت زیستی پروتئین نو ترکیب تا ۱۰ برابر شد (Nacheva et al., 2003).

(الف)



(ب)



شکل ۲- توالی و ساختار سه بعدی hIFN- γ (الف) توالی اسید آمینه‌ای hIFN- γ با توالی پپتید راهنما، جایگاه‌های N-گلیکوزیلاسیون، اسید آمینه His₁₁₁ و دُمین محافظت شده واقع در انتهای کربوکسیل (Razaghi et al., 2016a). (ب) ساختار سه بعدی پروتئین همودایمری متقارن hIFN- γ (Heidari-Japelaghi et al., 2019a).

Figure 2- Sequence and 3D structure of hIFN- γ . **A)** Amino acid sequence of hIFN- γ with signal peptide, N-glycosylation sites, His₁₁₁, and conserved domain in C terminal (Razaghi et al., 2016a). **B)** The 3D structure of symmetrical homodimeric hIFN- γ (Heidari-Japelaghi et al., 2019a).

فرآیند گلیکوزیلاسیون پروتئین hIFN- γ

گلیکوزیلاسیون یکی از فرآیندهای تغییرات پس از ترجمه‌ای است که در بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی مشاهده شده و نقش مهمی در واکنش‌های انتقال خون، ایجاد چسبندگی در لکوسیت اندوتلیال (Leukocyte endothelial)، میان‌کنش‌های

توالی و ساختار پروتئین hIFN- γ

hIFN- γ توسط یک ژن پیش‌ساز با اندازه ۱۲۴۰ bp حاوی چهار اگزون که روی بازوی بزرگ کروموزوم شماره ۱۲ قرار دارد، رمز می‌شود. ژن پیش‌ساز، رمزگردان یک پیش‌پروتئین با ۱۶۶ اسید آمینه است که ۲۳ اسید آمینه واقع در انتهای آمینوی آن به عنوان یک پپتید راهنما عمل می‌کند. پروتئین فعال از نظر زیستی، یک گلیکوپروتئین با ۱۴۳ اسید آمینه بوده و دارای دو جایگاه N-گلیکوزیلاسیون با وزن مولکولی تقریباً ۳۸/۸ kDa در حالت همودایمر است (Razaghi et al., 2016a) (شکل ۲ الف).

الگوی تاخوردگی پروتئین hIFN- γ به طور کامل منحصر به فرد است. پروتئین hIFN- γ دارای ساختار همودایمر متقارن است که هر مونومر آن شامل ۶ عدد مارپیچ α با طولی در حدود ۲۱-۹ اسید آمینه است. چهار مارپیچ A₁, B₁, C₁ و D₁ از یک زیر واحد و E₂ و F₂ از زیر واحد دیگر با یکدیگر میان‌کنش می‌کنند تا یکی از دو دُمین مجزا و متقارن پروتئین را تشکیل دهند. دو دُمین در زاویه ۵۵ درجه نسبت به هم قرار داشته و با یک شکاف V شکل از هم جدا می‌شوند (شکل ۲ ب). یک مارپیچ تصادفی بزرگ به طول ۱۶-۲۷ اسید آمینه تحت عنوان حلقه AB، مارپیچ‌های A و B واقع در انتهای آمینوی پروتئین را به هم وصل می‌کند. اهمیت عملکردی مارپیچ A و حلقه AB جهت عدم تاخوردگی و پایداری ترمودینامیکی پروتئین hIFN- γ به اثبات رسیده است. مارپیچ A برای تعامل با لیگاند-گیرنده و در نتیجه فعالیت زیستی hIFN- γ نیز ضروری است. سه ناحیه دیگر در میان‌کنش لیگاند-گیرنده شناسایی شده‌اند: حلقه AB، His₁₁₁ واقع در مارپیچ F و یک ناحیه محافظت شده واقع در انتهای کربوکسیل (Heidari-Japelaghi et al., 2019a). انتهای کربوکسیل پروتئین hIFN- γ بسیار متغیر بوده و از Pro₁₂₂ تا Gln₁₄₃ گسترش می‌یابد. نشان داده شده است که کوتاه شدن انتهای کربوکسیل باعث کاهش عملکرد به دلیل افزایش حلالیت پروتئین نو ترکیب می‌شود. علاوه بر این، کوتاه شدن کل انتهای کربوکسیل و یا حذف بیش از ۹ اسید آمینه، فعالیت زیستی پروتئین نو ترکیب را کاهش می‌دهد. اما حذف ۳، ۶ و ۹ اسید آمینه از انتهای کربوکسیل باعث افزایش

قابل توجهی در ساختارهای کربوهیدرات (با بیش از ۳۰ شکل مختلف) می‌شود. گلیکان‌ها در Asn₂₅ شامل الیگوساکاریدهای پیچیده فوکوزیله شده است که عمدتاً از ترکیب قندی N-استیل اسید نئورامینیک، گالاکتوز، مانوز، N-استیل گلوکوزآمین و فوکوز (در حدود ۴۱ درصد) تشکیل شده است. این نوع ترکیب قندی جهت ایجاد مقاومت به پروتئازها از جمله کاتپسین G، پروتئازهای گرانولیسیتی، پلاسمین و الاستاز بسیار ضروری است. در مقابل، گلیکان‌ها در Asn₉₇ بیشتر ناهمگن هستند، با ساختارهای مختلط و مانوز بالا و با ۳۴ درصد ترکیب قندی N-استیل اسید نئورامینیک، گالاکتوز، مانوز، N-استیل گلوکوزآمین (Sareneva et al., 1996).

گلیکان‌های جایگاه Asn₉₇ همواره یک الگوی غیرفوکوزیله را نشان می‌دهند. با این وجود، اختلاف‌هایی در ساختار N-گلیکان hIFN- γ بومی و نوترکیب وجود دارد، مانند فقدان N-استیل اسید نئورامینیک و درج N-استیل گلوکوزآمین بین گالاکتوز و مانوز در تمام اشکال نوترکیب. در مجموع، مقایسه فرآیند گلیکوزیلاسیون نشان می‌دهد که الگوهای گلیکوزیلاسیون در سیستم بیانی CHO بیشترین شباهت را با سلول‌های انسانی دارند (Razaghi et al., 2016).

کاربردهای بالینی پروتئین نوترکیب hIFN- γ

ACTIMMUNE یا IFN- γ 1b

بیشتر آزمایش‌های بالینی مربوط به IFN- γ با استفاده از ACTIMMUNE (InterMune) یا IFN- γ 1b، یک شکل مهندسی شده از hIFN- γ انجام شده است. hIFN- γ طبیعی تولید شده توسط لکوسیت‌های خون محیطی انسان (Human peripheral blood leukocytes, PBLs) دارای ساختار اولیه مشابه با IFN- γ 1b است. با این وجود، این دو سیتوکین در مواردی با هم متفاوت هستند: (۱) IFN- γ گلیکوزیله است اما IFN- γ 1b نیست، (۲) IFN- γ 1b دارای ۱۴۰ اسیدآمینه است در حالی که IFN- γ دارای ۱۴۳ اسیدآمینه است و (۳) IFN- γ دارای پیروگلوتامات مسدود در انتهای آمینوی خود است اما IFN- γ 1b نوترکیب دارای متیونین در انتهای N است (Czarniecki and Sonnenfeld, 2006).

میکروب-میزبان و ترانسسانی پیام توسط گیرنده‌های خانواده Notch بازی می‌کند. ماهیت و محتوای الیگوساکاریدی، فرآیندهایی از قبیل تاخوردگی، پایداری، انتقال، ایمنی‌زایی، نیمه-عمر و فعالیت‌های اولیه پروتئین را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. به طوری که مشتقات اسید سیالیک، نیمه‌عمر پروتئین را افزایش داده، اما ترکیبات گالاکتوز و مانوز نیمه‌عمر را کاهش می‌دهند. گلیکوپروتئین‌ها به طور کلی به چهار گروه تقسیم می‌شوند: گلیکوپروتئین‌ها با اتصالات N، گلیکوپروتئین‌ها با اتصالات O، گلیکوزآمینوگلیکان و پروتئین‌هایی با اتصالات گلیکوزیل-فسفاتیدیل‌اینوزیتول. N-گلیکوزیلاسیون شکل اصلی گلیکوزیلاسیون بوده و در شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی انجام می‌شود. این فرآیند از طریق نیتروژن گروه امید زنجیره جانبی اسیدآمینه آسپاراژین رخ داده و نقش مهمی در تاخوردگی پروتئین، پایداری ساختاری و انتقال درون سلولی ایفا می‌کند (Hirata and Kizuka, 2021).

مشکل اصلی برای استفاده بالینی از hIFN- γ نوترکیب غیرگلیکوزیله، عمدتاً به دلیل نیمه‌عمر پایین آن درون بدن موجود زنده است. پژوهش‌ها در این زمینه نشان داده است که hIFN- γ غیرگلیکوزیله، نیمه‌عمر کوتاه‌تری نسبت به اشکال گلیکوزیله در لنفوسیت‌های انسانی یا سلول‌های تخمدان همستر چینی (Chinese hamster ovary, CHO) دارد. علاوه بر گلیکوزیلاسیون به طور خاص، نوع گلیکان نیز نیمه‌عمر پروتئین‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، به عنوان مثال، hIFN- γ نوترکیب حاوی اولیگوساکارید نوع مانوز تولید شده در سلول‌های حشرات در مقایسه با hIFN- γ بومی، به سرعت در جریان گردش خون از بین می‌رود (Sareneva et al., 1993).

hIFN- γ بومی دارای دو جایگاه N-گلیکوزیلاسیون یکی در اسیدآمینه Asn₂₅ و دیگری در اسیدآمینه Asn₉₇ است. hIFN- γ بومی مشتق از لنفوسیت‌های T به صورت ناهمگن گلیکوزیله شده و به اشکال دوگانه (گلیکوزیلاسیون در Asn₂₅ و Asn₉₇)، به طور منفرد (گلیکوزیلاسیون فقط در Asn₂₅) و شکل‌های غیرگلیکوزیله وجود دارد که منجر به شکل‌گیری پروتئین‌هایی با وزن مولکولی مختلف (به ترتیب ۲۳، ۱۸ و ۱۵) و تغییرات

مورد تأیید قرار نگرفته است. مطالعات بالینی انجام شده نشان داده‌اند که IFN- γ نوترکیب فاقد اثربخشی لازم برای درمان بیماران مبتلا به سرطان کولون، کارسینومای متاستاتیک کلیوی (Metastatic renal carcinoma) و سرطان ریه بوده است. با این وجود، بهبود در وضعیت بیماران مبتلا به کارسینومای مثانه (Bladder carcinoma) و برخی از سرطان‌های غیر ملانوما با تجویز IFN- γ نوترکیب بدست آمده و بهترین نتیجه در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان مشاهده شد (Dunn et al., 2006). امروزه پژوهش‌های زیادی در مورد اثر IFN- γ نوترکیب روی سلول‌های سرطانی به شکل درون‌شیشه‌ای (In vitro) انجام شده و نتایج نشان‌دهنده اثر مهارکنندگی IFN- γ روی رشد یا مرگ سلول‌های سرطانی از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا گاهی خودخواری (Autophagy) است (Ni and Lu, 2018).

درمان بیماری‌های ویروسی

یکی دیگر از کاربردهای ایمنی درمانی hIFN- γ در برابر ویروس هپاتیت C (Hepatitis C virus, HCV) و سرطان کبد مرتبط با HCV است. عفونت مزمن با HCV علت اصلی بیماری‌های کبدی شامل سیروز کبدی (Liver cirrhosis) و کارسینومای سلول‌های کبدی (Hepatocellular carcinoma) است (Talaat et al., 2022). رژیم فعلی برای درمان هپاتیت مزمن B (Hepatitis B virus, HBV) و C، IFN- α با دنباله پلی‌اتیلن‌گلیکول در ترکیب با ریباویرین (Ribavirin) با یک نرخ پاسخ تنها ۶۰-۵۰ درصد است (Di Bisceglie and Hoofnagle, 2002). با توجه به تعداد زیاد افرادی که به درمان پاسخ نمی‌دهند، IFN- γ به عنوان یک درمان جایگزین بالقوه مورد توجه قرار گرفته است. در کارآزمایی‌های بالینی، IFN- γ 1b به تنهایی تأثیر قابل توجهی بر عفونت ویروسی نداشت، اما سیستم ایمنی را تعدیل کرد. درمان HCV با IFN- γ 1b نیز به طور کلی ناموفق بوده است، اما پیش‌درمانی با IFN- γ قبل از درمان با IFN- α منجر به افزایش فعالیت ایمنی‌زایی در بیماران مبتلا به HCV شد. گمان بر این است که افزایش فعالیت ایمنی-زایی موجب حذف بیماری به کمک IFN- α خواهد شد. بیشتر عوارض مرتبط با هپاتیت مزمن، فیروز کبدی است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که IFN- γ دارای اثرها ضد فیبروتیک است و در

کاربردهای بالینی با استفاده از ACTIMMUNE[®] توسط FDA تنها برای درمان بیماری گرانولوماتوز (Granulomatous) مزمن و کاهش شدت و میزان عفونت در بیماران مبتلا به استئوپتروز (Osteopetrosis) بدخیم تأیید شده است. همچنین نشان داده شده است که ACTIMMUNE[®] در برابر انواع مختلفی از بیماری‌ها، از جمله سرطان، سل (Tuberculosis) (عفونت‌های ناشی از *Mycobacterium avium*، فیروز ریوی، سیستیک فیروزیز (Cystic fibrosis)، اسکلرودرما (Scleroderma)، عفونت‌های قارچی و به ویژه در بیماران مبتلا به نقص ایمنی مانند لوسمی (Leukaemia)، ویروس نقص ایمنی انسانی (Human immunodeficiency virus, HIV) و بیماران پیوندی به طور کامل موثر است (Miller et al., 2009; Armstrong-James et al., 2010). دوز درمانی بستگی به نوع بیماری دارد. به عنوان مثال، بیماران فیروز ریوی باید در حدود ۲۰۰ µg ACTIMMUNE[®] را به مدت سه بار در هفته دریافت کنند (Raghu et al., 2004).

درمان سرطان به کمک IFN- γ

تحریک سیستم ایمنی بدن برای درمان سرطان، ایمنی درمانی نامیده می‌شود (Bahonar et al., 2022). نقش IFN- γ در پاسخ میزبان به سرطان موضوع پژوهش‌های متعددی بوده است. مطالعات نشان داده‌اند که IFN- γ برای پایش تومور توسط سیستم ایمنی بدن حیاتی است و بین میزان تولید IFN- γ و پسرفت تومور در ایمنی درمانی ارتباط نزدیکی دیده شده است. IFN- γ فعالیت سیستم ایمنی را تنظیم کرده و قادر به افزایش فعالیت ضد توموری است. بنابراین، بخش مهمی از ایمنی درمانی سرطان به شمار می‌آید. IFN- γ از طریق ممانعت از رگ‌زایی، تکثیر سلول‌های توموری را مهار کرده، سلول‌های تومور را به مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) حساس کرده، بیان مجموعه اصلی سازگاری بافتی (Major histocompatibility complex, MHC) کلاس I و II را افزایش داده و فعالیت ایمنی ضد توموری را تحریک می‌کند (Martínez-Sabadell et al., 2022).

با وجود اثبات نقش ضد توموری IFN- γ در مدل‌های حیوانی، شکل نوترکیب آن جهت درمان سرطان هنوز توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (US Food and Drug Administration, FDA)

و فناوری ایمونوسپات مرتبط با آنزیم (Enzyme-linked immunospot, ELISPOT) با چندین نسل از محصولات موجود است. با این وجود، ذکر این نکته ضروری است که ارزش تشخیصی IGRA در جمعیت نقص ایمنی به دلایل فیزیولوژیکی و بیماری‌شناسی به طور قابل توجهی با جمعیت دارای ایمنی متفاوت است زیرا نتایج آن‌ها به شدت تحت تأثیر عملکرد ایمنی میزبان قرار می‌گیرد (Yang et al., 2022).

Condos و همکاران (1997) یک کارآزمایی بالینی را انجام دادند و تثبیت یا افزایش وزن بدن در تمام بیماران تحت درمان با IFN- γ مشاهده شد. علاوه بر این، یک کاهش در میزان خلط و بار میکروبی مشاهده شد. دو ماه پس از قطع درمان، کاهش اندازه ضایعات حفره‌ای در همه بیماران تأیید شد. کارآزمایی دیگری نشان داد که تجویز هم‌زمان IFN- γ و داروهای ضد سل در بیماران مبتلا به سل منجر به افزایش سطح STAT1، IRF-1 و IRF-9 در سلول‌های BAL ریوی شد. به این ترتیب، IFN- γ از طریق انتقال پیام، ماکروفاژهای حباب‌دار را تحریک کرده و با افزایش ایمنی میزبان در برابر *M. tuberculosis* می‌تواند به عنوان یک درمان کمکی در بیماران مبتلا به سل مورد استفاده قرار بگیرد (Miller et al., 2009). Ali Khan و همکاران (2016) اثر IFN- γ را روی بیماران MDR-TB بررسی کردند. آن‌ها فعالیت‌های غیرمعارف مولکولی را در ماکروفاژها مشاهده کردند که منجر به پاسخ ایمنی معیوب نسبت به باکتری *M. tuberculosis* در بیماران می‌شود. این شرایط از طریق پیش‌تیمار با hIFN- γ نوترکیب بهبود یافته و موجب ارتقاء عملکرد ماکروفاژها شد.

عفونت‌های مایکوباکتریومی غیرمعمول و پیچیده در اثر *M. avium* (Mycobacterium avium Complex, MAC) به‌ویژه در میان زنان مسن‌تر در حال افزایش است. عفونت MAC منجر به بیماری ریوی ذات‌الریه مزمن پیش‌رونده می‌شود. مایکوباکتری-های غیرمعمول زنده مانده و درون ماکروفاژهای میزبان تکثیر می‌شوند. درمان عفونت‌های ریوی MAC به دلیل مقاومت دارویی بالا دشوار است. نشان داده شده است که IFN- γ یک سیتوکین حیاتی جهت افزایش مقاومت در ماکروفاژهای آلوده است (Martínez-Planas et al., 2021).

برابر فیروز در بیماران مبتلا به HBV موثر است (Muir et al., 2006). با استفاده از سیستم‌های عفونت HBV مبتنی بر کشت سلولی و مدل سلول کبدی شیمریک موش-انسان، پاسخ ضدویروسی به کمک IFN- α و فعال‌سازی سیگنال مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که IFN- α 14 به عنوان مؤثرترین اینترفرون در سرکوب تکثیر HBV و تولید آنتی‌ژن سطحی HBV شناسایی شد. IFN- α 14 از طریق میان‌کنش با مسیر پیام‌رسانی IFN- γ و IFN- α به روشی مشابه با استفاده ترکیبی از IFN- α 2 و IFN- γ عمل کرده و باعث ایجاد چندین اثر ضدویروسی قوی می‌شود که به طور هم‌افزایی تکثیر HBV را محدود می‌کند (Chen et al., 2021).

یک مطالعه برچسب باز (Open-label)، تصادفی و کم مداخله (Low-interventional) جهت بررسی اثرها درمانی IFN- γ روی بیماران مبتلا به عفونت COVID-19 با سن بالای ۱۸ سال از هر دو جنس انجام شد. IFN- γ به مقدار ۵۰۰۰۰۰ IU به صورت یک-بار در روز و طی ۵ روز تجویز شد. نتایج نشان داد که IFN- γ منجر به تغییرات مطلوب در تثبیت علائم حیاتی و همچنین کاهش طول مدت تب و بستری شدن در بیمارستان به مدت ۲ روز شد که نشان‌دهنده تأثیر مثبت این دارو بر روند بهبودی است. علاوه بر این، بیمارانی که IFN- γ نوترکیب دریافت کردند، هیچ پیشرفت نارسایی تنفسی را تجربه نکردند و نیازی به انتقال به بخش مراقبت‌های ویژه نداشتند (Myasnikov et al., 2021).

درمان بیماری‌های عفونی

بیماری ریوی سل در نتیجه عفونت با باکتری *Mycobacterium tuberculosis*، در درجه اول سیستم تنفسی را تحت تأثیر قرار داده و به دلیل ظهور سویه‌های مقاوم به داروهای مختلف (Multidrug resistant strains, MDR-TB) نیاز به عوامل درمانی جدید را افزایش می‌دهد. سنجش آزادسازی اینترفرون گاما (Interferon-gamma release assays, IGRA) به طور گسترده در تشخیص عفونت *M. tuberculosis* از طریق شناسایی IFN- γ آزاد شده توسط سلول‌های T که قبلاً حساس شده‌اند در شرایط آزمایشگاهی استفاده می‌شود. در حال حاضر، دو سنجش مبتنی بر آزمون الیزا (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

در حال حاضر، هیچ درمان دارویی تأیید شده توسط FDA برای بیماری فیبروز ریوی ایدیوپاتیک (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) وجود ندارد. IPF یک بیماری عفونی مزمن است که با اسکار پیش‌رونده، از دست دادن عملکرد ریه، محدودیت تنفس و در نهایت مرگ مشخص می‌شود. سلول‌های اپیتلیال حباب‌دار، سیتوکین‌های فیبروزینیک مانند $TGF-\beta$ ، PDGF، TNF- α ، IL-1، فاکتور رشد شبه انسولین-1 و فاکتور رشد فیروبلاست بازی (basic fibroblast growth factor, bFGF) را در پاسخ به آسیب آزاد می‌کنند. رها شدن این سیتوکین‌ها باعث تکثیر فیروبلاست، مهاجرت به ریه و تمایز فیروبلاستی می‌شود (Selman et al., 2004). تاکنون کارآزمایی‌های بالینی متعددی جهت درمان IPF انجام شده است، اما متأسفانه بیشتر این کارآزمایی‌ها نتوانستند اثربخشی قابل قبولی را نشان دهند. بنابراین برای جلوگیری از پیشرفت بیماری به داروهای جدیدی نیاز است. از آنجایی که IPF با کمبود $IFN-\gamma$ مشخص می‌شود، درمان IPF توسط $IFN-\gamma$ مورد بررسی قرار گرفت. فرض بر این بود که درمان با $IFN-\gamma$ ممکن است پیشرفت IPF را متوقف کند. متأسفانه، نتایج پژوهش‌های درمان IPF با $IFN-\gamma$ متفاوت است (Raghu, 2017). در یک کارآزمایی بالینی روی بیماران IPF، درمان با $IFN-\gamma$ در ترکیب با پردنیزولون (Prednisolone) منجر به افزایش ظرفیت کلی ریه و فشار اکسیژن شریانی در مقایسه با پردنیزولون به تنهایی شد (Ziesche et al., 1999). با این وجود، در کارآزمایی بالینی دیگر، تجویز زیرجلدی $IFN-\gamma$ روی عملکرد ریوی تأثیری نداشت و زمان مرگ و پیشرفت بیماری را به طور قابل توجهی تغییر نداد (Raghu et al., 2004). در سال ۲۰۰۷، کارآزمایی بالینی درمان IPF با ACTIMMUNE® بالاجبار متوقف شد. این پژوهش یک کارآزمایی بالینی فاز ۳ تصادفی، دوسوکور و کنترل شده با دارونما بود که برای ارزیابی ایمنی و اثربخشی ACTIMMUNE® در بیماران IPF با اختلال خفیف تا متوسط در عملکرد ریه طراحی شد. نتایج پژوهش نشان داد که تقریباً ۱۴/۵ درصد از بیماران تحت درمان با ACTIMMUNE® در مقایسه با ۱۲/۷ درصد از بیماران تحت درمان با دارونما (Placebo) جان خود را از دست دادند (NCT00075998).

عفونت‌های قارچی به ویژه در بیماران نقص ایمنی مانند بیماران لوسمی (Leukemia)، بیماران مبتلا به HIV و بیماران پیوندی یک مشکل رایج است. شایع‌ترین عوامل عفونی، قارچ‌های کاندیدا (Candida) و آسپرژیلوس (Aspergillus) هستند. چندین داروی جدید برای درمان عفونت‌های قارچی از جمله تریازول‌ها و ایمنی‌درمانی با فاکتور محرک تشکیل کلنی گرانولوسیت-ماکروفاژ (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) و $IFN-\gamma$ وجود است. GM-CSF و $IFN-\gamma$ به صورت ترکیبی برای درمان بیماران مبتلا به عفونت‌های قارچی مقاوم به درمان و عفونت‌های غیرنوتروپنی (Non-neutropenic infection) تجویز می‌شوند. نشان داده شده است که $IFN-\gamma$ فعالیت ضدقارچی ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها را افزایش می‌دهد (Milanes-Virelles et al., 2008). بیماری تب دره (Valley fever) با نام کوکسیدیومیکوز (Coccidioidomycosis) ناشی از عفونت قارچی کوکسیدیوئیدس (Coccidioides) به عنوان یک بیماری مسری و تهدیدکننده زندگی شناخته می‌شود. آزمایش جامع ایمونولوژیک در یک کودک مبتلا به این بیماری، تولید بیش از حد IL-4 و کاهش تولید $IFN-\gamma$ را نشان داد. استفاده از داروهای ضدقارچی همراه با $IFN-\gamma$ پیشرفت بیماری را کند کرد و افزودن IL-4 و IL-13 با داروی ضدقارچی دویپلوماب (Dupilumab) منجر به رفع سریع علائم بالینی بیمار شد. این گزارش نشان داد که مسدودکردن پاسخ‌های ایمنی نوع ۲ می‌تواند عفونت را درمان کند (Tsai et al., 2020).

سطح سیتوکین‌های سرم در طول دوره عفونت با HIV به طور معمول با سرکوب سیستم ایمنی افزایش یافته و پس از درمان ضدتروویروسی (Antiretroviral treatment, ART) کاهش می‌یابد. در پژوهشی به منظور مقایسه سطوح سیتوکین بین بیماران مبتلا به HIV و افراد شاهد نشان داده شد که اگر چه غلظت سرمی IL-6، IL-1 β و TNF- α بعد از ART به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد اما همچنان به طور قابل توجهی بالاتر از گروه شاهد بود. همچنین $IFN-\gamma$ در مقایسه با سایر سیتوکین‌ها به ART پاسخ متفاوتی داد که نشان می‌دهد ممکن است نقش متمایز و مهمی را در بیماری‌زایی عفونت HIV ایفا کند (Okay et al., 2020). گزارش شده است که باکتری *Cryptococcus*

neoforman مسئول شایع‌ترین عفونت سیستم عصبی مرکزی در بیماران مبتلا به HIV، منتزیت کریپتوکوکی حاد، و شایع‌ترین علت منتزیت قارچی در سراسر جهان است. در یک کارآزمایی بالینی دوسوکور، بیماران در حدود $100 \mu\text{g}$ یا $200 \text{ IFN-}\gamma 1b$ یا دارونما را علاوه بر درمان استاندارد ضدقارچ دریافت کردند (NCT00012467). از بین ۷۵ بیمار، ۱۳ درصد از تیمار با دارونما، ۳۶ درصد تیمار با $100 \text{ IFN-}\gamma 1b$ و ۳۲ درصد از تیمار با $200 \text{ IFN-}\gamma 1b$ پس از ۲ هفته کشت مایع مغزی نخاعی فاقد آلودگی قارچی بودند (Pappas et al., 2004). کارآیی $\text{IFN-}\gamma 1b$ برای کاهش عفونت‌های فرصت‌طلب در HIV پیشرفته در یک کارآزمایی بالینی ۱۲ ماهه دوسوکور فاز III روی بیماران مبتلا به HIV آزمایش شد. هشتاد و چهار بیمار با $\text{IFN-}\gamma$ یا دارونما به صورت زیر جلدی به مدت ۴۸ هفته تحت درمان قرار گرفتند. بیمارانی که دارونما مصرف کردند به طور متوسط $3/45$ عفونت فرصت‌طلب در ۴۸ هفته اول داشتند، در حالی که بیماران تحت درمان با $\text{IFN-}\gamma 1b$ به طور میانگین در حدود $1/71$ را نشان دادند. علاوه بر این، درمان با $\text{IFN-}\gamma 1b$ به ویژه در برابر عفونت‌های کاندیدا، تبخال و سیتومگالوویروس (Cytomegalovirus) موثر بود (Riddell et al., 2001).

اختلالات ارثی و ناهنجاری‌های مادرزادی

فیروز کیستیک (Cystic fibrosis, CF) یک اختلال ارثی است که در اثر جهش در ژن تنظیم‌کننده هدایت غشایی فیروز کیستیک (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) و ایجاد اختلال در عملکرد نوعی کانال کلریدی ایجاد می‌شود. CF با عفونت و التهاب مزمن نایژه‌ها، تخریب بافت ریه و در نهایت نارسایی تنفسی در ۹۰ درصد بیماران مشخص می‌شود. بیماران CF پاک‌سازی ناکارآمد ترشحات غلیظ ریوی و نقص در تولید اکسید نیتریک (NO) دارند که منجر به عفونت‌های باکتریایی مزمن با بیوفیلیم ضخیم باکتریایی خواهد شد. بیوفیلیم‌های باکتریایی در برابر آپسونین‌ها (Opsonin)، فاگوسیت‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت کرده و باعث التهاب مزمن نوتروفیلی می‌شوند. تولید الاستاز توسط نوتروفیل‌ها به آسیب ریه کمک می‌کند. با توجه به توانایی $\text{IFN-}\gamma$ در فعال کردن ماکروفاژها، رفع

کمبودهای تولید NO در شرایط درون‌شیشه‌ای و مهار تکثیر کلون‌های Th2 و بر اساس داده‌های بالینی که نشان‌دهنده کمبود $\text{IFN-}\gamma$ در PBMC‌های بیماران CF است، تصور بر این است که $\text{IFN-}\gamma$ پتانسیل بسیار خوبی برای درمان بیماری CF را دارد (Moss et al., 2009). در یک کارآزمایی بالینی، حدود شصت و شش بیمار مبتلا به CF در حدود $500-1000 \mu\text{g}$ $\text{IFN-}\gamma 1b$ یا دارونما را به شکل اسپری سه بار در هفته و به مدت ۱۲ هفته دریافت کردند. در طی ۴ هفته، کاهش قابل توجهی در تراکم باکتریایی بین گروه $1000 \mu\text{g}$ $\text{IFN-}\gamma$ در مقابل دارونما مشاهده شد. با این وجود، هیچ تفاوت آماری قابل توجهی در سطوح نوتروفیل‌ها، IL-8 ، الاستاز، میلوپراکسیداز و DNA در خلط بیماران تحت درمان با $\text{IFN-}\gamma$ یا دارونما مشاهده نشد. در مجموع، هیچ تفاوت آماری معنی‌داری در حجم بازدم اجباری در ۱ ثانیه و تراکم باکتریایی خلط بین دو تیمار در پایان مطالعه مشاهده نشد (Moss et al., 2004). ترشح سیتوکین‌ها ناشی از عفونت COVID-19 یکی از علل اصلی سندرم دیسترس تنفسی حاد (Acute respiratory distress syndrome, ARDS) و فیروز ریه است. Hu و همکاران (2020) تأثیر مولکول‌های التهابی را برای شناسایی هر نشاندگی که با فیروز ریه در بیماری COVID-19 مرتبط است را بررسی کردند. آن‌ها هفتاد و شش بیمار مبتلا به COVID-19 را برای مطالعه خود انتخاب کردند. در هنگام ترخیص، فیروز در ۴۶ بیمار ($60/5$ درصد) همچنان وجود داشت و سطح پلاسمای $\text{IFN-}\gamma$ آن‌ها دو برابر کمتر از بیماران بدون فیروز بود. نتایج آن‌ها نشان داد که کاهش $\text{IFN-}\gamma$ در پلاسمای خون یک عامل خطر برای ابتلا به فیروز ریه در بیماران مبتلا به COVID-19 است.

در سال ۱۹۹۱، $\text{IFN-}\gamma 1b$ برای درمان بیماری مزمن گرانولوماتوز (Chronic granulomatous disease, CGD) مورد تأیید FDA قرار گرفت. CGD یک اختلال ارثی در عملکرد لکوسیت‌ها است که به دلیل نقص یا عدم کاهش آنزیم نیکوتین‌آمید آدنین دی-نوکلوئید فسفات اکسیداز ایجاد می‌شود. این آنزیم برای فعالیت ضد میکروبی و تولید سوپراکسید در فاگوسیت‌ها ضروری است. در نتیجه، بیماران CGD از عفونت‌های باکتریایی و قارچی روزمره رنج می‌برند. از آنجایی که $\text{IFN-}\gamma$ برای افزایش حجم تنفسی

بیماران CGD کاهش می‌دهد، Key و همکاران (1992) این فرضیه را مطرح کردند که IFN- γ 1b ممکن است استئوکلاست‌ها را به شیوه‌ای مشابه تحریک کند. تجویز IFN- γ 1b به بیماران OP به طور قابل توجهی باعث افزایش جذب استخوان استئوکلاستیک، افزایش تولید سوپراکسید در PBLها و کاهش عفونت شد. پژوهش‌های درون‌شیشه‌ای با کشت خون بیماران OP نشان داده است که IFN- γ 1b باعث افزایش تولید استئوکلاست، بهبود عملکرد لوکوسیت، خون‌سازی و افزایش جذب استخوان می‌شود (Kim et al., 2007; Imel et al., 2019). در نهایت در سال ۲۰۰۰، ACTIMMUNE® توسط FDA برای به تأخیر انداختن زمان پیشرفت بیماری در بیماران مبتلا به OP بدخیم شدید تأیید شد.

اسکلروderمی (Scleroderma) یک بیماری بافت همبند است که روی کارکرد اندام‌های مختلف بدن از جمله پوست، قلب، ریه‌ها و کلیه‌ها تأثیر منفی می‌گذارد. سازوکار فیروز در اسکلروderمی به طور کامل شناخته نشده است. با این وجود، مشخص شده است که عواملی مانند TGF- β ، PDGF، IL-4، IL-6 و TNF α می‌توانند روی رشد و تکثیر فیروblast و سنتز کلاژن تأثیر بگذارند. IFN- γ به دلیل فعالیت ضدفیروblast، توانایی‌اش در کاهش تولید کلاژن در شرایط آزمایشگاهی و مهار تکثیر سلول‌های فیروblastی در درمان اسکلروderمی استفاده شده است. در بیشتر کارآزمایی‌های بالینی، تجویز زیرجلدی یا داخل عضلانی IFN- γ در بیماران اسکلروderمی نتایج رضایت‌بخشی به همراه داشته است (Grassegger et al., 1998).

استفاده از پادتن‌های ضد IFN- γ در درمان بیماری

Fontolizumab (HuZAF) و Eldelumab یک پادتن مونوکلونال انسانی است که به IFN- γ متصل شده و بیان ژن‌های قابل القاء توسط IFN- γ را مهار می‌کند. Fontolizumab برای درمان بیماری‌های خودایمنی مانند بیماری کرون (Crohn's disease)، لوپوس (Lupus)، آرتریت روماتوئید (Rheumatoid arthritis، RA) و اسکلروزیس چندگانه (Multiple sclerosis، MS) در حال بررسی است. عوارض جانبی نامطلوب عموماً خفیف و نادر بوده و شامل درد شکم، استفراغ، سردرد، حالت

سلول‌های فاگوسیتی انسان مورد نیاز است، انتظار می‌رود که IFN- γ نقایص ایمنی مشاهده شده در بیماران CGD را مرتفع سازد. در آزمایش‌های بالینی، IFN γ 1b مورد استفاده شدت عفونت‌ها را در بیماران CGD کاهش داد (Izu et al., 2020). Marciano و همکاران (2004) اثرها طولانی مدت تجویز IFN- γ 1b را روی بیماران CGD مورد بررسی قرار دادند. بیماران تا ۹ سال IFN- γ 1b را به صورت زیرجلدی سه بار در هفته دریافت کردند. آن‌ها به این نتیجه رسید که IFN- γ برای درمان CGD موثر است، به طوری که استفاده از ACTIMMUNE® منجر به کاهش ۶۷ درصد خطر نسبی عفونت‌های جدی، ۵۳ درصد عفونت‌های اولیه، ۶۴ درصد عفونت‌های کلی و ۶۷ درصد روزهای بستری در بیمارستان شد. در یک کارآزمایی بالینی جهت بررسی اثر درمانی IFN- γ روی بیماران مبتلا به CGD، پنجاه و هفت بیمار در دهه سنی ۲-۳۵ سال مورد مطالعه قرار گرفتند. علاوه بر درمان با تری-متوپریم سولفامتوکسازول (Trimethoprim-sulfamethoxazole، TMP-SMX) و ایتراکونازول (Itraconazol)، ۶۰ درصد از آن‌ها تحت درمان با IFN- γ قرار گرفتند. بیمارانی که تحت درمان با IFN- γ قرار داشتند، به طور معمول عوارض عفونی کمتری مانند عفونت‌های شدید، ذات‌الریه، عفونت‌های بافت نرم و لنفادنیت (Lymphadenitis) را نشان دادند. همچنین، عفونت آسپرژیلوس، آبسه بافتی و عوارض گرانولوماتوز نیز در این گروه کمتر بود. نتایج آن‌ها نشان داد که درمان با IFN- γ باعث کاهش عوارض عفونی و گرانولوماتوز در بیشتر بیماران CGD می‌شود (Filiz et al., 2022).

پوکی استخوان مادرزادی (Congenital osteopetrosis، OP) یک بیماری نادر استخوانی استئواسکلروستیک (Osteosclerotic) است که به دلیل نقص در عملکرد استئوکلاست (Osteoclast) و تحلیل استخوان ایجاد می‌شود. OP شدید و بدخیم با رشد بیش از حد ساختارهای بدن مشخص می‌شود که منجر به عفونت، کم‌خونی، ترومبوسیتوپنی (Thrombocytopenia)، کوری، ناشنوایی و در نهایت مرگ زودرس خواهد شد. لکوسیت‌های گرانولی بیماران OP در تولید سوپراکسید معیوب هستند که منجر به عفونت‌های مکرر و شدید می‌شود (Blin-Wakkach et al., 2004). از آنجایی که IFN γ 1b با افزایش تولید سوپراکسید نوتروفیل، عفونت را در

ساخت سیتوکین‌ها، به ویژه IFN- γ ، نقش مهمی در شروع و طولانی شدن بیماری MS ایفا می‌کند. در حال حاضر IFN- β درمان MS استفاده می‌شود که احتمال دارد از طریق مهار فعال-سازی ایمنی به کمک IFN- γ عمل می‌کند. در یک کارآزمایی بالینی روی بیماران مبتلا به MS پیش‌رونده، آن دسته از بیمارانی که یک دوره کوتاه پادتن خنثی‌کننده IFN- γ را دریافت کردند، تأخیر قابل توجهی در پیشرفت ناتوانی از خود نشان دادند. همچنین نتایج MRI کاهش تعداد ضایعات فعال را روی سلول-های عصبی نشان داد. بررسی مقدار سیتوکین‌ها در بیماران تحت درمان، کاهش IL-1 β ، TNF- α و IFN γ و افزایش TGF- β را نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که خنثی کردن IFN- γ ممکن است یک گزینه درمانی جدید برای بهبود MS پیش‌رونده باشد (Skurkovich and Skurkovich, 2003; Arellano et al., 2015).

ژن درمانی

استفاده بالینی از hIFN- γ نوترکیب به دلیل داشتن نیمه‌عمر کوتاه و عوارض جانبی محدود شده است. بنابراین، یکی از گزینه‌های ممکن برای حل این مشکلات، رهاسازی hIFN- γ نوترکیب از طریق یک ویروس است که می‌تواند موجب بیان مداوم و کارآمد ژن هدف شود. به عنوان مثال، نتایج آزمایش‌های پیش‌بالینی و بالینی در درمان بیماری لنفوم پوستی (Cutaneous lymphoma) با استفاده از ناقل‌های آدنوویروسی رمزگردان hIFN- γ نوترکیب کاملاً رضایت‌بخش بود (Dummer, 2005). همچنین تعدادی از پژوهش‌ها، نقش بازدارندگی Ad-IFN γ در رشد سلولی سرطان پروستات (Zhao et al., 2007)، کارسینوما نازوفارینگال (Nasopharyngeal carcinoma) (Zuo et al., 2011) و سرطان پانکراس (Xie et al., 2013) را نشان داده‌اند.

تشخیص

به غیر از کاربردهای درمانی، hIFN- γ نوترکیب برای تولید لاپین یا پادتن ضد IFN- γ به ترتیب از طریق تزریق به خرگوش یا موش نیز استفاده می‌شود. این پادتن در آزمون الایزا یا مطالعه آزادسازی IFN- γ (Interferon gamma release assay, IGRA) جهت تشخیص عفونت‌های *M. tuberculosis*، شامل عفونت‌های لنفاوی یا بیماری سل مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از تحریک

تهوع و سرفه هستند. AMG811 نیز یک پادتن مونوکلونال به طور کامل انسانی است که به IFN- γ متصل شده و آن را خنثی می‌کند (Miller et al., 2009).

بیماری CD یک بیماری التهابی مزمن دستگاه گوارش است. IFN- γ در التهاب ایجاد شده نقش داشته و سطوح افزایش یافته آن در مخاط مشاهده می‌شود. ایمنی و اثربخشی HuZAF و Eldelumab در درمان بیماری CD متوسط تا شدید مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل از کارآزمایی‌های بالینی نشان داده-اند که درمان بیماری CD با پادتن ضد IFN- γ نیاز به بررسی بیشتری دارد. با این وجود، HuZAF به عنوان یک دارو برای درمان بیماری التهابی روده کودکان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Cui et al., 2013; Sandborn et al., 2017).

لوپوس اریتماتوز سیستمیک (Systemic lupus erythematosus, SLE) یک اختلال خودایمنی است که از طریق تشریح پادتن‌های خودواکنشی در برابر اسیدهای نوکلئیک و تشکیل مجموعه‌های ایمنی و تجمع در اندام‌ها و مفاصل بدن، تشخیص داده می‌شود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که بیماران SLE سطوح سرمی IFN- γ بالایی داشته و در مدل‌های موش، گیرنده IFN- γ برای ایجاد بیماری SLE مورد نیاز است. بنابراین، IFN- γ می‌تواند باعث تشدید بیماری SLE شود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اندازه‌گیری سطوح IFN- γ در پلاسمای خون با استفاده از آزمون IGRA می-تواند جهت ارزیابی میزان پیشرفت بیماری در بیماران مبتلا به SLE مورد استفاده قرار بگیرد (Zhang et al., 2022). کارآزمایی بالینی فاز Ib با استفاده از پادتن مونوکلونال AMG-811، درمان نسبی بیماران SLE را در صورت غیرفعال‌سازی IFN- γ نشان داد (NCT00818948).

RA یک بیماری التهابی مزمن است که با یک خودایمنی غالب مرتبط با Th1 مشخص می‌شود. مطالعات بالینی اولیه، IFN- γ را به عنوان یک داروی درمانی برای RA مورد بررسی قرار دادند. نتایج کارآزمایی بالینی نشان داده است که پادتن‌های IFN- γ در درمان RA به طور معنی‌داری تأثیرگذار هستند (Sigidin et al., 2001). MS یک اختلال خودایمنی است که در آن سیستم ایمنی بدن به غلاف میلین سیستم عصبی مرکزی حمله می‌کند. اختلال در

پروتئین‌های نامحلول نابجا (Inclusion bodies) کارایی لازم جهت تولید پروتئین‌های گلیکوزیده انسانی را نداشته و این موضوع نگرانی‌هایی را مبنی بر حساسیت‌زا بودن یا غیرفعال بودن این ترکیبات در بدن انسان به وجود می‌آورد. از سایر میزبان‌ها مانند مخمر نان (*Saccharomyces cerevisiae*) و سلول‌های جانوری جهت تولید hIFN- γ نوترکیب استفاده شده است. با این وجود، این سیستم‌های بیانی نیز مشکلات خاص خود را دارند. مخمر به دلیل فوق‌گلیکوزیلاسیون (Hyper-glycosylation) و سلول‌های جانوری به دلیل احتمال آلودگی پروتئین نوترکیب با عوامل بیماری‌زای جانوری و هزینه‌بر بودن از نظر اقتصادی، چندان مورد استقبال پژوهشگران قرار نگرفته‌اند (Egelkroun et al., 2012). جدول ۲ انواع سیستم‌های بیانی مختلف غیرگیاهی تولیدکننده hIFN- γ نوترکیب را نشان می‌دهد.

جدول ۲- انواع سیستم‌های بیانی مختلف غیرگیاهی تولیدکننده hIFN- γ نوترکیب.

Table 2- Types of various non-plants expression systems producing recombinant hIFN- γ .

Expression system	Organism	Yield (mg/L)	Biological activity ^a	References
Mamalian cells	<i>Homo sapiens</i> (Human tissue culture)	6	1.93×10^7 IU/mg	Leister et al., 2013
	Monkey cells		6.2×10^{-2} IU/ml	Gray et al., 1982
	Mouse (<i>Mus</i> spp.)	23×10^{-6}	1×10^7 IU/mg	Bagis et al., 2011
	Rat cells (<i>Rattus</i> spp.)		4×10^5 IU/ml	Nakajima et al., 1992
	Chinese hamster ovary cells (<i>Cricetulus</i> sp.)		1×10^5 IU/ml	Haynes and Weissman, 1983
Insect	Mouse mammary gland	350-570	5×10^7 IU/ml	Lagutin et al., 1999
	<i>Spodoptera</i> spp.	2	Active	Chen et al., 2011
Protozoa	<i>Leishmania</i> sp.	9.5	Active	Davoudi et al., 2011
Yeast	<i>S. cerevisiae</i>		2.5×10^4 IU/ml	Derynck et al., 1983
	<i>Pichia pastoris</i>	$1-16 \times 10^{-3}$	Active	Razaghi et al., 2016b
Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	2-20	Active	Rojas Contreras et al., 2010
	<i>E. coli</i>		Active	Arbabi et al., 2003
	<i>E. coli</i>	1700	9×10^7 IU/L	Huang et al., 2013
	<i>E. coli</i>		3.43×10^7 IU/ml	Heidari-Japelaghi et al., 2019a

^a میزان فعالیت زیستی با مقایسه اثر محافظتی پروتئین نوترکیب hIFN- γ در برابر عفونت ویروسی در مقایسه با نمونه استاندارد در واحد بین‌المللی (International unit, IU) به ازای هر گرم وزن بافت تازه گیاه تراریخته (IU/g FW)، هر میلی‌گرم پروتئین کل محلول (IU/mg) و یا هر میلی‌لیتر محیط کشت (IU/ml) بیان می‌شود.

γ با موفقیت همسانه‌سازی شده و در سال ۱۹۸۲ در *E. coli* بیان شد. باکتری *E. coli* به دلایلی همچون نیاز به مواد مغذی ساده، سرعت رشد بالا، درک بالا از سازوکار فیزیولوژی و ژنتیک مولکولی آن، دست‌ورزی ژنتیکی آسان، در دسترس بودن سویه‌ها و ناقل‌های بیانی مختلف و عملکرد بالایی محصول یکی از پرکاربردترین سیستم‌های بیانی مورد استفاده برای تولید پروتئین‌های نوترکیب به شمار می‌رود (Razaghi et al., 2016a).

توسط پادتن‌های *M. tuberculosis* مقدار IFN- γ رها شده از سلول‌های T توسط این آزمون‌ها اندازه‌گیری می‌شود. استفاده از این آزمون‌ها به دلیل رشد جمعیت مبتلایان به سل در سرتاسر جهان در حال افزایش است (Zwerling et al., 2012).

انواع سیستم‌های بیانی مورد استفاده جهت تولید پروتئین hIFN- γ نوترکیب

در حال حاضر، تولید hIFN- γ نوترکیب به طور عمده توسط سیستم‌های میکروبی و جانوری انجام می‌شود. یکی از سیستم‌های بیانی میکروبی جهت تولید hIFN- γ نوترکیب، باکتری *E. coli* است که به علت سهولت انجام دست‌ورزی ژنتیکی و بهره‌وری بالا از پرکاربردترین سیستم‌های بیانی باکتریایی محسوب می‌شود. اما این سیستم بیانی به دلیل عدم انجام تاخوردگی صحیح و تغییرات پس از ترجمه به ویژه N-گلیکوزیلاسیون و تولید

تولید پروتئین نوترکیب hIFN- γ در *E. coli*

در دهه ۱۹۸۰، پروتئین hIFN- γ با در معرض قرار دادن لنفوسیت‌های T انسانی در برابر محرک‌های میتوزی یا از طریق ترجمه mRNA در تخمک‌ها به میزان بسیار اندک تولید شد. با این حال مشکلاتی از قبیل خالص‌سازی پروتئین hIFN- γ از سلول‌ها و فرآیند پرهزینه واسرشته‌سازی (Denaturation) نیز وجود داشت. با توسعه فناوری DNA نوترکیب، توالی cDNA رمزگردان hIFN-

سازی پروتئین از محیط کشت مایع در حضور سرم بسیار دشوار است (Nakajima et al., 1992). در صورت حذف سرم از محیط کشت، هزینه‌ها به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. چنین رویکردهایی در حال انجام است، به طوری که ثابت شده است که سلول‌های CHO را می‌توان در محیط بدون سرم نیز کشت داد (Rodrigues et al., 2013). رویکرد دیگر، بهینه‌سازی توالی رمزگردان پروتئین hIFN- γ برای افزایش بیان در سلول‌های CHO است. چانگ و همکاران (Chung et al., 2013) نشان دادند که ژن‌های بهینه‌سازی شده در مقایسه با ژن hIFN- γ بومی، حداقل ۱۰-۱۳ برابر افزایش در سطح بیان را نشان می‌دهند. بیان hIFN- γ نوترکیب در موش‌های تراریخته (Transgenic mice, TM) تا حدودی قابل مقایسه با میزان عملکرد در *E. coli* بود. با این وجود، استفاده از موش‌های تراریخته زنده برای تولید تجاری پروتئین‌های نوترکیب غیرممکن است (Bagis et al., 2011).

تولید پروتئین نوترکیب hIFN- γ در گیاهان

به دلیل هزینه بالای تولید اینترفرون‌ها توسط سیستم‌های میکروبی و جانوری، توجه پژوهشگران به سمت گیاهان به عنوان میزبان‌های مناسب و کم‌هزینه جلب شده است. تولید اینترفرون‌های انسانی در گیاهان، اولین بار به آغاز دهه ۱۹۹۰ باز می‌گردد (Edelbaum et al., 1992). علاوه بر اینترفرون‌های انسانی، اینترفرون‌هایی از سایر موجودات زنده از قبیل مرغ (Wu et al., 2009) و ماهی سالمون (Fukuzawa et al., 2010) نیز با موفقیت در میزبان‌های گیاهی تولید شده‌اند. تلاش‌ها در جهت تولید ارزان قیمت اینترفرون‌های انسانی توسط گیاهان، به تولید IFN- $\alpha 2b$ نوترکیب تحت نام تجاری Locteron® توسط شرکت Biolex منجر شده است. Locteron® توسط گیاه آبی در مقیاس تجاری تولید شده و هم اکنون فاز II کارآزمایی بالینی را کامل کرده است (De Leede et al., 2008). تاکنون، اینترفرون hIFN- γ در سیستم‌های بیانی مختلف از قبیل کل گیاه، بافت‌های خاص گیاهی، سوسپانسیون سلولی، کلروپلاست و بیان گذرا با روش‌های تراریختی به کمک اگروباکتری و بیولیستیک تولید شده‌اند (جدول ۳).

با وجود تمام مزیت‌های ذکر شده، باکتری *E. coli* برای بیان گلیکوپروتئین‌ها و به طور خاص برای hIFN- γ با مشکلات فنی روبرو است. hIFN- γ نوترکیب تولید شده درون باکتری *E. coli*، پروتئین‌های نامحلول نابجا را تشکیل می‌دهد که منجر به واسرشته‌سازی نسبی یا کامل پروتئین نوترکیب می‌شود. به این ترتیب خالص‌سازی hIFN- γ نوترکیب نیازمند یک مرحله تاخوردگی مجدد خواهد بود. علاوه بر این، باکتری *E. coli* قادر به افزودن شاخه‌های گلیکان به پروتئین نوترکیب نبوده و بنابراین موجب تولید hIFN- γ نوترکیب با یک نیمه‌عمر کوتاه در مقایسه با hIFN- γ بومی در گردش خون خواهد شد. همچنین، hIFN- γ نوترکیب تولید شده در باکتری *E. coli* توسط فرآیند گلیکاسیون (Glycation) (یک فرآیند غیرآنزیمی و تصادفی)، گلیکوزیله می‌شود که عملکرد پروتئین را مختل می‌کند. تشکیل محصولات پیشرفته گلیکاسیون موجب دایمر شدن به طور کووالانسی، پلیمریزاسیون و پروتئولیز غیرآنزیمی (تخریب پروتئین به علت گرما یا اسیدیته) شده و موجب کاهش فعالیت زیستی و نیمه‌عمر پروتئین و در نهایت افزایش ایمنی‌زایی hIFN- γ نوترکیب می‌شود. بعلاوه پس از استخراج hIFN- γ نوترکیب از *E. coli*، محصول بدست آمده ممکن است حاوی ناخالصی‌هایی مانند اندوتوکسین و اسیدهای نوکلئیک باشد که یکی دیگر از عیب‌های این سیستم بیانی است (Mironova et al., 2003).

تولید پروتئین نوترکیب hIFN- γ در سلول‌های پستانداران

از آنجایی که تولید شکل غیرگلیکوزیله hIFN- γ نوترکیب در *E. coli*، ویژگی‌های نیمه‌عمر، حلالیت و مقاومت پروتئازی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، سایر سیستم‌های بیانی به ویژه انواع مختلف سلول‌های پستانداران برای غلبه بر این مشکلات مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۳). با اینکه بیشتر این پژوهش‌ها در مقیاس آزمایشگاهی انجام می‌شوند، اما نتایج حاصل از آن‌ها در مقایسه با سیستم بیانی *E. coli* به طور کامل امیدوارکننده است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که میزان تولید hIFN- γ نوترکیب در سلول‌های CHO کمتر از *E. coli* بوده و در حال حاضر با استفاده از محیط-کشت حاوی سرم انجام می‌شود که بسیار هزینه‌بر بوده و خالص-

جدول ۳- γ -hIFN نو ترکیب تولید شده در سیستم‌های بیانی مختلف گیاهی.Table 3- Recombinant hIFN- γ produced in different plant-based expression systems.

Type of expression system	Plant	Transformation type	Yield/Bioactivity	References
Stable expression	Rape	Agrobacterium	---	Bagheri <i>et al.</i> , 2010
	Tomato	Agrobacterium	---	Ebrahimi <i>et al.</i> , 2012
	Squash	Plant viral vector	10-12 $\mu\text{g/g}$ FW	Nassaj Hosseini <i>et al.</i> , 2012
	Tobacco	Plant viral vector	119 $\pm$ 0.8 $\mu\text{g/g}$ FW	Jiang <i>et al.</i> , 2019
	Tobacco	Agrobacterium	4.82 $\times 10^6$ IU/mL	Heidari-Japelaghi <i>et al.</i> , 2020a
	Safflower	Agrobacterium	---	Yaghtin <i>et al.</i> , 2012
Transient expression	Tobacco	Plant viral vector	TSP 5-10%	Mori <i>et al.</i> , 1993
	Tobacco	Agro-infiltration	17.21 $\times 10^6$ IU/g F	Heidari-Japelaghi <i>et al.</i> , 2019b
	Tobacco	Agro-infiltration	6.72 $\times 10^6$ IU/mL	Heidari-Japelaghi <i>et al.</i> , 2020b
Cell suspension	Rice	Agrobacterium	699.79 ng/g cell	Chen <i>et al.</i> , 2004
Chloroplast engineering	Tobacco	Biolistic	TSP 0.42%	Razmi <i>et al.</i> , 2019

میزبان و تولید پروتئین نو ترکیب با الگوی N-گلیکوزیلاسیون مشابه با سلول‌های جانوری است (Davoudi *et al.*, 2011). با این وجود، به دلیل عملکرد پایین به واسطه خاموشی ژن پس از رونویسی و هزینه بالای خالص‌سازی چندان مورد استقبال پژوهشگران قرار نگرفت.

پژوهش‌ها نشان داده‌اند که مخمرهای متیلوتروفیک (Methylotrophic yeast) مقادیر زیادی پروتئین نو ترکیب در مقیاس صنعتی تولید می‌کنند. Wang و همکاران (2014) برای اولین بار، ابر بیان (Overexpression) γ -hIFN را در مخمر *P. pastoris* متیلوتروفیک گزارش کردند. استفاده از مخمر *P. pastoris* جهت تولید پروتئین‌های نو ترکیب به دلیل مزیت‌هایی همچون دست‌ورزی آسان، چگالی بالای سلولی، کشت در pH پایین و کاهش احتمال آلودگی، هزینه پایین تولید، امکان تغییرات پس از ترجمه مشابه با سلول‌های یوکاریوتی مانند تاخوردگی صحیح و N-گلیکوزیلاسیون و امکان ترشح به درون محیط کشت می‌تواند نوید تازه‌ای برای تولید در مقیاس صنعتی باشد (Ahmad *et al.*, 2014). با تمام این تفاسیر، استفاده از این میزبان بیانی جهت تولید پروتئین‌های نو ترکیب در مرحله آزمایشگاهی است و هنوز به مرحله صنعتی نرسیده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت γ -IFN در سیستم ایمنی بدن جانوران به ویژه انسان و کاربردهای بالینی فراوان آن به ویژه در ایمنی‌درمانی سرطان، بیماری‌های ویروسی و عفونی و اختلالات ژنتیکی و مادرزادی، تولید مقادیر بالا در یک میزبان کارآمد و کم هزینه یکی

با وجود مزیت‌های ذکر شده برای گیاهان، سازوکار N-گلیکوزیلاسیون در گیاهان و جانوران به ویژه برای پروتئین‌های گلیکوزیله به طور کامل متفاوت بوده و مشابه با *E. coli* ممکن است نگرانی‌هایی را مبنی بر حساسیت‌زا بودن یا غیرفعال بودن این ترکیبات در بدن انسان ایجاد کند.

بیان γ -hIFN نو ترکیب در سایر سیستم‌های بیانی

بیان نو ترکیب γ -hIFN در سلول‌های حشرات مبتلا به باکلوویروس (Baculovirus-infected insect cells, BIIC) و مخمر نان به دلیل ترشح اندک به درون محیط کشت، گلیکوزیلاسیون بالا و تاخوردگی ناپایدار چندان رضایت‌بخش نبود. به رغم تلاش‌های متعدد جهت بهبود تولید، میزان عملکرد هنوز با میزان تولید در باکتری *E. coli* قابل مقایسه نیست. بنابراین به نظر می‌رسد که توسعه یک سیستم بیانی یوکاریوتی جایگزین، قادر به برطرف کردن این مشکلات باشد. پارازیت‌های انسانی عمدتاً شامل تعدادی از گونه‌های متعلق به جنس‌های *Trypanosoma* و *Leishmania* از خانواده Trypanosomatidae هستند. پروتوزوا *L. tarentolae* یک انگل غریبیماری‌زای مارمولک خانگی (*Tarentolae annularis*) است که به عنوان یک سیستم بیانی یوکاریوتی جهت بیان پروتئین‌های نو ترکیب از قبیل اریتروپوئیتین (Erythropoietin)، فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی (Tissue plasminogen activator) و γ -hIFN توسعه یافته است. این سیستم بیانی دارای ویژگی‌هایی همچون نرخ رشد بالا در مقایسه با سلول‌های جانوری، کشت آسان و کم هزینه، غریبیماری-زا برای انسان، امکان درج چندین نسخه تراژن به درون ژنوم

پروکاریوت‌ها به ویژه باکتری *E. coli* موجب تولید پروتئین نوترکیب با نیمه‌عمر پایین شده و در سلول‌های جانوری منجر به افزایش هزینه تولید خواهد شد. بنابراین با توجه به هدف از تولید باید نوع میزبان بیانی انتخاب شود.

از نیازهای اساسی بخش پزشکی محسوب می‌شود. در مجموع، مقایسه عملکرد سیستم‌های بیانی مختلف نشان می‌دهد که تولید IFN- γ نوترکیب با عملکرد بالا در پروکاریوت‌ها و به دنبال آن در سیستم‌های بیانی پستانداران به دست می‌آید. با این وجود، بیان در

منابع

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 5301e17. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
- Ali Khan, T., Mazhar, H., Saleha, S., Nawaz Tipu, H., Muhammad, N., & Nasser Abbas, M. (2016). Interferon-gamma improves macrophages function against *M. tuberculosis* in multidrug-resistant tuberculosis patients. *Chemotherapy Research and Practice*, 2016, 7295390. <https://dx.doi.org/10.1155/2016/7295390>
- Arbabi, M., Alasti, F., Sanati, M.H., Hosseini, S., Deldar, A., & Maghsoudi, N. (2003). Cloning and expression of human gamma-interferon cDNA in *E. coli*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 1(2), 87-94.
- Arellano, G., Ottum, P.A., Reyes, L.I., Burgos, P.I., & Naves, R. (2015). Stage-specific role of interferon-gamma in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 6, 492. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00492>
- Armstrong-James, D., Teo, I.A., Shrivastava, S., Petrou, M.A., Taube, D., Dorling, A., et al. (2010). Exogenous interferon-gamma immunotherapy for invasive fungal infections in kidney transplant patients. *American Journal of Transplantation*, 10(8), 1796-1803. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03094.x>
- Bagheri, K., Jalali Javaran, M., Mahboudi, F., Moeini, A., & Zebarjadi, A.R. (2010). Expression of human interferon gamma in *Brassica napus* seeds. *African Journal of Biotechnology*, 9(32), 5066-5072.
- Bagis, H., Aktoprakligil, D., Gunes, C., Arat, S., Akkoc, T., Cetinkaya, G., et al. (2011). Expression of biologically active human interferon gamma in the milk of transgenic mice under the control of the murine whey acidic protein gene promoter. *Biochemical Genetics*, 49, 251-257. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10528-010-9403-7>
- Bahonar, S., Palizban, F., & Montazeri, H. (2022). Expression profile of tumor educated platelets as biomarkers for diagnosis and early detection of cancer. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 11(1), 54-63. URL: <http://gebsj.ir/article-1-412-fa.html>
- Blin-Wakkach, C., Wakkach, A., Sexton, P.M., Rochet, N., & Carle, G.F. 2004. Hematological defects in the *oc/oc* mouse, a model of infantile malignant osteopetrosis. *Leukemia*, 18(9), 1505-151. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403449>
- Bolko, L., Jiang, W., Tawara, N., Landon-Cardinal, O., Anquetil, C., Benveniste, O., et al. (2021). The role of interferons type I, II and III in myositis: a review. *Brain Pathology*, 31, e12955. DOI: <https://doi.org/10.1111/bpa.12955>
- Chen, J., Li, Y., Lai, F., Wang, Y., Sutter, K., Dittmer, U., et al. (2021). Functional comparison of interferon- α subtypes reveals potent hepatitis B virus suppression by a concerted action of interferon- α and interferon- γ signaling. *Hepatology*, 73(2), 486-502. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.31282>
- Chen, T.L., Lin, Y.L., Lee, Y.L., Yang, N.S., & Chan, M.T. (2004). Expression of bioactive human interferon gamma in transgenic rice cell suspension cultures. *Transgenic Research*, 13(5), 499-510. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11248-004-2376-8>
- Chen, W.S., Villaflores, O.B., Jinn, T.R., Chan, M.T., Chang, Y.C., & Wu, T.Y. (2011). Expression of recombinant human interferon-gamma with antiviral activity in the bi-cistronic baculovirus-insect/larval system. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(7), 1342-1348. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.110107>
- Chung, B.K., Yusufi, F.N., Yang, Y., & Lee, D.Y. (2013). Enhanced expression of codon optimized interferon gamma in CHO cells. *Journal of Biotechnology* 167(3): 326-333. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.011>
- Condos, R., Rom, W.N., & Schluger, N.W. (1997). Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet*, 349(9064), 1513-1515. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)12273-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)12273-X)
- Cui, D., Huang, G., Yang, D., Huang, B., & An, B. (2013). Efficacy and safety of interferon-gamma-targeted therapy in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 37(5), 507-513. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2012.12.004>
- Czarniecki, C.W., & Sonnenfeld, G. (2006). Clinical applications of interferon-gamma. In: Meager A (ed.) *The interferons: characterization and application*. Wiley-VCH Weinheim, 309-336. DOI: <https://doi.org/10.1002/3527608206.ch11>
- Davoudi, N., Hemmati, A., Khodayari, Z., Adeli, A., & Hemayatkar, M. (2011). Cloning and expression of human IFN- in *Leishmania tarentolae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1893-1899. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0648-4>
- De Leede, L.G., Humphries, J.E., Bechet, A.C., Van Hoogdalem, E.J., & Spencer, D.G. (2008). Novel controlled release *Lemna*-derived IFN- α 2b (Locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 28(2), 113-122. DOI: <https://doi.org/10.1089/jir.2007.0073>
- Derynck, R., Singh, A., & Goeddel, D.V. (1983). Expression of the human interferon-gamma cDNA in yeast. *Nucleic Acids Research*, 11(6), 1819-1837. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/11.6.1819>

- Di Bisceglie, A.M., & Hoofnagle, J.H. (2002). Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology* 36(S1): S121-S127. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.1840360716>
- Dummer R. 2005. Emerging drugs in cutaneous T-cell lymphomas. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 10, 381-392. DOI: <https://doi.org/10.1517/14728214.10.2.381>
- Dunn, G.P., Koebel, C.M., & Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 6(11), 836-848. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri1961>
- Ebrahimi, N., Rajabi Memari, H., Ebrahimi, M.A., & Roayaei Ardakani, M. (2012). Cloning, transformation and expression of human gamma interferon gene in tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 26(2), 2925-2929. DOI: <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2012.0004>
- Edelbaum, O., Stein, D., Holland, N., Gafni, Y., Livneh, O., Novick, D., et al. (1992). Expression of active human interferon-beta in transgenic plants. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 12(6), 449-453. DOI: <https://doi.org/10.1089/jir.1992.12.449>
- Egelkrout, E., Rajan, V., & Howard, J.A. (2012). Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant Science*, 184, 83-101. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.12.005>
- Filiz, S., Uygun, D.F.K., Sanal, Ö., Camcioğlu, Y., Somer, A., Barlan, I., et al. (2022). The demographic datas of chronic granulomatous disease patients and the comparison of the clinical datas before and after interferon-gamma treatment in our country. *Asthma Allergy Immunology*, 11(3), 153-161.
- Fukuzawa, N., Tabayashi, N., Okinaka, Y., Furusawa, R., Furuta, K., Kagaya, U., et al. (2010). Production of biologically active Atlantic salmon interferon in transgenic potato and rice plants. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(2), 201-207. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.02.005>
- Grassegger, A., Schuler, G., Hessenberger, G., Walder-Hantich, B., Jabkowski, J., MacHeiner, W., et al. (1998). Interferon-gamma in the treatment of systemic sclerosis: a randomized controlled multicentre trial. *British Journal of Dermatology*, 139(4), 639-648. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1998.02460.x>
- Gray, P.W., Leung, D.W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C.C., et al. (1982). Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature*, 295(5849), 503-508. DOI: <https://doi.org/10.1038/295503a0>
- Gyurova, I.E., Ali, A., & Waggoner, S.N. (2020). Natural killer cell regulation of B cell responses in the context of viral infection. *Viral Immunology*, 33(4), 334-341. DOI: <https://doi.org/10.1089/vim.2019.0129>
- Hashioka, S., McGeer, E.G., Miyaoka, T., Wake, R., Horiguchi, J., & McGeer, P.L. (2015). Interferon-γ-induced neurotoxicity of human astrocytes. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 14(2), 251-256. DOI: <https://doi.org/10.2174/1871527314666150217122305>
- Haynes, J., & Weissman, C. (1983). Constitutive, long-term production of human interferons by hamster cells containing multiple copies of a cloned interferon gene. *Nucleic Acids Research*, 11(3), 687-706. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/11.3.687>
- Heidari-Japelaghi, R., Haddad, R., Valizadeh, M., Dorani-Uliaie, E., & Jalali-Javaran, M. (2019a). Elastin-like polypeptide fusions for high-level expression and purification of human IFN-γ in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, 585, 113401. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113401>
- Heidari-Japelaghi, R., Valizadeh, M., Haddad, R., Dorani-Uliaie, E., & Jalali-Javaran, M. (2020a). Fusion to elastin-like polypeptide increases production of bioactive human IFN-γ in tobacco. *Transgenic Research*, 29, 381-394. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11248-020-00205-y>
- Heidari-Japelaghi, R., Valizadeh, M., Haddad, R., Dorani-Uliaie, E., & Jalali-Javaran, M. (2020b). Production of bioactive human IFN-γ protein by agroinfiltration in tobacco. *Protein Expression and Purification*, 173, 105616. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105616>
- Heidari-Japelaghi, R., Valizadeh, M., Haddad, R., Dorani-Uliaie, E., & Jalali-Javaran, M. (2019b). Elastin-like polypeptide fusions enhance transient expression of human IFN-γ in tobacco leaves. *South African Journal of Botany*, 125, 321-328. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.08.003>
- Hirata, T., & Kizuka, Y. (2021). N-glycosylation. In: Lauc G, Trbojević-Akmačić I (eds.) *The role of glycosylation in health and disease*. *Advances in experimental medicine and biology*. vol 1325, Springer, Cham.
- Hu, Z.J., Xu, J., Yin, J.M., Li, L., Hou, W., Zhang, L.L., et al. (2020). Lower circulating interferon-gamma is a risk factor for lung fibrosis in COVID-19 patients. *Frontiers in immunology*, 11, 585647. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585647>
- Huang, S.K., Jin, J.Y., Guan, Y.X., Yao, Z., Cao, K., & Yao, S.J. (2013). Refolding of recombinant human interferon gamma inclusion bodies in vitro assisted by colloidal thermo-sensitive poly(N-isopropylacrylamide) brushes grafted onto the surface of uniform polystyrene cores. *Biochemical Engineering Journal*, 74, 20-26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.02.015>
- Imel, E.A., Ziyue Liu, Z., Acton, D., Coffman, M., Gebregziabher, N., Tong, Y., et al. (2019). Interferon gamma-1b does not increase markers of bone resorption in autosomal dominant osteopetrosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 34(8), 1436-1445. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbmr.3715>
- Izu, A.E., Jaffe, H.S., Curnutte, J.T., & Ezekowitz, R.A.B. (2020). Interferon-gamma treatment of chronic granulomatous disease. In: *Anti-infective applications of interferon-gamma*. CRC Press, 11-28.
- Jiang, M.C., Hu, C.C., Lin, N.S., & Hsu, Y.H. (2019). Production of human IFN-γ protein in *Nicotiana benthamiana* plant through an enhanced expression system based on bamboo mosaic virus. *Viruses*, 11(509), 1-18. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11060509>
- Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L., & Zhang, Y. (2020). Roles of IFN-γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research*, 8, 49. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>
- Key, L.L.Jr., Ries, W.L., Rodriguiz, R.M., & Hatcher, H.C. (1992). Recombinant human interferon gamma therapy for osteopetrosis. *The Journal of Pediatrics*, 121(1), 119-124. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)82557-0](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)82557-0)
- Kim, D-Y., Han, D-K., Beak, H-J., Jung, S-T., Kook, H., & Hwang, Y-J. (2007). Long-term recombinant interferon-γ treatment in 2 cases of osteopetrosis. *Korean Journal of Pediatrics*, 50(11), 1129-1133.

- Lagutin, O.V., Dobrovolsky, V.N., Vinogradova, T.V., Kyndiakov, B.N., Khodarovich, Y.M., Jenkins, N., et al. (1999). Efficient human IFN-gamma expression in the mammary gland of transgenic mice. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 19(2), 137-144. DOI: <https://doi.org/10.1089/107999099314289>
- Leister, P., Tileva, M., Krachmarova, E., & Nacheva, G. (2013). Expression of human interferon-gamma gene in human tissue culture cells. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(1), 3573-3576. DOI: <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2012.0128>
- Marciano, B.E., Wesley, R., De Carlo, E.S., Anderson, V.L., Barnhart, L.A., Darnell, D., et al. (2004). Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clinical Infectious Diseases*, 39(5), 692-699. DOI: <https://doi.org/10.1086/422993>
- Martínez-Planas, A., Baquero-Artigao, F., Santiago, B., Fortuny, C., Méndez-Echevarría, A., Del Rosal, T., et al. (2021). Interferon-gamma release assays differentiate between mycobacterium avium complex and tuberculous lymphadenitis in children. *The Journal of Pediatrics*, 236, 211-218. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2021.05.008>
- Martínez-Sabadell, A., Arenas, E.J., & Arribas, J. (2022). IFN- γ signaling in natural and therapy-induced antitumor responses IFN- γ signaling in antitumor responses. *Clinical Cancer Research*, 28(7), 1243-1249. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-3226>
- Mikulecký, P., Zahradník, J., Kolenko, P., Černý, J., Charnavets, T., Kolárová, L., et al. (2016). Crystal structure of human interferon- γ receptor 2 reveals the structural basis for receptor specificity. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 72(9), 1017-1025. DOI: <https://doi.org/10.1107/S2059798316012237>
- Milanes-Virelles, M., Garcia-Garcia, I., Santos-Herrera, Y., Valdes-Quintana, M., Valenzuela-Silva, C.M., Jimenez-Madrigal, G., et al. (2008). Adjuvant interferon gamma in patients with pulmonary atypical Mycobacteriosis: a randomized, double-blind, placebocontrolled study. *BMC Infectious Diseases*, 8, 17. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-17>
- Miller, C.H., Maher, S.G., & Young, H.A. (2009). Clinical use of interferon- γ . *Annals of the New York Academy of Science Journal*, 1182(1), 69-79. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05069.x>
- Mironova, R., Niwa, T., Dimitrova, R., Boyanova, M., & Ivanov, I. (2003). Glycation and post-translational processing of human interferon- γ expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51068-51074. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M307470200>
- Mori, M., Zhang, G.H., Kaido, M., Okuno, T., & Furusawa, I. (1993). Efficient production of human gamma interferon in tobacco protoplasts by genetically engineered brome mosaic virus RNAs. *Journal of General Virology*, 74(7), 1255-1260. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-7-1255>
- Moss, R.B., Hsu, Y.P., & Olds, L. (2009). Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology*, 120(3), 518-525. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01232.x>
- Moss, R.B., Mayer-Hamblett, N., Wagener, J., Daines, C., Hale, K., Ahrens, R., et al. (2004). Randomized, double-blind, placebocontrolled, dose-escalating study of aerosolized interferon gamma-1b in patients with mild to moderate cystic fibrosis lung disease. *Pediatric Pulmonology*, 39(3), 209-218. DOI: <https://doi.org/10.1002/ppul.20152>
- Muir, A.J., Sylvestre, P.B., & Rockey, D.C. (2006). Interferon gamma-1b for the treatment of fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Journal of Viral Hepatitis*, 13(5), 322-328. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00689.x>
- Myasnikov, A.L., Berns, S.A., Talyzin, P.A., & Ershov, F.I. (2021). Interferon gamma in the treatment of patients with moderate COVID-19. *Problems of Virology*, 66, 47-54. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-24>
- Nacheva, G., Todorova, K., Boyanova, M., Berzal-Herranz, A., Karshikoff, A., & Ivanov, I. (2003). Human interferon gamma: significance of the C-terminal flexible domain for its biological activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 413(1), 91-98. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00113-9](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00113-9)
- Nakajima, T., Tsunoda, S., Nakada, S., Nagata, S., & Oda, K. (1992). Hyperproduction of human interferon γ by rat cells maintained in low-serum medium using the fibronectin gene promoter. *Journal of Biochemistry*, 112(5), 590-597. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123945>
- Nassaj Hosseini, S.M., Shams-Bakhsh, M., Salamanian, A.H., & Yeh, S.D. (2012). Expression and purification of human interferon gamma using a plant viral vector. *Progress in Biological Sciences*, 2(2), 104-115. DOI: <https://doi.org/10.22059/pbs.2013.2715>
- Ni, L., & Lu, J. (2018). Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Medicine*, 7(9), 4509-4516. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.1700>
- Okay, G., Koc, M.M., Guler, E.M., Yabaci, A., Kocyigit, A., & Akkoyunlu, Y. (2020). The effect of antiretroviral therapy on IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ levels and their relationship with HIV-RNA and CD4+ T cells in HIV patients. *Current HIV Research*, 18(5), 354-361. DOI: <https://doi.org/10.2174/1570162X18666200712174642>
- Pappas, P., Bustamante, B., Ticona, E., Hamill, R.J., Johnson, P.C., Reboli, A., et al. (2004). Recombinant interferon- γ 1b as adjunctive therapy for AIDS-related acute cryptococcal meningitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(12), 2185-2191. DOI: <https://doi.org/10.1086/420829>
- Premzl, M. (2020). Comparative genomic analysis of eutherian interferon genes. *Genome*, 112(6), 4749-4759. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.08.029>
- Raghu, G., Brown, K.K., Bradford, W.Z., Starko, K., Noble, P.W., Schwartz, D.A., et al. (2004). A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 350(2), 125-133. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030511>
- Raghu, G. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis: Lessons from clinical trials over the past 25 years. *European Respiratory Journal*, 50(4), 1701209. DOI: <https://doi.org/10.1183/13993003.01209-2017>
- Razaghi, A., Owens, L., & Heimann, K. (2016a). Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: impacts of production platforms and glycosylation. *Journal of Biotechnology*, 240, 48-60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.022>
- Razaghi, A., Tan, E., Lua, L., Owens, L., Karthikeyan, O.P., & Heimann, K. (2016b). Is *Pichia pastoris* a realistic platform for industrial production of recombinant human interferon gamma?

- Biologicals, 45, 52-60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.09.015>
- Razmi, S., Jalali Javaran, M., Bagheri, A., Honari, H., & Soleimani Zadeh, M. (2019). Expression of human interferon gamma in tobacco chloroplasts. *Romanian Biotechnological Letters*, 24(2), 208-215. DOI: 10.25083/rbl/24.2/208.215
- Riddell, L.A., Pinching, A.J., Hill, S., Ng, T.T., Arbe, E., Lapham, G.P., et al. (2001). A phase III study of recombinant human interferon gamma to prevent opportunistic infections in advanced HIV disease. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 17(9), 789-797. DOI: 10.1089/088922201750251981
- Rodrigues, M.E., Costa, A.R., Henriques, M., Cunnah, P., Melton, D.W., Azeredo, J., et al. (2013). Advances and drawbacks of the adaptation to serum-free culture of CHO-K1 cells for monoclonal antibody production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(4), 1279-1291. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0068-z>
- Rojas Contreras, J.A., Pedraza-Reyes, M., Ordonez, L.G., Estrada, N.U., Barba de la Rosa, A.P., & De Leon-Rodriguez, A. 2010. Replicative and integrative plasmids for production of human interferon gamma in *Bacillus subtilis*. *Plasmid*, 64(3), 170-176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.07.003>
- Sandborn, W.J., Rutgeerts, P., Colombel, J-F., Ghosh, S., Petryka, R., Sands, B.E., et al. (2017). Eldelumab [anti-interferon- γ -inducible protein-10 antibody] induction therapy for active Crohn's Disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIa study. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11(7), 811-819. DOI: <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx005>
- Sareneva, T., Cantell, K., Pyhälä, L., Pirhonen, J., & Julkunen, I. (1993). Effect of carbohydrates on the pharmacokinetics of human interferon- γ . *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 13(4), 267-269. DOI: 10.1089/jir.1993.13.267
- Sareneva, T., Mortz, E., Tölö, H., Roepstorff, P., & Julkunen, I. (1996). Biosynthesis and N-glycosylation of human interferon- γ : Asn₂₅ and Asn₉₇ differ markedly in how efficiently they are glycosylated and in their oligosaccharide composition. *European Journal of Biochemistry*, 242(2), 191-200. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0191r.x
- Selman, M., Thannickal, V.J., Pardo, A., Zisman, D.A., Martinez, F.J., & Lynch, J.P. (2004). Idiopathic pulmonary fibrosis: Pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs*, 64, 405-430. DOI: <https://doi.org/10.2165/00003495-200464040-00005>
- Sigidin, Y.A., Loukina, G.V., Skurkovich, B., & Skurkovich, S. (2001). Randomized, double-blind trial of anti-interferon-gamma antibodies in rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 30(4), 203-207. DOI: <https://doi.org/10.1080/030097401316909530>
- Skurkovich, B., & Skurkovich, S. (2003). Anti-interferon-gamma antibodies in the treatment of autoimmune diseases. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 5(1), 52-57.
- Talaat, R.M., Elsharnoby, S., Abdelkhalek, M.S., El-Shenawy, S.Z., & Elmasry, S. (2022). The impact of interferon- γ (IFN- γ) and IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10) genes' polymorphism on risk of Hepatitis C Virus-related liver cirrhosis. *Immunological Investigations*, 51(3), 688-704. DOI: <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1869251>
- Tsai, M., Thauland, T.J., Huang, A.Y., Bun, C., Fitzwater, S., Krogstad, P., et al. (2020). Disseminated coccidioidomycosis treated with interferon- γ and dupilumab. *The New England Journal of Medicine*, 382(24), 2337-2343. DOI: 10.1056/NEJMoa2000024
- Wang, D., Ren, H., Xu, J.W., Sun, P.D., & Fang, X.D. (2014). Expression, purification and characterization of human interferon- γ in *Pichia pastoris*. *Molecular Medicine Reports*, 9(2), 715-719. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1812>
- Wirusanti, N.I., Baldridge, M.T., & Harris, V.C. (2022). Microbiota regulation of viral infections through interferon signaling. *Trends in Microbiology*, 30(8), 778-792. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.01.007>
- Wu, Y., Zhao, D., Song, L., & Xu, W. (2009). Heterologous expression of synthetic chicken IFN- γ in transgenic tobacco plants. *Biologia*, 64(6), 1115-1122. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11756-009-0203-7>
- Xie, F.J., Zhao, P., Zhang, Y.P., Liu, F.Y., Nie, X.L., Zhu, Y.H., et al. (2013). Adenovirus-mediated Interferon- γ gene therapy induced human pancreatic carcinoma capan-2 cell apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *The Anatomical Record*, 296(4), 604-610. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.22661>
- Yaghtin, A., Jalali Javaran, M., & Karimzadeh, G. (2012). Transfer of human interferon γ -oleosin genes to safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 1(2), 93-102. URL: <http://gebsj.ir/article-1-231-fa.html>
- Yang, Y., Wang, H.J., Hu, W.L., Bai, G.N., & Hua, C.Z. (2022). Diagnostic value of interferon-gamma release assays for tuberculosis in the immunocompromised population. *Diagnostics*, 12(2), 453. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics12020453>
- Zhang, S., Li, X., Tian, Y., Chen, H., Liang, D., Chen, K., et al. (2022). Assay for interferon gamma release as a novel marker in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Research Square*. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2272370/v1>.
- Zhao, P., Zhu, Y.H., Wu, J.X., Liu, R.Y., Zhu, X.Y., Xiao, X., et al. (2007). Adenovirus-mediated delivery of human IFN γ gene inhibits prostate cancer growth. *Life Science*, 81(9), 695-701. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.05.028>
- Ziesche, R., Hofbauer, E., Wittmann, K., Petkov, V., & Block, L.H. (1999). A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 341(17), 1264-1269. DOI: 10.1056/NEJM199910213411703
- Zuo, Y., Wu, J., Xu, Z., Yang, S., Yan, H., Tan, L., et al. (2011). Minicircle-oriP-IFN γ : a novel targeted gene therapeutic system for EBV positive human nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*, 6(5), 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019407>
- Zwerling, A., Van Den Hof, S., Scholten, J., Cobelens, F., Menzies, D., & Pai, M. (2012). Interferon-gamma release assays for tuberculosis screening of healthcare workers: a systematic review. *Thorax*, 67(1), 62-70. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/thx.2010.143180>