خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۱ شماره ۲ تابستان ۹۳ (۱۳۶-۱۲۶)

مقاله پژوهشی

غنی‌سازی کتابخانه نمایش فاژی علیه سلول‌های سرطانی سینه به منظور جداسازی آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری شناساگر فاکتور رشد اپیدرمالی۲

فاطمه رحیمی جمنانی[۱]، فاطمه رهبری‌زاده[۲]، محمد علی شکرگزار[۳]، داوود احمدوند[۴]، فریدون مهبودی[۵]

چکیده

سابقه و هدف

ریزش مارکرهای سرطانی مانند HER2 از سطح سلول‌های سرطانی سینه، باعث مخفی ماندن آن‌ها از دید سلول‌های ایمنی می‌گردد. افزایش غلظت HER2 محلول(sHER2)، در نتیجه درمان سرطان سینه $HER2^+$ و پاسخ به تراستوزومب، تاثیرگذار است. در همین راستا، آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری(VHH) به علت خصوصیات منحصر به فرد و توانایی بالا در شناسایی آنتی‌ژن، مواد هدفمند بسیار مؤثری در شناسایی sHER2 محسوب می‌گردند.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، کتابخانه فاژی به دست آمده از دو شتر ایمن با انجام panning بر روی سلول‌های سرطانی فاقد HER2 و بیان‌کننده HER2 ، علیه آنتی‌ژن HER2 غنی گردید. میزان افینیتی چهار VHH به دست آمده به HER2 ، شناسایی sHER2 و اتصال به HER2 بر روی سلول‌های سرطانی سینه توسط VHHها با الایزا مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

بعد از انجام panning بر روی سلول و الایزا، چهار VHH با اتصال قابل ملاحظه به HER2 در مقایسه با کنترل منفی شناسایی شدند. VHHهای با افینیتی 10^{12}-10^{13} M^{-1}، توانایی بالایی هم در شناسایی sHER2 (۲ میکروگرم در میلی لیتر) نشان دادند. در اتصال به HER2 در سطح سلول، آنتی‌بادی‌های(VHH) RR_4 و RR_6 بالاترین میزان اتصال(به ترتیب ۰/۳۳ ± ۲ و ۰/۱۵ ± ۲/۵) به سلول SKBR3 (بیان‌کننده HER2) را در مقایسه با سلول فاقد HER2 (به ترتیب ۰/۱۷ ± ۰/۳۸ و ۰/۱۲ ± ۰/۴) نشان دادند.

نتیجه گیری

استفاده از VHHهای اختصاصی HER2 برای سنجش sHER2 به عنوان بیومارکر، ارزیابی مناسبی از وضعیت HER2 در تومور اولیه و متعاقباً پاسخ به درمان می‌دهد.

کلمات کلیدی: ژن‌ها، HER2 ، سرطان سینه

تاریخ دریافت : ۹۲/۲/۳۰
تاریخ پذیرش : ۹۲/۹/۱۸

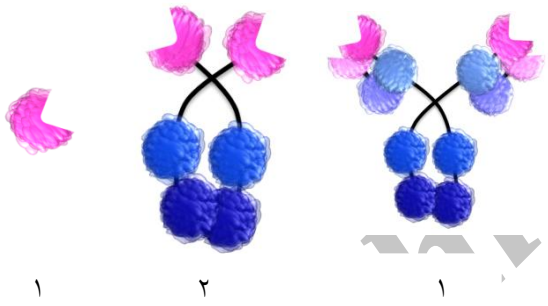
۱ـ PhD بیوتکنولوژی دارویی ـ استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران ـ تهران ـ ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی ـ دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵
۳- PhD فرآورده‌های بیولوژیک ـ دانشیار بانک سلولی انستیتو پاستور ایران ـ تهران ـ ایران
۴ـ PhD بیوشیمی پزشکی ـ استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۵- PhD ایمونولوژی ـ دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران ـ تهران ـ ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

خانواده گیرنده فاکتور رشد اپیدرمالی(HER = Human Epidermal growth factor Receptor یا HER family) از پروتئین‌های سطح سلول است که در انسان شامل HER1 ، HER2 ، HER3 و HER4 می‌باشد. اعضای خانواده HER از مدیاتورهای ضروری برای تکثیر و تمایز در جنین در حال رشد و بافت‌های بالغین محسوب می‌شوند که بیان بیش از حد و فعالیت نامناسب آن‌ها با توسعه و شدت تعداد زیادی از سرطان‌ها مرتبط است(۲، ۱). HER2 از آنتی‌ژن‌های مهم در سرطان به شمار می‌آید زیرا بیان بیش از حد آن، باعث افزایش تکثیر سلول توموری، تشکیل رگ و خاصیت تهاجمی می‌گردد. بیان بیش از حد HER2 در ۳۰٪–۲۵٪ از سرطان‌های سینه و در سایر سرطان‌ها مانند تخمدان، رحم، معده، کولون، مغز و پانکراس نشان از اهمیت این آنتی‌ژن می‌باشد(۳). آنتی‌ژن HER2 ، پروتئینی ۱۲۵۵ اسید آمینه است و دارای ناحیه خارج سلولی، دومین ترانس ممبرانی دوگانه‌دوست(آمفی پاتیک) و دومین درون سلولی تیروزین کینازی بسیار حفاظت شده(Conserved) می‌باشد(۴). تاکنون لیگاندی برای آنتی‌ژن HER2 شناخته نشده ولی ترجیحاً به صورت رسپتور همراه(پارتنری) در هترودایمریزاسیون(به عنوان کورسپتور) برای سایر اعضای خانواده (EGFR یا HER3)، عمل می‌کند. همو یا هترودایمریزاسیون اعضای خانواده باعث ترانس فسفریلاسیون دومین تیروزین کیناز و سیگنال ترانس داکشن می‌گردد(۵).

بعد از گذشت ربع قرن از ساخت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، امروزه آنتی‌بادی به عنوان یکی از پرکاربردترین عوامل درمانی علیه انواع بیماری‌های انسانی از جمله سرطان، محسوب می‌شود. آنتی‌بادی‌های نوترکیب بیش از ۳۰٪ داروهای بیولوژیک را در آزمون‌های بالینی تشکیل می‌دهند و پیش‌بینی شده است که فروش آنتی بادی‌ها به حدود ۳۰ بیلیون دلار در سال‌های اخیر برسد(۷، ۶). در سال ۱۹۹۳ نوع منحصر به فردی از آنتی‌بادی‌های فاقد زنجیره سبک در سرم انواع شترهای یک کوهانه و لاما شناسایی شد(شکل ۱)(۸). آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری (VHH = Variable domain of camel heavy-chain antibody) به علت اختصاصیت، افینیتی بالا و اندازه کوچک برای مورد هدف قرار دادن آنتی‌ژن‌ها در مکان‌های مسدود نظیر تومورها که نفوذ دارو به آن‌ها به علت وضعیت نامناسب عروقی مشکل می‌باشد، بسیار مناسب هستند(۹، ۸). VHHها از لحاظ ایمنی‌زایی بسیار ضعیف می‌باشند به طوری که در مطالعه‌های بالینی، تجویز مکرر آن‌ها منجر به هیچ پاسخ ایمنی سلولی یا همورالی قابل توجهی نشده است(۱۰، ۸). آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری بسیاری علیه انواع آنتی‌ژن‌های سرطانی از جمله MUC1 (MUCin1) ، EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)، VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) و اندوگلین تولید شده‌اند که با نتایج امید بخشی در مهار سلول‌های سرطانی همراه بوده‌اند (۱۲–۱۰).



شکل ۱: نمای شماتیکی از آنتی‌بادی IgG (۱)، آنتی‌بادی زنجیره سنگین(۲) و تک دومینی شتری(۳)

از جمله مسیرهای فرار سلول‌های توموری سینه از دید اجزای سیستم ایمنی، ریزش آنتی‌ژن‌های سرطانی مانند HER2 می‌باشد(۱۵–۱۳). فرم ریزش‌یافته آنتی‌ژن HER2 در سرم افراد بیمار، دید مناسبی از روند سرطان و درمان در بیماران می‌دهد. در همین راستا در این مطالعه، برای اولین بار پنلی از آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به منظور هدف قرار دادن ناحیه خارج سلولی آنتی‌ژن HER2 (sHER2)، شناسایی و تعیین خصوصیت گردید.

مواد و روش‌ها

تکثیر کتابخانه و تخلیص ذرات فاژی:

در یک مطالعه تجربی کتابخانه فاژی pComb3X قطعه

Archive of SID
www.SID.ir

cDNA آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به دست آمده از شترهای ایمن شده با عصاره بافت‌های سرطانی سینه انسانی، علیه آنتی‌ژن HER2 بر روی سلول‌های سرطانی سینه غنی گردید(۱۷، ۱۶). بدین ترتیب که ابتدا ۲۰ میکرولیتر از کتابخانه ژنی شتری به ۵ میلی‌لیتر محیط حاوی باکتری *E. coli* TG1 (استراتاژن) در وضعیت رشد لگاریتمی (OD600=۱) افزوده شد. ناقل فاژمیدی pComb3X دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد به همین منظور ۸ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین(۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در دو نوبت و به فاصله ۳۰ دقیقه اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر فاژ کمکی M13KO7 (GE Healthcare) دارای ژن مقاومت به کانامایسین اضافه و انکوباسیون به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محتویات لوله‌های حاوی باکتری‌های دارای فاژ به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد و حجم به ۲۵ میلی‌لیتر افزایش یافت. آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کانامایسین برای حجم مورد نظر اضافه گردید و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت صورت گرفت. محتویات ارلن به لوله‌های سانتریفوژ انتقال یافت و سانتریفوژ(۳۸۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه) انجام شد. فاژهای موجود در مایع‌رویی با استفاده از پلی‌اتیلن گلایکول ۶۰۰۰ ، نمک کلرید سدیم ۲/۵ مولار در آب (روی یخ) و سانتریفوژ(۱۸۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه)، رسوب داده شدند. فاژهای تغلیظ شده بر روی دیواره با ۱ میلی‌لیتر شیر خشک بدون چربی در فسفات بافر سالین(۴٪) (MPBS = Skim Milk in phosphate – buffered saline) شسته و جمع‌آوری شدند.

غنی‌سازی کتابخانه فاژی با انجام panning بر روی سلول:

روند panning سلولی با (cfu/mL) ۱۰۱۴ از فاژ بر روی سلول‌های فاقد آنتی‌ژن HER2 (HepG2) و سپس بیان‌کننده آنتی‌ژن HER2 (SKBR3 = Human breast cancer cell line) آغاز شد. سلول‌های HepG2 و SKBR3 (بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) در فلاسک‌های ۷۵ سانتی‌متر مربع دارای محیط DMEM (جیبکو)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین(۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و گلوتامین (۲ میلی‌مولار) کشت داده و بعد از رسیدن به تراکم ۹۰٪، تریپسینه (۰/۰۲۵٪ تریپسین در EDTA وزنی/حجمی) شدند. بعد از شمارش سلول‌ها با لام نئوبار و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو، $۲/۶\times ۱۰^{۶}$ سلول HepG2 و $۱/۴\times ۱۰^{۶}$ سلول SKBR3 (در ۱ میلی لیتر MPBS (۵٪))، به فالکون ۱۵ انتقال داده و بلاکینگ به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انجام شد. بعد از سانتریفوژ (۱۰۰۰ دور به مدت ۴ دقیقه)، مایع رویی را دور ریخته و رسوب سلولی HepG2 با کتابخانه فاژی تکثیر یافت و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. انکوباسیون سلول‌های HepG2 با کتابخانه فاژی، جهت حذف فاژهای غیراختصاصی می باشد. سلول‌های HepG2 (منفی) و SKBR3 (مثبت) سانتریفوژ شدند، مایع رویی سلول منفی به رسوب سلول مثبت انتقال یافت و انکوباسیون به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انجام شد. لوله حاوی سلول‌های مثبت سانتریفوژ(۱۰۰۰ دور به مدت ۴ دقیقه) شد. رسوب سلولی در ۲ میلی لیتر MPBS معلق و مجدداً سانتریفوژ(۱۰۰۰ دور به مدت ۴ دقیقه) گردید. این چرخه شستشو ۳ بار با MPBS و ۳ بار با PBS سرد تکرار شد. جداسازی فاژهای اختصاصی متصل به سلول‌های SKBR3 با ۱ میلی‌لیتر تری اتیل آمین (۱۰۰ میلی‌مولار) به مدت ۴ دقیقه در دمای اتاق صورت گرفت. محلول حاصل با ۱ میلی‌لیتر تریس ـ هیدروکلراید خنثی، سانتریفوژ(۱۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) گردید. مایع رویی به ۵ میلی‌لیتر باکتری *E. coli* TG1 در فاز لگاریتمی اضافه شد. مراحل تکثیر با افزودن فاژ کمکی و تخلیص با پلی‌اتیلن گلایکول صورت گرفت. panning برای دو دور دیگر ادامه یافت بدین ترتیب که در دور دوم تعداد شستشو به میزان ۶ بار با MPBS ، ۶ بار با PBS سرد و و ۸ بار در دور سوم افزایش یافت.

شناسایی فاژهای اختصاصی آنتی‌ژن HER2:

بعد از انجام سه دور panning و تکثیر فاژهای اختصاصی آنتی‌ژن HER2 ، نهایتاً سه Input و سه Output به دست آمد که وارد سنجش پلی‌کلونال فاژ الایزا شدند. ابتدا چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه با آنتی‌بادی بزی علیه Fc

Archive of SID
www.SID.ir

آنتی‌بادی IgG انسانی(سیگما) پوشش داده شدند و سپس آنتی‌ژن recombinant HER2-Fc chimera (R&D systems) (۱۰۰ نانوگرم به ازای ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک) به آن‌ها افزوده شد. بعد از انکوباسیون با ماده بلاکینگ (MPBS (۵٪)) به مدت ۱ ساعت، Input های ۱ تا ۳ به چاهک‌های تعیین شده اضافه و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از شستشو با توئین ۲۰ در PBS (۰/۰۵٪)، آنتی‌بادی علیه M13 متصل به آنزیم HRP (رُوش) افزوده شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت را شسته و ماده TMB اضافه گردید. توقف واکنش با هیدروکلریک اسید صورت گرفت و میزان جذب نوری(OD = ۱) در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه سنجش الایزا (ELISA-Reader) (آمریکا، STAT FAX ۲۱۰۰) خوانده شد. سنجش پلی‌کلونال فاژ الایزا برای یافتن Input با بالاترین میزان تفاوت سیگنال با کنترل منفی(آلبومین سرم گاوی (BSA)، صورت گرفت. Input مورد نظر در باکتری TG1 تکثیر و سپس به پلیت دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین منتقل گردید. مونوکلونال فاژ الایزا برای تک تک کلون‌ها انجام شد. بدین ترتیب که تک کلون برداشته شده با کمک فاژ کمکی تکثیر یافت و مانند پلی‌کلونال فاژ الایزا، اختصاصیت فاژهای تخلیص شده از تک کلون‌ها به آنتی‌ژن HER2 مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی عملکرد آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری اختصاصی آنتی ژن HER2:

فاژهای تخلیص شده از تک کلون‌ها با بیشترین میزان اختلاف با کنترل منفی(چاهک دارای آلبومین سرم گاوی) به درون باکتری غیر سرکوبگر *E. coli* Rosetta gami II (نوازن) انتقال یافت. بعد از تکثیر یافتن باکتری‌ها و رسیدن جذب نوری به ۰/۹ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، القا با IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalacto pyranoside) یک میلی‌مولار صورت گرفت. برای جداسازی پروتئین‌های سیتوپلاسمی، رسوب باکتریایی سونیکه (۳ بار برای ۱ دقیقه و فاصله ۳۰ ثانیه در یخ) انجام و سوسپانسیون حاصله سانتریفوژ (۱۵۰۰۰ دور برای ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد) شد. اختصاصیت آنتی‌بادی‌های تک دومین شتری (VHH) موجود در مایع رویی به آنتی‌ژن HER2 در مقایسه با کنترل های منفی(چاهک‌های دارای آلبومین سرم گاوی و آنتی‌بادی بزی علیه ناحیه Fc آنتی بادی IgG انسانی) با استفاده از روش الایزا و آنتی‌بادی علیه هماگلوتینین(HA) متصل به HRP (رُوش) مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای نواحی FR (Frame work) یک و چهار، کلونی – PCR بر روی کلون‌های حاوی فاژمیدهای دارای VHH با اختصاصیت بالا به آنتی‌ژن HER2 صورت گرفت:

آغازگر:

VHH-for: 5'-GAC TAG TGC GGC CGC GTG AGG AGA CGG TGA CCTG-3'

آغازگر:

VHH-Back: 5'-CGC GGA TCC AAT GGC CGA KGT SGA GCT-3'

برای تایید، فاژمیدهای دارای VHH از کلون‌های منتخب تخلیص و برای تعیین توالی فرستاده شدند. روش‌های SDS-PAGE با استفاده از ژل آکریلامید ۱۲٪ و وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی علیه HA متصل به HRP بر اساس دستورالعمل استاندارد انجام گرفت. افینیتی VHHهای اختصاصی آنتی‌ژن HER2 ، با روش Beatty محاسبه شد(۱۸). در این روش دو رقت (۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم به ازای هر چاهک) از آنتی‌ژن HER2 و آلبومین سرم گاوی در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه استفاده شد و غلظت‌های فزاینده(۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار) از VHH به چاهک‌ها اضافه گردید. آنتی‌بادی علیه HA متصل به HRP را افزوده و فعالیت آنزیم پراکسیداز با سوبسترا TMB سنجیده شد. ثابت افینیتی(*Kaff*) آنتی‌بادی به آنتی‌ژن HER2 بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید.

$$n = Ag/Ag'$$

$$Kaff = n-1/2\,(n\,[Nb']-[Nb])$$

در این فرمول، Ag ؛ میزان آنتی‌ژن مورد استفاده در چاهک (۱۰۰ نانوگرم)

Ag' ؛ میزان آنتی‌ژن مورد استفاده در چاهک(۱۰ نانوگرم)

VHH ؛ غلظت VHH در حداکثر اتصال به آنتی‌ژن

VHH' ؛ غلظت VHH در نصف حداکثر اتصال به آنتی‌ژن

برای سنجش قدرت شناسایی آنتی‌ژن HER2 محلول

Archive of SID
www.SID.ir

توسط آنتی‌بادی‌های شتری، دو سری از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه از آنتی‌ژن HER2 (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) پوشیده شد. آنتی‌بادی شتری(۴۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) به همراه غلظت‌های افزایشی از آنتی‌ژن HER2 محلول و آنتی‌ژن MUC1 محلول (۰/۰۲ ، ۰/۲ و ۲ میکروگرم در میلی لیتر) به ترتیب به چاهک‌های سری اول و دوم افزوده شد. حداکثر اتصال(۰٪ مهار) برای آنتی‌بادی‌هایی که به آنتی‌ژن کف چاهک متصل و حداقل اتصال(۱۰۰٪ مهار) برای آنتی‌بادی‌هایی که متصل به آنتی‌ژن محلول مانده‌اند، در نظر گرفته شد. اتصال آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به آنتی‌ژن HER2 بر روی سلول SKBR3 ($HER2^{+}$) و HepG2 ($HER2^{-}$) نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که پس از رسیدن تراکم سلولی به ۹۰٪، سلول‌ها با متانول خالص به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ تثبیت شدند و سپس با MPBS ، بلاکینگ انجام گرفت. آنتی‌بادی‌های شتری (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از هر آنتی‌بادی) را افزوده و انکوباسیون به مدت ۱ ساعت انجام شد. ادامه سنجش با افزودن آنتی‌بادی علیه HA متصل به HRP صورت گرفت.

تحلیل آماری:

تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۶ صورت گرفت. گروه‌های مختلف آزمایش در مطالعه با استفاده از آزمون کروسکال ـ والیس مقایسه شدند. مقایسه بین گروهی بر اساس آزمون آماری من‌ویتنی انجام گرفت و $p<۰/۰۵$ به عنوان معنادار در نظر گرفته شد. تمامی مراحل آزمایش‌ها و روش‌های مورد استفاده به صورت سه تایی(تریپلیکیت) انجام گرفتند.

یافته‌ها

کتابخانه نمایش فاژی pComb3X در باکتری‌های TG1 با فاژ کمکی M13KO7 تکثیر شد. تعداد ۱×۱۰^{۱۴} از فاژهای تکثیر شده برای شروع panning بر روی سلول‌های سرطانی سینه بیان‌کننده آنتی‌ژن HER2 به کار رفت. طی اولین دور از panning ، تقریباً $۱۰^{۹}$ از فاژهای غیر اختصاصی در اثر شستشو خارج شده و به ۶×۱۰^{۵} رسید. فاژهای حاصل از اولین دور panning را مجدداً در باکتری TG1 و با فاژ کمکی تکثیر داده و این بار با ۵×۱۰^{۱۳} فاژ (Input۲)، مرحله دوم panning آغاز گردید. در دورهای دوم و سوم با افزایش تعداد دور شستشو و متعاقباً سانتریفوژ، میزان Output به ترتیب به ۴×۱۰^{۶} و ۸×۱۰^{۶} رسید(جدول ۱). سه Output و Input در پلی‌کلونال فاژ الایزا مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲). دور سوم دارای Output (۰/۴۹±۰/۰۵) و Input (۰/۵۵۳±۰/۱) با اختلاف OD مشخص، در مقایسه با کنترل منفی آلبومین سرم گاوی بود. از Output و Input سوم، برای انجام منوکلونال فاژ الایزا استفاده شد. بعد از سنجش ۲۰ کلون از سه

جدول ۱: نتایج Input و Output حاصل از panning بر روی سلول‌های HepG2 (منفی) و سپس SKBR3 (مثبت)

Panning بر روی سلول	دور اول	دور دوم	دور سوم
Input	۱×۱۰^{۱۴}	۵×۱۰^{۱۳}	۶×۱۰^{۱۳}
Output	۶×۱۰^{۵}	۴×۱۰^{۶}	۸×۱۰^{۶}

جدول ۲: نتایج پلی‌کلونال فاژ الایزا دورهای اول تا سوم panning بر روی آنتی‌ژن نوترکیب HER2 و کنترل منفی BSA . نتایج به صورت اختلاف OD بین آنتی‌ژن و کنترل نشان داده شد(SD ± Mean ، $p<۰/۰۵$).

دورها	Input	Output
۱	۰/۳۲۴ ± ۰/۱۵	۰/۲۷۸ ± ۰/۱
۲	۰/۴ ± ۰/۰۵	۰/۳۷ ± ۰/۰۸
۳	۰/۵۵۳ ± ۰/۱	۰/۴۹ ± ۰/۰۵

Output و ۳۰ کلون از سه Input، نهایتاً چهار کلون که بیشترین اختلاف را با کنترل نشان می‌دادند(آلبومین سرم گاوی) به Rosetta gami II برای تولید آنتی‌بادی تک دومینی شتری محلول انتقال یافتند(نمودار ۱). بعد از تایید مجدد فرم‌های محلول با الایزا و تعیین توالی، چهار کلون $RR_{۴}$ ، $RR_{۶}$ ، $RR_{۱۰}$ و $RR_{۱۶}$ که توالی‌های منحصر به فردی نشان دادند، مورد ارزیابی بیشتر قرار گرفتند(ثبت

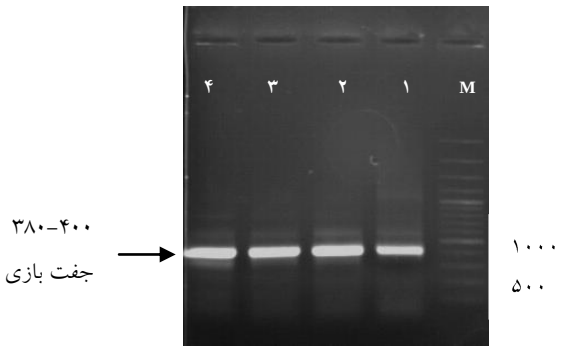
Archive of SID
www.SID.ir

شده در Genebank بـه ترتیـب JX 576799 ، JX 576800 ، JX 576801 و JX 576803). با انجام کلونی–PCR بـر روی چهار کلون حاصله(با آغازگرهای طراحـی شـده بـرای FR یک و چهار)، قطعات تقریبـاً ۴۰۰ – ۳۸۰ جفـت بـازی بـر روی ژل آگارز مشاهده گردید(شکل ۲).

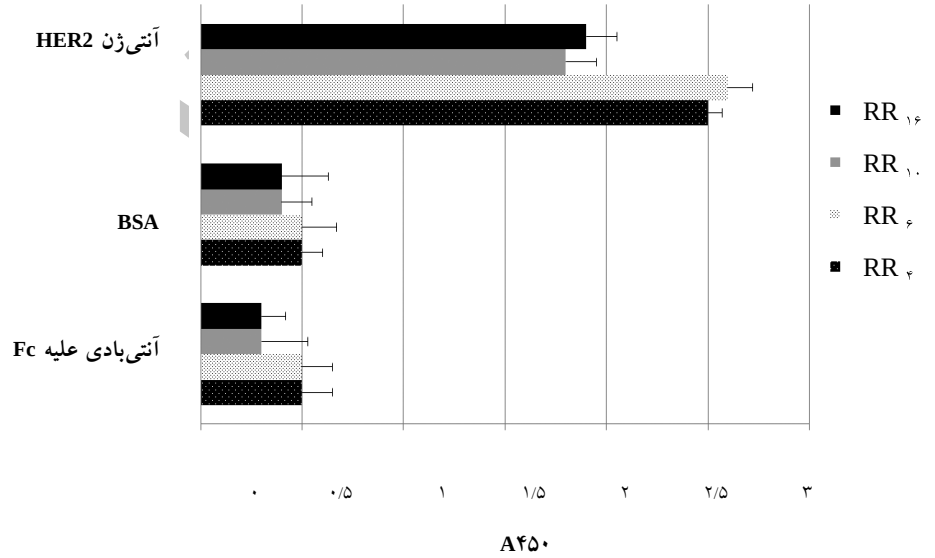
بـا انجـام روش‌هـای SDS-PAGE و وسـترن بـلات، آنتی‌بادی‌های تک دومینی شـتری بـا وزن ۱۷ کیلـو دالتـون مورد تایید قرار گرفتند.

بر اساس روش Beatty ، افینیتی آنتی‌بـادی‌هـای $RR_{۴}$ و $RR_{۶}$ به آنتـی ژن HER2 ، $M^{-۱}$ $۱۰^{۱۲}$ × ۵/۴ و $M^{-۱}$ $۱۰^{۱۲}$ × ۷/۵ و افینیتی آنتی‌بـادی‌هـای $RR_{۱۰}$ و $RR_{۱۶}$ بـه آنتـی‌ژن HER2، $M^{-۱}$ $۱۰^{۱۰}$ × ۰/۲ و $M^{-۱}$ $۱۰^{۱۰}$ × ۰/۶ بـه دسـت آمد. آنتـی‌بـادی‌هـای شـتری بـا افینیتـی بـالا $RR_{۴}$ و $RR_{۶}$ ، توانایی بیشتری در شناسایی آنتی‌ژن محلول از خـود نشـان دادند به طوری که در غلظت ۲ میکروگرم در میلـی‌لیتـر از آنتی‌ژن محلول تقریباً ۱۰۰٪ مهـار صـورت گرفتـه و هـیچ اتصالی بین آنتی‌بادی مورد نظر و آنتـی‌ژن HER2 در کـف چاهک مشاهده نشد.

آنتی‌بـادی‌هـای $RR_{۱۰}$ و $RR_{۱۶}$ بـا افینیتـی متوسـط هـم توانایی شناسـایی آنتـی‌ژن HER2 محلـول را نشـان دادنـد. ضـمن ایـن کـه در حضـور آنتـی‌ژن MUC1 محلـول، آنتی‌بادی‌هـای مـورد آزمایـش حداکثر اتصال را به آنتی‌ژن HER2 در کف چاهک را داشتند(نمودار ۲).

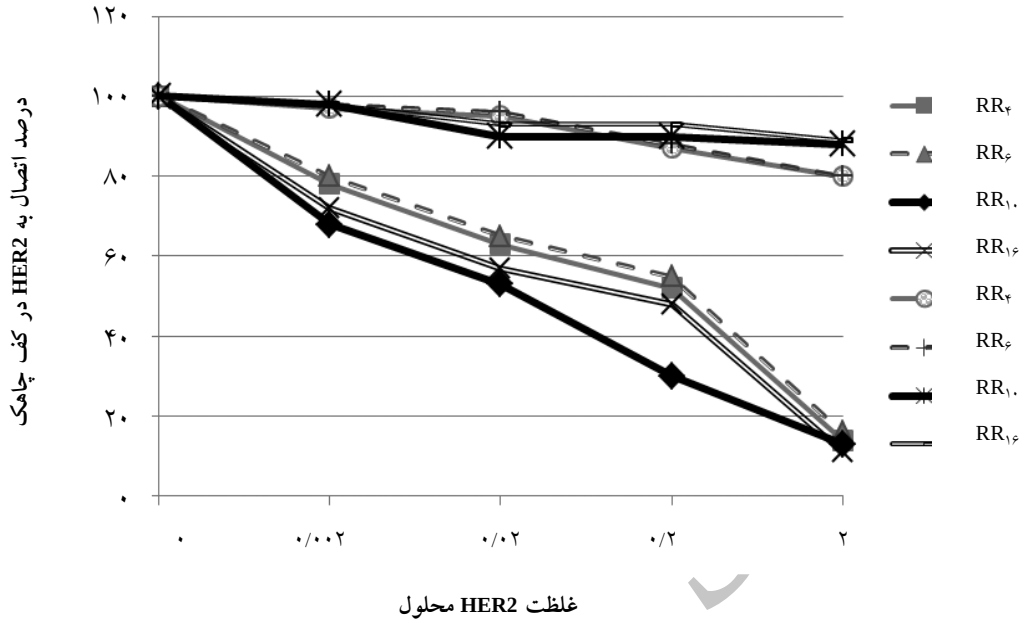


شکل ۲: نتایج الکتروفورز حاصل از کلونی– PCR آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری. به ترتیب از راست به چپ: مارکر(M)، $RR_{۴}$ (۱)، $RR_{۶}$ (۲)، $RR_{۱۰}$ (۳) و $RR_{۱۶}$ (۴) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای نواحی FR یک و چهار و ایجاد قطعات ۴۰۰–۳۸۰ جفت بازی.

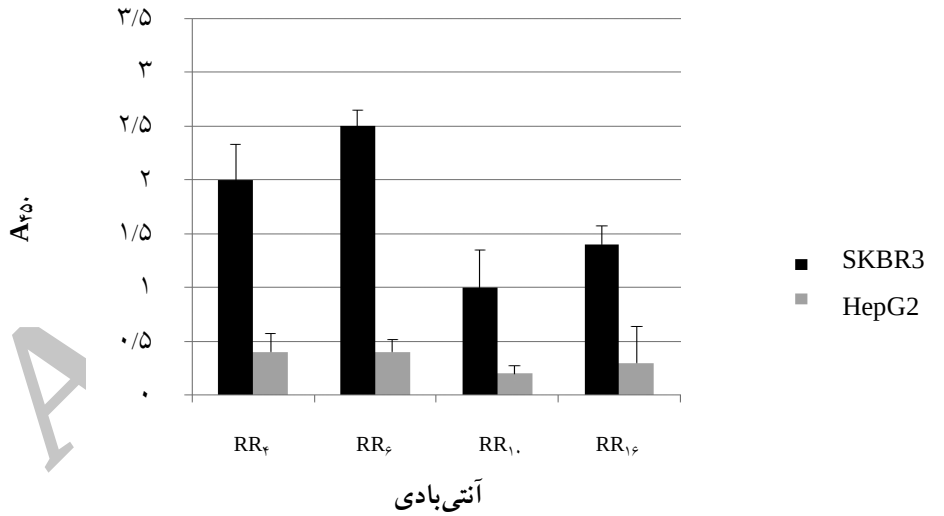


نمودار ۱: نتایج الایزا چهار آنتی‌بادی تک دومینی شتری بر روی آنتی‌ژن نوترکیب HER2 و کنترل منفی(BSA و آنتی‌بادی بزی علیه ناحیه Fc انسانی). بر اساس آزمون آماری Mann–Whitney ، تفاوت معناداری در اتصال آنتی‌بادی‌ها به آنتی‌ژن HER2 در مقایسه با کنترل منفی وجود دارد(MEAN ± SD ، p<۰/۰۵).

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۲: میزان اتصال آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به آنتی‌ژن HER2 در کف چاهک و آنتی‌ژن HER2 محلول و MUCI محلول(MEAN ± SD ، p< ۰/۰۵)



نمودار ۳: نتایج حاصل از اتصال آنتی بادی‌های تک دومینی شتری به آنتی‌ژن HER2 بر روی سلول $HER2^+$ (SKBR3) و سلول $HER2^-$ (HepG2). بر اساس آزمون آماری من‌ویتنی، تفاوت معناداری در اتصال آنتی‌بادی‌ها به سلول مثبت(SKBR3) در مقایسه با سلول کنترل (HepG2) وجود دارد(MEAN ± SD ، p <۰/۰۵).

در اتصال به سلول‌های سرطانی، آنتی‌بادی‌های RR_4 و RR_6 بالاترین میزان اتصال به سلول SKBR3 را نشان دادند اما به سلول‌های منفی هم متصل شدند. اگر چه آنتی‌بادی‌های RR_{10} و RR_{16} در اتصال به SKBR3 ، میزان OD کمتری نسبت به آنتی‌بادی‌های RR_4 و RR_6 نشان دادند اما هیچ اتصالی با سلول‌های منفی نداشتند (نمودار ۳).

بحث

آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری، کوچکترین قطعه آنتی‌بادی متصل شونده به آنتی‌ژن هستند که از آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین فاقد زنجیره سبک شتری

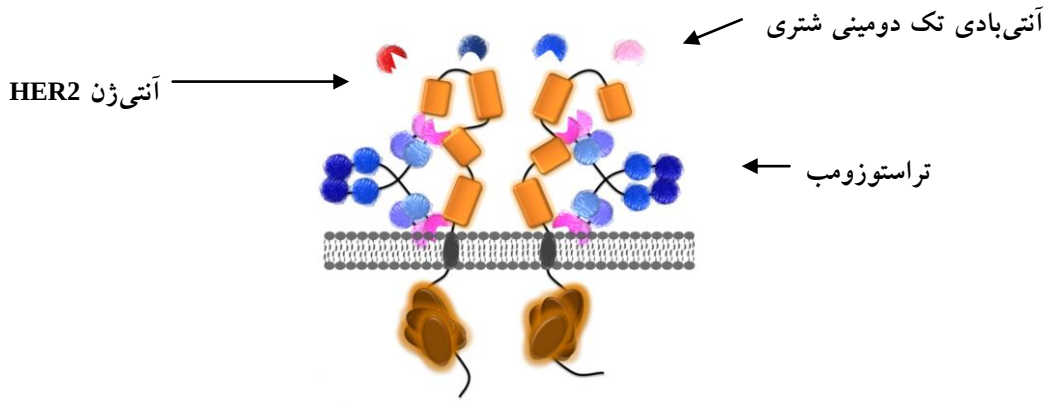
www.SID.ir

مشتق می‌گردند(شکل ۲). قطعه کامل آن‌ها به طور تقریبی ۲/۵ نانومتر قطر و ۴ نانومتر طول و وزنی در حدود ۱۵-۱۲ کیلو دالتون دارد(۱۰). خصوصیات منحصر به فرد آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری منجر به برتری آن‌ها نسبت به آنتی‌بادی‌های درمانی متداول از جمله: توانایی شناسایی اپی‌توپ‌های مخفی و نامعمول، توانایی اتصال به حفرات یا جایگاه فعال پروتئین‌ها، انعطاف‌پذیری مناسب برای تبدیل به اشکال دارویی، ایمنی‌زایی بسیار ضعیف و نهایتاً آسانی تولید شده است. خصوصیات بیوفیزیکی و دارویی مناسب آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به همراه قابلیت تبدیل آن‌ها به پروتئین‌های درمانی چند کاره، باعث گردیده است تا از آن‌ها به عنوان نسل جدیدی در درمان بر پایه آنتی‌بادی یاد شود(۲۰، ۱۹، ۹). در همین راستا، در این مطالعه آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری اختصاصی آنتی‌ژن HER2 از کتابخانه فاژی جداسازی و تعیین خصوصیت گردید(۲۳-۲۱).

طی دو مطالعه در کشورهای ایران و بلژیک، آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری متفاوتی علیه آنتی‌ژن HER2 به دست آمد(۲۵، ۲۴). آنتی‌ژن HER2 دارای ناحیه خارج سلولی بزرگ(۶۳۰ اسید آمینه) و متعاقباً اپی‌توپ‌های متنوعی می‌باشد. به طوری که می‌توان تعداد زیادی آنتی‌بادی با خصوصیات متنوع علیه قسمت‌های مختلف آنتی‌ژن HER2 به دست آورد. به همین منظور، پنلی از آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری دارای افینیتی و اختصاصیت بالا به آنتی‌ژن HER2 با توالی‌های متفاوت و منحصر به فرد از سایر آنتی‌بادی‌های تک دومین شتری گزارش شده علیه HER2 توسط گروه تحقیقاتی ما به دست آمد. از جمله آزمایش‌های مهم قبل از شروع درمان سرطان سینه با تراستوزومب، بررسی میزان پاسخدهی بیمار به درمان با این آنتی‌بادی می‌باشد(۱۴).

تراستوزومب از طریق اتصال به دومین نزدیک غشایی HER2 ، باعث از بین بردن سلول‌های سرطانی می‌شود(۲۶). در این راستا سلول‌های سرطانی برای رهایی از این آنتی‌بادی، شروع به ریزش قسمت خارج سلولی مولکول HER2 (HER2 محلول) می‌کنند و نوع مهاجم‌تری از سلول‌های سرطانی مقاوم به تراستوزومب، ایجاد می‌کنند(۱۳). به همین دلیل قبل از درمان پرهزینه با تراستوزومب باید میزان HER2 محلول مورد بررسی قرار گیرد(شکل ۳).

آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به دست آمده در این مطالعه به علت افینیتی بالا، توانایی شناسایی آنتی ژن HER2 محلول در سرم بیماران با سرطان سینه را نیز دارا می‌باشند(وجود آنتی‌ژن محلول در اثر ریزش ناحیه خارج سلولی HER2 از سطح سلول‌های سرطانی سینه، نشانه عدم پاسخگویی به آنتی‌بادی تراستوزومب خواهد بود). از این رو پیشنهاد می‌شود مطالعه‌های بیشتری جهت استفاده از آنتی‌بادی‌های شتری به دست آمده در کیت‌های تشخیصی نظیر الایزا برای اندازه‌گیری HER2 محلول(به عنوان مارکر تشخیصی و پیش‌آگهی در طول دوره درمانی)، صورت گیرد(۱۹).



شکل ۳: نمای شماتیکی از آنتی‌ژن HER2 ، آنتی بادی تراستوزومب و آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری

Archive of SID
www.SID.ir

نتیجه‌گیری

در انتها، اتصال آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به آنتی‌ژن HER2 ، مانع از تشکیل دایمرهای HER2 با سایر مولکول‌های HER2 یا سایر اجزای خانواده HER (HER1 ، HER3 و HER4) و هم چنین مانع از ریزش قسمت خارج سلولی HER2 می‌شود. تولید آسان آنتی‌بادی‌های تک دومینی و قدرت هدف‌گیری بالای آن‌ها، موجب می‌گردد تا مقادیر کمتری از آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری برای تزریق مورد استفاده قرار گیرد و متعاقباً عوارض جانبی کمتر و هزینه پایین‌تری را به دنبال داشته باشد. آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به دست آمده در این مطالعه در دو زمینه کاربرد دارند: ۱- استفاده در ناحیه خارج سلولی گیرنده سلول T جهت تولید سلول‌های مهندسی شده با قدرت شناسایی و کشندگی بالا علیه سلول‌های سرطانی سینه. ۲- استفاده از آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری علیه آنتی‌ژن HER2 در شناسایی آنتی‌ژن محلول موجود در سرم بیماران با سرطان سینه برای آگاهی از شروع درمان با تراستوزومب و ارزیابی روند درمان.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح مصوب تحت عنوان «سلول درمانی سرطان سینه توسط سلول‌های T لنفوسیت واجد گیرنده‌های کایمریک اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های HER2 ، TAG72 و MUC1» به شماره ثبت TMU-۸۸-۸-۶۷ می‌باشد که با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران و دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

References :

1- Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. Nat Rev Cancer 2012; 12(8): 553-63.
2- Emde A, Emde A, Köstler WJ, Yarden Y; Association of Radiotherapy and Oncology of the Mediterranean arEa (AROME). Therapeutic strategies and mechanisms of tumorigenesis of HER2-overexpressing breast cancer. Crit Rev Oncol Hematol 2012; 84 Suppl 1: e49-57.
3- Moasser MM. Targeting the function of the HER2 oncogene in human cancer therapeutics. Oncogene 2007; 26(46): 6577-92.
4- Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW Jr, *et al*. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. Nature 2003; 421(6924): 756-60.
5- Wolf-Yadlin A, Kumar N, Zhang Y, Hautaniemi S, Zaman M, Kim HD, *et al*. Effects of HER2 overexpression on cell signaling networks governing proliferation and migration. Mol Syst Biol 2006; 2: 54.
6- Baker M. Upping the ante on antibodies. Nat Biotechnol 2005; 23(9): 1065-72.
7- Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy--revisited. Nat Rev Drug Discov 2011; 10(8): 591-600.
8- Kolkman JA, Law DA. Nanobodies – from llamas to therapeutic proteins. Drug Discovery Today Technol 2010; 7(2): 139-46.
9- Rahbarizadeh F, Rahimi jamnani F, Iri-Sofla FJ. Nanobody, New Agent for Combating Against Breast Cancer Cells. In: Gunduz E, Gunduz M. Breast Cancer - Current and Alternative Therapeutic Modalities. Rijeka: InTech; 2011. p. 347-70.
10- Rahimi Jamnani F, Rahbarizadeh F, Shokrgozar MA. Nanobodies: Promising Nanodevices for Immunotherapy. Nanotechnology 2011; 160 (11): 36-41. [Article in Farsi]
11- Behdani M, Zeinali S, Khanahmad H, Karimipour M, Asadzadeh N, Azadmanesh K, *et al*. Generation and characterization of a functional Nanobody against the vascular endothelial growth factor receptor-2; angiogenesis cell receptor. Mol Immunol 2012; 50(1-2): 35-41.
12- Ahmadvand D, Rasaee MJ, Rahbarizadeh F, Kontermann RE, Sheikholislami F. Cell selection and characterization of a novel human endothelial cell-specific nanobody. Mol Immunol 2009; 46(8-9): 1814-23.
13- Tse C, Gauchez AS, Jacot W, Lamy PJ. HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: biology and clinical utility in breast cancer. Cancer Treat Rev 2012; 38(2): 133-42.
14- Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. Cancer Res 2001; 61(12): 4744-9.
15- Wang J, Willumsen N, Zheng Q, Xue Y, Karsdal MA, Bay-Jensen AC. Bringing cancer serological diagnosis to a new level: focusing on HER2, protein ectodomain shedding and neoepitope technology. Future Oncol 2013; 9(1): 35-44.
16- Rahbarizadeh F, Rasaee MJ, Forouzandeh M, Allameh A, Sarrami R, Nasiry H, *et al*. The production and characterization of novel heavy-chain antibodies against the tandem repeat region of MUC1 mucin. Immunol Invest 2005; 34(4): 431-52.
17- Ahmadvand D, Rasaee MJ, Rahbarizadeh F, Mohammadi M. Production and characterization of a high-affinity nanobody against human endoglin. Hybridoma (Larchmt) 2008; 27(5): 353-60.
18- Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive

Archive of SID
www.SID.ir

enzyme immunoassay. J Immunol Methods 1987; 100(1): 173-9.
19- Jamnani FR, Rahbarizadeh F, Shokrgozar MA, Ahmadvand D, Mahboudi F, Sharifzadeh Z. Targeting high affinity and epitope-distinct oligoclonal nanobodies to HER2 over-expressing tumor cells. Exp Cell Res 2012; 318(10): 1112-24.
20- Jamnani FR, Rahbarizadeh F, Shokrgozar MA, Mahboudi F, Ahmadvand D, Sharifzadeh Z, *et al*. T cells expressing VHH-directed oligoclonal chimeric HER2 antigen receptors: Towards tumor-directed oligoclonal T cell therapy. Biochim Biophys Acta 2014; 1840(1): 378-86.
21- Rahbarizadeh F, Rasaee MJ, Forouzandeh Moghadam M, Allameh AA, Sadroddiny E. Production of novel recombinant single-domain antibodies against tandem repeat region of MUC1 mucin. Hybrid Hybridomics 2004; 23(3): 151-9.
22- Haurum JS. Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics? Drug Discov Today 2006; 11(13-14): 655-60.
23- Ben-Kasus T, Schechter B, Lavi S, Yarden Y, Sela M. Persistent elimination of ErbB-2/HER2-overexpressing tumors using combinations of monoclonal antibodies: relevance of receptor endocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(9): 3294-9.
24- Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, Vincke C, Xavier C, Wernery U, *et al*. Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. FASEB J 2011; 25(7): 2433-46.
25- Sheikholeslami F, Rasaee MJ, Shokrgozar MA, Dizaji MM, Rahbarizadeh F, Ahmadvande D. Isolation of a Novel Nanobody Against HER-2/neu Using Phage Displays Technology. Lab Medicine 2010; 41(2): 69-76.
26- Zagozdzon R, Gallagher WM, Crown J. Truncated HER2: implications for HER2-targeted therapeutics. Drug Discov Today 2011; 16(17-18): 810-6.

Archive of SID

www.SID.ir

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2014; 11(2): 126-136

Original Article

Enrichment of phage display library against breast cancer cells for isolation of anti-HER2 camelid single domain antibodies

Rahimi Jamnani F.[1], Rahbarizadeh F.[2], Shokrgozar M.A.[3], Ahmadvand D.[4], Mahboudi F.[1]

[1]Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[2]Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3]National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[4]School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Breast cancer cells can be hidden from immune cells by shedding tumor markers such as HER2. The increased soluble HER2 (sHER2) concentrations are associated with the outcome of HER2-positive breast cancer and sensitivity to trastuzumab treatment. To this end, camelid single domain antibodies (VHH) with unique properties and binding ability are very striking targeting agents to detect sHER2.

Materials and Methods

By panning on HER2 negative and positive cells, an immune camel library was enriched against HER2 antigen. Affinity and specificity of four selected VHHs to HER2, detection of sHER2 and binding of selected VHHs to HER2 on breast cancer cells were investigated by ELISA.

Results

After cell panning and ELISA, four VHHs that recognized HER2 antigen better than negative control were identified. High affinity HER2 specific VHHs (1012-1013 M-1) were able to detect sHER2 (2 µg/ml). When the mixture of VHH and sMUC1 was added to HER2 coated-well, the VHH bound to HER2. RR_4 and RR_6 VHHs showed the highest binding to SKBR3 (HER2 expressing cell) (2±0.33 and 2.5±0.15, respectively) compared to HER2 negative cell (0.38 ± 0.17 and 0.4±0.12, respectively).

Conclusions

The HER2 status of a primary tumor and responses to treatment can be evaluated by measuring sHER2 as a biomarker by HER2 specific VHHs.

Key words: Genes، HER-2, Breast Cancer

Received: 20 May 2013
Accepted: 9 Dec 2013

Correspondence: Rahberizadeh F., PhD of Medical Biochemistry. Associate Professor of Medical Biotecnology. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O. Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82883884 ; Fax: (+9821) 88013030
E-mail: *Rahbarif@modares.ac.ir*

Archive of SID
www.SID.ir