



Design, Expression, Purification, and Evaluation of Anti-HER2 scFv

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Heydari M.¹ MSc,
Aliabadi Farahani Z.² MSc,
Bayat E.³ MSc,
Damough Sh.⁴ MSc,
Sabzalinezhad M.³ MSc,
Talebkhan Garoosi Y.^{*3} PhD

How to cite this article

Heydari M, Aliabadi Farahani Z, Bayat E, Damough Sh, Sabzalinezhad M, Talebkhan Garoosi Y. Design, Expression, Purification, and Evaluation of Anti-HER2 scFv. *Pat-hobiology Research*. 2020;23(1):49-56.

¹Biochemistry Department, Advanced Sciences and Technology Faculty, Medical Sciences Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Biology Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

⁴Biotechnology Department, Advanced Sciences and Technology Faculty, Medical Sciences Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, No. 69, Pasteur Avenue, Tehran, Iran. Post Code: 1316943551.
Phone: +98 (21) 66480780
Fax: +98 (21) 66480780
talebkhan@pasteur.ac.ir

Article History

Received: May 19, 2020
Accepted: June 11, 2020
ePublished: June 22, 2020

ABSTRACT

Aims The aim of the present study was to design and express an anti-HER2 single chain variable antibody fragment in *E. coli* BL21 (DE3) and evaluate its efficiency in recognition of HER2 protein.

Materials & Methods An approximately 746bp encoding gene fragment was cloned into pET28a and the recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) strain. Following protein purification by affinity chromatography, western blotting and ELISA were used to evaluate the efficiency of anti-HER2 scFv against HER2 protein.

Findings *E. coli* can express the anti-HER2 scFv molecule possessing appropriate function and can detect this protein on the surface of breast cancer cells.

Conclusion This antibody fragment can be used in laboratory diagnostic methods for HER2 diagnostic approaches. Potential capability of this protein in immunohistochemical and imaging approaches against HER2 should be considered.

Keywords Single Chain Antibody Fragment; HER2 Protein; Cell-Based ELISA

CITATION LINKS

[1] Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab [2] Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics [3] Functional expression of a single-chain antibody to ErbB-2 in plants and cell-free systems [4] Highly efficient production of anti-HER2 scFv antibody variant for targeting breast cancer cells [5] Construction and Expression of Synthetic-gene encoding anti-HER2 scFv Fused with pelB in Escherichia coli BL21 (DE3) [6] Enhanced solubility of anti-HER2 scFv using bacterial Pelb leader sequence [7] The improvement of anti-HER2 scFv soluble expression in Escherichia coli [8] The use of single chain Fv as targeting agents for immunoliposomes: An update on immunoliposomal drugs for cancer treatment [9] Internalizing ErbB2 antibodies. WIPO (PCT) patent WO1999055367A1 [10] Anti-HER2 antibodies and compositions [11] Delay in breast cancer care: A study in Thai women [12] Treatment of HER2-positive breast cancer: Current status and future perspectives [13] HESA-A: New treatment for breast cancer and choroidal metastasis [14] HER2 breast cancer therapies: A review [15] The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery [16] Functional expression of a single-chain antibody fragment against human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in Escherichia coli [17] Optimized condition for enhanced soluble-expression of recombinant mutant *anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase [18] Cytoplasmic expression, optimization and catalytic activity evaluation of recombinant mature lysostaphin as an anti-staphylococcal therapeutic in escherichia coli [19] High expression of fusion proteins consisting of a single-chain variable fragment antibody against a tumor-associated antigen and interleukin-2 in Escherichia coli [20] Improved expression of a soluble single chain antibody fusion protein containing tumor necrosis factor in Escherichia coli [21] Trastuzumab-cisplatin conjugates for targeted delivery of cisplatin to HER2-overexpressing cancer cells

طراحی، بیان، تخلیص و ارزیابی عملکرد قطعه آنتی‌بادی تک زنجیره علیه پروتئین HER2

مزده حیدری MSc

گروه بیوشیمی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران

زهرا علی‌آبادی فراهانی MSc

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

الهام بیات MSc

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

شادی داموغ MSc

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران

معصومه سبزی‌نژاد MSc

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

یگانه طالب‌خان گروسی* PhD

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: هدف مطالعه حاضر، طراحی و بیان قطعه آنتی‌بادی تک زنجیره علیه پروتئین HER2 در سلول *E. coli* BL21 (DE3) و بررسی توانایی آن در شناسایی پروتئین HER2 بود.

مواد و روش‌ها: ژن کدکننده این قطعه آنتی‌بادی به طول تقریبی ۷۴۶ جفت باز در وکتور بیانی pET28a کلون و پروتئین نوترکیب در سویه *E. coli* BL21 DE3 بیان شد. به دنبال تخلیص قطعه آنتی‌بادی به روش کروماتوگرافی تمایلی، از روش‌های وسترن بلاتینگ و الیزا برای بررسی واکنش آنتی‌بادی scFv علیه پروتئین HER2 استفاده شد.

یافته‌ها: *E. coli* قادر به بیان قطعه آنتی‌بادی scFv با عملکرد مناسب علیه HER2 است، به طوری که می‌تواند این پروتئین را در سطح سلول‌های سرطان پستان نیز شناسایی کند.

نتیجه‌گیری: می‌توان از این پروتئین در روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی برای تشخیص اختصاصی پروتئین HER2 استفاده کرد. قابلیت این پروتئین در تشخیص HER2 با استفاده از روش‌های ایمونوهیستوشیمی و یا روش‌های تصویربرداری بایستی مورد بررسی قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: قطعه آنتی‌بادی تک زنجیره، پروتئین HER2، الیزای سلولی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۲

*نویسنده مسئول: talebkh@pasteur.ac.ir

مقدمه

گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲ (HER2) به‌عنوان یک مارکر پیش‌آگهی و تشخیصی در سرطان پستان در نظر گرفته می‌شود^[1]، چراکه در تنظیم فعالیت‌های سلولی همچون رشد، تمایز و آپوپتوز نقش دارد. این پروتئین یک گلیکوپروتئین تراغشایی است که از سه ناحیه مشخص تشکیل شده است. ناحیه خارج سلولی آن چندین دومین دارد و وزن مولکولی آن حدود ۱۰۰ کیلودالتون است. به دلیل اهمیت این پروتئین در سرطان‌هایی همچون سرطان پستان، تاکنون چندین آنتی‌بادی مونوکلونال علیه این پروتئین به تایید سازمان غذا و داروی ایالات متحده رسیده است که از جمله

آنها می‌توان به تراستوزومب با نام تجاری هرسپتین و پرتوزومب اشاره کرد. تراستوزومب علیه دومین چهارم بخش خارج سلولی پروتئین HER2 است و به این ترتیب مانع از فعالیت تیروزین کینازی آن می‌شود^[1]. در مقابل، پرتوزومب به دومین دوم این ساختار خارج سلولی متصل می‌شود.

در سال‌های اخیر، قطعات آنتی‌بادی از جمله آنتی‌بادی‌های تک زنجیره (scFv) به‌منظور درمان و تشخیص هدفمند بیماری‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. می‌توان این مولکول‌ها را به طیف وسیعی از عوامل از جمله داروها، مواد رادیواکتیو و یا مواد سمی متصل کرد^[2]. این مولکول‌ها به دلیل اندازه کوچک قابل استفاده در موارد تشخیصی و عکس‌برداری هستند، چراکه نسبت به آنتی‌بادی کامل قابلیت نفوذ بیشتری به داخل بافت خواهند داشت. از کاربردهای scFv علیه پروتئین HER2 می‌توان به دارورسانی هدفمند به سلول‌های سرطانی HER2 مثبت اشاره کرد. طی سالیان گذشته قطعات آنتی‌بادی با ساختارهای مختلف و در میزبان‌های بیانی متفاوت علیه پروتئین HER2 طراحی و تولید شده‌اند^[3-7] که تعدادی از آنها از تراستوزومب و برخی از پرتوزومب منشا گرفته‌اند.

هدف از انجام مطالعه حاضر، طراحی و بیان قطعه آنتی‌بادی scFv مشتق از تراستوزومب به‌منظور بررسی توانایی آن در اتصال به پروتئین HER2 بود که در صورت موفقیت‌آمیز بودن نتایج، می‌تواند در روش‌های تشخیصی از جمله تکنیک‌های تصویربرداری و نیز روش‌های تشخیصی آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

طراحی سازه بیانی

توالی آمینواسیدی scFv علیه آنتی‌ژن HER2 (به طول تقریبی ۲۵۰ آمینواسید) از توالی آنتی‌بادی مونوکلونال تراستوزومب از بانک اطلاعات دارویی به شماره DB00072 استخراج شد. پس از تبدیل توالی آمینواسیدی به توالی نوکلئوتیدی و بهینه‌سازی کدون‌ها برای بیان در سلول *E. coli* با استفاده از نرم‌افزار GenSmart™ Codon optimization از شرکت GenScript و انتخاب فراوان‌ترین کدون‌ها، سازه ژنی توسط شرکت ندای فن ساخته و در جایگاه‌های آنزیمی *NcoI* و *XhoI* درون وکتور بیانی pET28a (Novagen؛ ایران) که دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی کانامایسین است تحویل شد. در انتهای کربوکسیلی این ژن، دنباله هیستیدینی قرار داده شد تا برای تست‌های تاییدی و نیز تخلیص پروتئین مورد استفاده قرار بگیرد. وکتور نوترکیب به‌منظور تکثیر با روش شیمیایی و با استفاده از کلریدکلسیم (۱/۰ مولار) به باکتری *E. coli* TOP10F' انتقال یافت و با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید، استخراج پلاسمید صورت گرفت. به‌منظور تایید صحت پلاسمید نوترکیب (از نظر دارابودن ژن مورد نظر) با آنزیم‌های *NcoI*، *XhoI* و *XbaI* مورد برش قرار گرفت و صحت نهایی توالی کلون‌شده با روش تعیین توالی بررسی شد.

دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. در ادامه به منظور جداسازی پروتئین نوترکیب از سایر پروتئین‌های سلولی براساس وجود شش آمینواسید هیستیدین موجود در انتهای کربوکسیلی، از روش کروماتوگرافی تمایلی نیکل استفاده شد. پس از شست‌وشوی رزین با بافر لیزکننده، نمونه پروتئینی از ستون عبور داده شد. شست‌وشوی رزین با استفاده از بافر شست‌وشو (بافر لیزکننده حاوی ۴۰ میلی‌مولار ایمیدازول) برای جداسازی ناخالصی‌های پروتئینی از رزین انجام شد. در نهایت بعد از حذف ناخالصی‌ها، پروتئین نوترکیب حاوی دنباله هیستیدینی با افزودن بافر شویش (بافر لیزکننده حاوی ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول) از ستون جدا شد. طی این مراحل، نمونه‌های مختلف جمع‌آوری شده تحت عناوین نمونه خروجی از ستون (Flow Through)، شست‌وشو و نمونه تخلیص‌شده روی ژل SDS-PAGE ۱۵٪ بررسی شدند. در مرحله بعد، به منظور حذف ایمیدازول موجود در نمونه‌های پروتئینی تخلیص‌شده، از روش دیالیز استفاده شد.

بررسی فعالیت scFv نوترکیب علیه پروتئین HER2 با روش وسترن بلات

دامین خارج سلولی پروتئین HER2 (Emp Genentech؛ آلمان) با وزن تقریبی ۱۰۰ کیلودالتون با غلظت ۱/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰٪ الکتروفورز و در سیستم semi-dry با ولتاژ ۱۸ ولت به مدت ۳۰ دقیقه به غشای نیتروسولوزی منتقل شد. پس از بلوک‌کردن غشای نیتروسولوزی با BSA (۵٪) به مدت ۲ ساعت در دمای محیط، آنتی‌بادی اولیه (پروتئین نوترکیب scFv تخلیص‌شده) با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به کاغذ اضافه شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴°C قرار گرفت. بعد از شست‌وشوی کاغذ نیتروسولوزی (۵ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه) با محلول PBS حاوی ۰/۵٪ توئین ۲۰، آنتی‌بادی دوم (آنتی‌بادی موشی علیه دنباله هیستیدینی متصل به HRP) با رقت ۱ به ۲۵۰ به کاغذ اضافه شد. بعد از گذشت ۲ ساعت در دمای محیط، کاغذ نیتروسولوزی با محلول شست‌وشو ۵ بار شسته شد و در نهایت یک بار با PBS مورد شست‌وشو قرار گرفت و سپس محلول DAB آماده‌شده به کاغذ اضافه شد. در این تست تاییدی از آنتی‌بادی مونوکلونال تراستوزومب با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان آنتی‌بادی کنترل مثبت و آنتی‌بادی خرگوشی علیه IgG انسانی متصل به HRP با رقت ۱ به ۱۵۰۰ به‌عنوان آنتی‌بادی ثانویه مخصوص تراستوزومب استفاده شد.

بررسی فعالیت scFv نوترکیب علیه پروتئین HER2 با روش الیزا

اولین مرحله انجام این تست، تهیه غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دامین خارج سلولی پروتئین HER2 در بافر PBS و سپس افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول آنتی‌ژنی به ته چاهک‌های پلیت الیزای ۹۶ خانه‌ای و قراردادن پلیت در دمای ۴°C به مدت ۱۶ ساعت بود. سپس چاهک‌ها با ۳۰۰ میکرولیتر بافر

بیان پروتئین نوترکیب scFv

پس از انتقال وکتور بیانی به سویه بیانی (*E. coli* BL21 (DE3)، بیان پروتئین نوترکیب scFv در دمای ۳۷°C، با استفاده از غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG و گرماگذاری به مدت ۴ ساعت پس از القا در حجم ۵ میلی‌لیتر انجام شد. پس از سانتریفیوژ محیط کشت‌ها، نمونه‌های رسوب باکتری قبل و بعد از القا برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب بر روی SDS-PAGE ۱۲٪ منتقل شدند. نمونه‌های لیز سلولی با استفاده از دستگاه نیمه‌خشک (Semi-dry) به روی کاغذ نیتروسولوز انتقال داده شدند. پس از بلوک‌کردن کاغذ نیتروسولوز با بافر PBS حاوی ۳٪ شیرخشک به مدت ۱ ساعت و ۳ بار شست‌وشوی کاغذ با بافر PBS حاوی توئین ۲۰ (۰/۵٪)، آنتی‌بادی علیه دنباله هیستیدینی متصل به آنزیم پراکسیداز با رقت ۱ به ۱۰۰۰ در بافر PBS به کاغذ نیتروسولوز اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار داده شد. پس از شست‌وشوی مجدد کاغذ با بافر شست‌وشو، برای تشخیص باندهای پروتئینی از محلول DAB استفاده شد.

بهینه‌سازی شرایط بیان پروتئین نوترکیب scFv

به منظور بهینه‌سازی بیان، دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷°C و مدت زمان گرماگذاری بعد از القا ۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت و غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار از IPTG در نظر گرفته شدند. در مرحله اول، غلظت‌های مختلف IPTG در ساعات‌های متفاوت در دمای ۳۷°C مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله بعدی با استفاده از غلظت IPTG به‌دست‌آمده، دماهای متفاوت (۲۵، ۳۰ و ۳۷°C) و مدت زمان گرماگذاری بعد از القای متفاوت (۲، ۴، ۶ و ۲۴ ساعت) بررسی شد. به منظور بررسی میزان بیان در این شرایط، کشت سلول با شرایط یکسان از نظر تعداد سلول آغاز و در انتها رسوب سلولی روی ژل SDS-PAGE برده شد و شدت باندهای به‌دست‌آمده با روش دانسیتومتری با استفاده از نرم‌افزار Image J 1.46r مورد آنالیز قرار گرفت.

تخلیص پروتئین scFv نوترکیب به روش کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA

پس از تایید بیان پروتئین نوترکیب، بیان پروتئین scFv تحت شرایط بهینه به‌دست‌آمده از مرحله قبل در دمای ۳۷°C و مدت زمان ۲۴ ساعت پس از القا، در حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر صورت گرفت. به‌طور خلاصه، پس از رسیدن کدورت محیط کشت‌ها به حدود ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، IPTG با غلظت نهایی ۰/۷۵ میلی‌مولار تحت شرایط کاملاً استریل، به ارلن‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان القا، محیط کشت سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد و رسوب باکتریایی به‌منظور تخریب دیواره باکتریایی در بافر لیزکننده (۵۰ میلی‌مولار مونوسدیم فسفات، ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول و pH برابر ۸) ورتکس شد. این سوسپانسیون سلولی با دستگاه سونیکاتور با استفاده از امواج اولتراسونیک به تعداد ۱۲ تا ۱۵ مرتبه با شرایط ۲۰ ثانیه پالس و ۲۰ ثانیه استراحت لیز شدند و پس از آن نمونه‌ها با سرعت ۶۰۰۰ دور بر

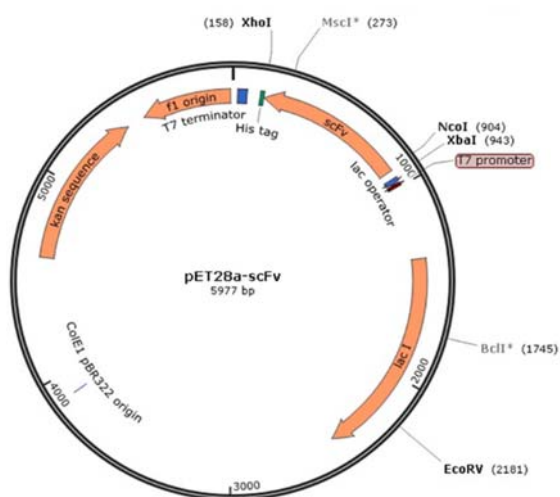
میلی‌لیتر تهیه و به‌صورت رقت سریالی مشابه با روش ذکرشده در قسمت قبلی، به چاهک‌ها اضافه شد و در دمای ۴°C به مدت ۱۶ ساعت قرار گرفت. پس از شست‌وشوی چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر PBS (۵ بار و هر بار به مدت یک دقیقه) آنتی‌بادی ثانویه موشی علیه دنباله هیستیدینی متصل به HRP با نسبت ۱:۵۰۰ به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. پس از شست‌وشوی چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر PBS (۵ بار و هر بار به مدت یک دقیقه)، TMB به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی قرار گرفت. واکنش آنزیم پراکسیداز با اضافه کردن اسیدسولفوریک متوقف شد و میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه خوانشگر الیزا خوانده شد. در این بررسی از آنتی‌بادی تراستوزومب (به‌عنوان کنترل مثبت) با همان رقت سریالی (۳۰ تا ۴۶/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد و آنتی‌بادی ثانویه آن، آنتی‌بادی خرگوشی علیه IgG انسانی متصل به HRP با رقت ۱:۱۵۰۰ بود.

بررسی آماری

نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 رسم شدند و از تست ANOVA برای مقایسه‌های بین گروهی استفاده شد.

یافته‌ها

در میان دو ناحیه متغیر V_H و V_L، لینکری پپتیدی متشکل از سه تکرار از توالی Gly4Ser (در مجموع ۱۵ اسیدآمین) در نظر گرفته شد. اندازه و کتور نوترکیب حاصل (pET28a-scFv) برابر با ۵۹۷۷ جفت باز گزارش شد. هضم آنزیمی و کتور نوترکیب با آنزیم‌های محدودالتر صحت کلونینگ انجام‌شده را تایید کرد (شکل ۱).



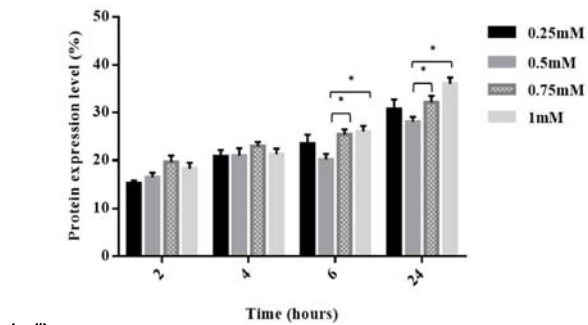
شکل ۱) طرح شماتیک از وکتور بیانی طراحی‌شده

پس از تایید وکتور نوترکیب، بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از IPTG در سویه بیانی BL21 DE3 انجام شد و لیز باکتری‌های

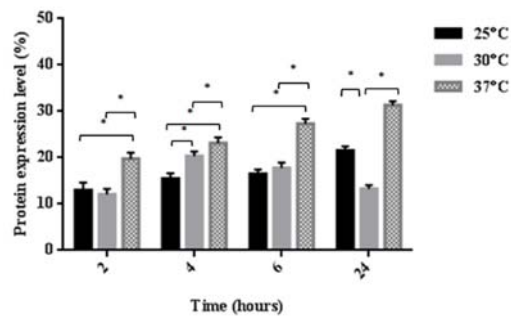
شست‌وشو (PBS حاوی ۰/۵% توفین ۲۰)، ۳ بار و هر بار به مدت یک دقیقه شسته شدند. بافر بلوکه‌کننده (PBS حاوی ۵% BSA) به هر چاهک اضافه و گرماگذاری چاهک‌ها در دمای آزمایشگاه به مدت ۲ ساعت انجام شد. آنتی‌بادی اولیه (پروتئین نوترکیب scFv) به‌صورت سریالی (از غلظت ۳۰ تا ۴۶/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در بافر بلوکه‌کننده رقیق و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌های مربوطه اضافه شد. به‌منظور کاهش خطای انجام آزمایش، برای هر غلظت آنتی‌بادی، دو چاهک به‌صورت دوتایی در نظر گرفته شد. آنتی‌بادی‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه و یا ۱۶ ساعت در دمای ۴°C در چاهک‌ها باقی ماندند. پس از گذشت مدت زمان مشخص، چاهک‌ها ۵ بار با حجم ۳۰۰ میکرولیتر از بافر شست‌وشو شسته شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه علیه دنباله هیستیدینی (با رقت ۱:۲۵۰ تهیه‌شده در بافر بلوکه‌کننده) به همه چاهک‌ها اضافه و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه گرماگذاری شد. پس از اتمام زمان گرماگذاری، محتوای چاهک‌ها تخلیه شدند و هر چاهک ۵ بار مشابه با مرحله قبل شست‌وشو داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر سوپسترای TMB به هر چاهک اضافه و حدود ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه و به دور از نور قرار داده شد. از اسیدسولفوریک ۲ نرمال به‌عنوان بافر متوقف‌کننده استفاده شد و سنجش شدت رنگ ایجادشده در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الیزا انجام گرفت. در این تست، از آنتی‌بادی مونوکلونال تراستوزومب به‌عنوان کنترل مثبت و برای شناسایی آن از آنتی‌بادی ثانویه خرگوشی علیه IgG انسانی متصل به HRP با رقت ۱:۱۵۰۰ استفاده شد.

بررسی فعالیت قطعه آنتی‌بادی نوترکیب علیه پروتئین HER2 با روش الیزای سلولی

رده‌های سلولی سرطان سینه SKBR3 (HER2 مثبت) و MDA-MB468 (HER2 منفی) در محیط کشت DMEM حاوی ال-گلوتامین، FBS و آنتی‌بیوتیک PEN/Strep در دمای ۳۷°C در شرایط ۵% دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند. پس از رسیدن تراکم سلول‌ها به ۸۰ تا ۹۰٪، سلول‌ها با افزودن تریپسین از کف فلاسک‌ها جدا شدند و پس از افزودن محیط کشت به همراه سرم، سوپانسیون سلولی حاصل سانتریفیوژ شد و به کمک لام نئوبار شمارش شدند. تعداد کل سلول‌های مورد نیاز برای انجام الیزا در هر چاهک، ۱۵۰۰۰ سلول محاسبه شد که همراه با محیط کشت DMEM به چاهک‌های پلیت کشت سلول اضافه شد و به مدت ۱۶ ساعت درون انکوباتور ۵% دی‌اکسیدکربن در دمای ۳۷°C ۳/۷% استفاده و پس از گذشت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، فرمالدئید از ته چاهک‌ها تخلیه شد. پس از شست‌وشوی چاهک‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر PBS (۳ بار و هر بار به مدت یک دقیقه)، محلول بلوکه‌کننده الیزا به مقدار ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه گرماگذاری شد. آنتی‌بادی اول (پروتئین scFv نوترکیب) با غلظت ۳۰ میکروگرم بر

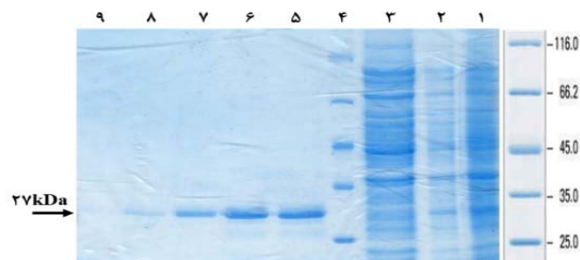


(الف)



(ب)

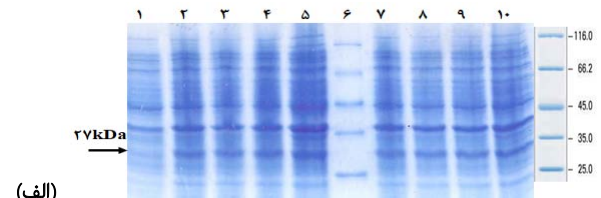
نمودار ۱) بهینه‌سازی شرایط بیان پروتئین scFv: الف) بهینه‌سازی زمان پس از القا و غلظت‌های مختلف IPTG در دمای ۳۷°C؛ ب) بهینه‌سازی زمان پس از القا در دماهای مختلف با غلظت ثابت ۰/۷۵ میلی‌مولار از IPTG؛ علامت ستاره نشانگر اختلاف معنی‌دار آماری (p < ۰/۰۵) است.



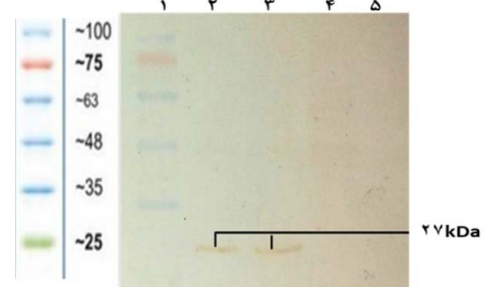
شکل ۳) تخلیص پروتئین scFv با کروماتوگرافی Ni-NTA؛ نمونه ۱: رسوب باکتری بعد از القا، نمونه ۲: نمونه خروجی از ستون (Flow through)، نمونه ۳: نمونه حاصل از شست‌وشوی ستون، نمونه ۴: مارکر پروتئینی (Fermentas)، نمونه‌های ۵ تا ۹: پروتئین‌های elute شده از ستون

نتیجه آزمون وسترن بلات به‌منظور بررسی اتصال آنتی‌بادی scFv به دومین خارج سلولی آنتی‌ژن HER2 نشان داد که این قطعه آنتی‌بادی قادر به اتصال به این بخش از پروتئین HER2 بوده است، به‌طوری که پس از اضافه‌کردن آنتی‌بادی ثانویه علیه دنباله هیسیتیدینی، تک باندی عاری از هر گونه باند غیراختصاصی در محدوده وزنی مورد انتظار (۱۰۰ کیلودالتون) ظاهر شد (شکل ۴). در این آزمون، ویژگی این آنتی‌بادی نسبت به آنتی‌ژن HER2 در مقایسه با یک مولکول scFv غیراختصاصی، طراحی‌شده علیه یک آنتی‌ژن باکتریایی (کنترل منفی) بررسی شد. از طرف دیگر به‌منظور بررسی صحت انجام ایمونوبلاتینگ از آنتی‌بادی ترانسژنومب به‌عنوان آنتی‌بادی کنترل مثبت علیه پروتئین HER2 استفاده شد.

نوترکیب روی ژل SDS-PAGE با استفاده از کوماسی‌بلو، باند پروتئینی با وزن تقریبی ۲۷ کیلودالتون را نشان داد (شکل ۲-الف). پس از تایید وجود پروتئین نوترکیب روی ژل SDS-PAGE، حضور این پروتئین با روش وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی علیه دنباله هیسیتیدینی تایید شد (شکل ۲-ب).



(الف)

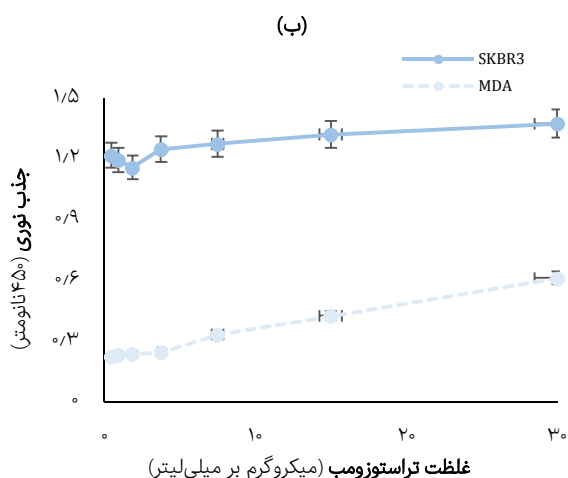
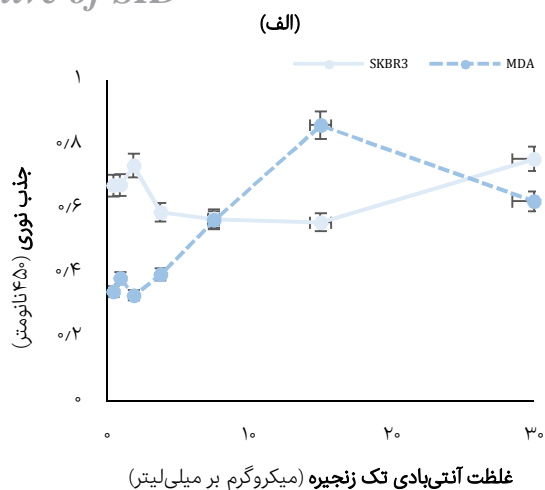


(ب)

شکل ۲) تایید بیان پروتئین scFv: الف) SDS-PAGE؛ نمونه ۱: رسوب سلولی قبل از القا؛ نمونه‌های ۲ تا ۵ و ۷ تا ۱۰: رسوب سلولی کلنی‌های نوترکیب متفاوت مورد بررسی، نمونه ۶: مارکر پروتئینی (Fermentas)؛ ب) وسترن بلاتینگ؛ نمونه ۱: مارکر پروتئینی (Fermentas)، نمونه‌های ۲ و ۳: رسوب سلولی کلنی‌های نوترکیب بعد از القا؛ نمونه‌های ۴ و ۵: رسوب سلولی کلنی‌های نوترکیب قبل از القا

تولید پروتئین نوترکیب scFv تحت شرایط متفاوت کشت باکتری از نظر غلظت IPTG و مدت زمان گرماگذاری پس از القا انجام شد تا میزان بیان پروتئین scFv علیه پروتئین HER2 بهینه شود. در آزمایش اول زمان‌های مختلف پس از القا و غلظت‌های مختلفی از IPTG در شرایط دمایی ۳۷°C بررسی شدند. دانسیتومتری باندهای مربوط به پروتئین نوترکیب در این مطالعه نشان داد که بیشترین میزان بیان scFv در غلظت‌های ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار از IPTG (نمودار ۱-الف). در آزمایش دوم با توجه به نتایج حاصل از آزمایش اول، با در نظر گرفتن صرفه اقتصادی شرایط تولید این پروتئین، غلظت ثابت ۰/۷۵ میلی‌مولار از IPTG در شرایط دمایی مختلف و زمان‌های مختلف پس از القا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج دانسیتومتری باندهای نوترکیب در این مرحله نشان داد که بیان پروتئین در دمای ۳۷°C با گذشت ۶ و ۲۴ ساعت از زمان القا بیشترین میزان را دارد (نمودار ۱-ب).

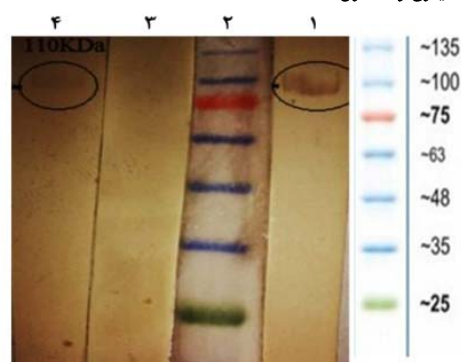
با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی نیکل (Ni-NTA)، scFv نوترکیب تخلیص و میزان خلوص پروتئین مورد نظر بر روی ژل SDS-PAGE بررسی شد. SDS-PAGE حضور قطعه آنتی‌بادی در محدوده وزنی مورد نظر (۲۷/۳ کیلودالتون) را نشان داد (شکل ۳). غلظت پروتئین تخلیص‌شده با روش برادفورد محاسبه شد.



نمودار ۳) نتایج الیزای سلولی با استفاده از پروتئین scFv نوترکیب (الف) و تراستوزومب (ب)

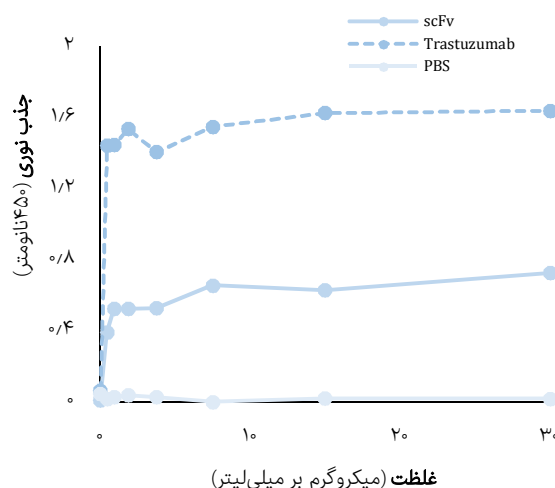
بحث

از مزایای آنتی‌بادی‌های نوترکیب به‌ویژه قطعات scFv اندازه کوچک آنها است که منجر به نفوذ بهتر به درون بافت‌ها خصوصاً بافت‌های توموری خواهد شد. حفظ خواص اتصال به آنتی‌ژن، ترکیب سریع با مولکول هدف و پاکسازی سریع بدن از کمپلکس‌های ایمنی و پایداری در دمای ۳۷°C از دیگر خواص این مولکول‌ها هستند [2, 8]. اخیراً استراتژی scFv به یکی از مهم‌ترین روش‌های محبوب در مهندسی آنتی‌بادی تبدیل شده است که مزایای متعددی را بیش از روش‌های سنتی ارائه می‌دهد و برای تولید آن نیاز به کشت سلول در سطح گسترده و یا حیوانات آزمایشگاهی نیست. این مولکول‌ها در مقایسه با آنتی‌بادی‌های کامل نیازی به گلیکوزیلاسیون ندارند و می‌توانند به‌صورت یک تک زنجیره پلی‌پپتیدی فعال در میزبان باکتریایی که فاقد سیستم تغییرات پس ترجمه است نیز تولید شوند و قادر هستند با اتصال به عوامل مختلف از جمله داروهای شیمیایی، سیتوکین‌ها و توکسین‌ها خاصیت درمانی داشته باشند و یا به



شکل ۴) فعالیت پروتئین scFv علیه دومین خارج سلولی پروتئین HER2: نمونه ۱: واکنش تراستوزومب با HER2، نمونه ۲: مارکر پروتئینی (Fermentas)، نمونه ۳: واکنش scFv نامربوط به‌عنوان کنترل منفی، نمونه ۴: واکنش scFv بیان‌شده در مطالعه حاضر با HER2

بررسی اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن HER2 با تست الیزای غیررقابتی در مقایسه با آنتی‌بادی تراستوزومب سنجیده و نتایج توسط دستگاه خوانشگر الیزا قرائت شد. مولکول scFv در تمامی غلظت‌ها قادر به اتصال به آنتی‌ژن HER2 است (نمودار ۲). نتایج الیزای سلولی نشان داد که در غلظت‌های بالا از آنتی‌بادی نوترکیب مورد استفاده (بالتر از ۳/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، میانگین جذب نوری در مورد سلول‌های HER2 مثبت و HER2 منفی تفاوت قابل ملاحظه آماری نشان نمی‌دهد ($p > 0.05$), در حالی که غلظت‌های پایین‌تر این پروتئین (کمتر از ۳/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، تفاوت آماری مشخصی را بین رده‌های سلولی مورد استفاده نشان داد ($p < 0.0001$; نمودار ۳-الف). در این آزمون از آنتی‌بادی تراستوزومب به‌عنوان آنتی‌بادی کنترل مثبت علیه HER2 استفاده شد که در تمامی غلظت‌ها اختلاف مشخص و قابل ملاحظه‌ای را میان سلول‌های مورد استفاده نشان داد ($p < 0.0001$; نمودار ۳-ب).



نمودار ۲) نتایج الیزا علیه دومین خارج سلولی پروتئین HER2 با استفاده از پروتئین scFv نوترکیب و تراستوزومب

برای بیان پری‌پلاسمی این قطعه آنتی‌بادی پرداختند [7]. با وجود افزایش کلی بیان پروتئین در دمای ۳۷°C و ۲۴ ساعت پس از القا، میزان پروتئین محلول در دمای ۳۰°C، بیشتر گزارش شد اما غلظت IPTG تأثیری بر میزان بیان نداشت. در مطالعه حاضر، مولکول آنتی‌بادی با منشاء آمینواسیدی تراستوزومب علیه دامین خارج سلولی پروتئین HER2 به فرم قطعه آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای scFv در میزان پروکاریوتی *E. coli* کلون و بیان شد. براساس مطالعات قبلی [3] در این مطالعه دنباله هبستیدینی در انتهای کربوکسیلی پروتئین تعبیه شد تا فولدینگ پروتئین بهتر صورت بگیرد. به دنبال تایید بیان پروتئین نوترکیب، بهینه‌سازی فاکتورهای موثر در بیان پروتئین نوترکیب با توجه به شرایط مورد بررسی در مطالعات قبلی (از جمله دمای گرماگذاری، غلظت ماده القاکننده IPTG و مدت زمان گرماگذاری پس از القا) صورت گرفت. بررسی‌ها نشان داد که شرایط بهینه بیان این پروتئین شامل دمای ۳۷°C، غلظت‌های ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار IPTG و مدت زمان ۶ و ۲۴ ساعت پس از القا است که تاییدی بر مطالعات پیشین که دمای ۳۷°C را به‌عنوان دمای بهینه بیان پروتئین‌های نوترکیب در سلول *E. coli* گزارش کرده‌اند است [16-18]. برخلاف مطالعاتی که اثر سمی غلظت‌های بالای IPTG را بر میزان بیان پروتئین و نیز مهار رشد سلول باکتری گزارش کرده‌اند [19، 20]، در مطالعه حاضر غلظت‌های نسبتاً بالای این ماده (۰/۷۵) و (۱ میلی‌مولار) بیشترین میزان بیان پروتئین را نشان داد ولی با توجه به اینکه این غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار آماری با یکدیگر نشان ندادند و به‌منظور صرفه‌جویی اقتصادی در مصرف IPTG، از غلظت کمتر یعنی ۰/۷۵ میلی‌مولار برای مراحل بعدی بیان استفاده شد. بهینه‌سازی‌های به‌عمل‌آمده در بیان scFv مورد نظر و موفقیت‌آمیز بودن تخلیص پروتئین با استفاده از ایمیدازول موید محلول بودن scFv بیان‌شده در سیتوپلاسم سلول باکتری است که برای داشتن ساختار و عملکرد مناسب تنها نیاز به دیالیز و حذف غلظت بالای ایمیدازول داشت.

در مرحله نهایی این مطالعه، بررسی اتصال مولکول نوترکیب تخلیص‌شده به دومین خارج سلولی پروتئین HER2 نوترکیب و نیز مولکول HER2 در سطح سلول‌های سرطانی پستان مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور از روش‌های وسترن بلاتینگ و الیزای اختصاصی علیه این پروتئین استفاده شد. در الیزای سلولی از سلول‌های SKBR3 به‌عنوان رده سلولی با بیان بالای HER2 (HER2+++) و سلول‌های MDA-MB-468 به‌عنوان سلول HER2 منفی استفاده شد [21]. مطالعه حاضر نشان داد که قطعه آنتی‌بادی نوترکیب تک زنجیره می‌تواند همانند آنتی‌بادی مونوکلونال تراستوزومب اما با قدرت کمتر به اپی‌توپ‌های موجود در دومین شماره ۴ ناحیه خارج سلولی پروتئین HER2 متصل شود که این مطلب با مطالعه سوماروگا و همکاران [4] همخوانی نشان داد. این اتصال در مقایسه با اتصال غیراختصاصی آن به سلول‌های HER2 منفی در غلظت‌های مشخصی از آنتی‌بادی قابل

واسطه اتصال به مولکول‌های رادیوایزوتوپ برای تشخیص مورد استفاده قرار گیرند [9، 10].

در مطالعه حاضر، از میزان پروکاریوتی *E. coli* به‌منظور بیان قطعه آنتی‌بادی استفاده شد. این باکتری به‌دلیل دارابودن ویژگی‌هایی همچون رشد سریع، ژنوم شناخته‌شده، توانایی پذیرش تعداد زیادی از وکتورها و سطح بیان بالا، میزان مناسبی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب است. علاوه بر موارد ذکرشده، محیط کشت ساده و ارزان، توانایی تولید پروتئین‌های درمانی با کیفیت و بازده بالا، قابلیت استفاده از انواع متنوعی از سیستم‌های بیانی و دست‌ورزی ژنتیکی راحت نیز از دیگر مزایای استفاده از باکتری *E. coli* در بیان پروتئین‌های نوترکیب است.

در جهان و نیز در ایران سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان و اولین دلیل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در این جمعیت است [11]. گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی انسانی شماره ۲ (HER2) یک گلیکوپروتئین تراغشایی و دارای فعالیت تیروزین کینازی است [12]. افزایش بیان این پروتئین در برخی از انواع سرطان‌ها از جمله سرطان پستان به اثبات رسیده است [13]. طی دهه‌های گذشته مطالعات زیادی برای استفاده از این پروتئین برای درمان سرطان انجام شده است. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تراستوزومب و پرتوزومب به‌منظور هدفگیری اختصاصی نواحی خاصی از دومین‌های خارج سلولی پروتئین HER2 توسط FDA تایید شده‌اند [14] که به‌تنهایی یا همراه با داروهای شیمی درمانی قادر به مهار رشد سلول‌های سرطانی HER2 مثبت هستند [14، 15]. طی سال‌های گذشته قطعات آنتی‌بادی خصوصاً قطعه scFv علیه HER2 در میزان‌های مختلف بیان شده‌اند. در سال ۲۰۰۶ بیان این قطعه آنتی‌بادی با منشاء آنتی‌بادی مونوکلونال موشی در میزان گیاهی و سیستم‌های بیانی عاری از سلول مورد بررسی قرار گرفت [3]. این محققان نشان دادند که اضافه‌کردن دنباله هبستیدینی به انتهای کربوکسیلی قطعه آنتی‌بادی در اتصال آن به پروتئین هدف موثرتر از افزودن آن به انتهای آمینی مولکول است. در مطالعه دیگری، این پروتئین در میزان مخمری *P. pastoris* بیان شد که اتصال آن به HER2 با روش فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت [4]. این قطعه آنتی‌بادی مشابه با پروتئین بیان‌شده در مطالعه حاضر قدرت اتصال کمتری را در مقایسه با تراستوزومب نشان داد. در سال ۲۰۱۹، بیان scFv با منشاء تراستوزومب به‌صورت پری‌پلاسمی و سیتوپلاسمی در سلول *E. coli* مورد ارزیابی قرار گرفت [6]. در این مطالعه با بررسی شرایط مختلف دمایی و غلظت‌های مختلف IPTG در بیان پروتئین نوترکیب، نشان داده شد که بیشترین میزان بیان قطعه آنتی‌بادی به‌صورت محلول در ۳۷°C و در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار از ماده القاگر و به‌صورت پری‌پلاسمی انجام گرفته است، اما فعالیت بیولوژیکی پروتئین بیان‌شده در آن مطالعه مورد ارزیابی واقع نشد. همین گروه تحقیقاتی در ادامه مطالعه قبلی، در سال ۲۰۲۰ به بررسی شرایط دمایی، زمان پس از القا و نوع سویه باکتری *E. coli*

HER2 scFv antibody variant for targeting breast cancer cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;91(3):613-21.

5- Rostinawati T, Kusuma SA, Yusuf M, Gaffar S, Subroto T. Construction and Expression of Synthetic-gene encoding anti-HER2 scFv Fused with pelB in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *J Pharm Sci Res*. 2017;9(11):2106-13.

6- Farshdari F, Ahmadzadeh M, Jahandar H, Mohit E. Enhanced solubility of anti-HER2 scFv using bacterial Pelb leader sequence. *Iran J Pharm Sci*. 2019;15(1):1-6.

7- Farshdari F, Ahmadzadeh M, Nematollahi L, Mohit E. The improvement of anti-HER2 scFv soluble expression in *Escherichia coli*. *Braz J Pharm Sci*. 2020;56.

8- Cheng WW, Allen TM. The use of single chain Fv as targeting agents for immunoliposomes: An update on immunoliposomal drugs for cancer treatment. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(4):461-78.

9- Marks JD, Poul MA, inventors. Internalizing ErbB2 antibodies. WIPO (PCT) patent WO199905367A1. 1999.

10- Pedersen MW, Jensen A, Meijer P, inventors. Anti-HER2 antibodies and compositions. United States patent US8609095B2. 2011.

11- Thongsuksai P, Chongsuvivatwong V, Sriplung H. Delay in breast cancer care: A study in Thai women. *Med Care*. 2000;38(1):108-14.

12- Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: Current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9(1):16-32.

13- Ahmadi A, Mohagheghi MA, Fazeli MS, Nahavandian B, Bashardoost N, Jarahi AM, et al. HESA-A: New treatment for breast cancer and choroidal metastasis. *Med Sci Monit*. 2005;11(6):CR300-3.

14- Murphy CG, Modi Sh. HER2 breast cancer therapies: A review. *Biologics*. 2009;3:289-301.

15- Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Controll Release*. 2010;146(3):264-75.

16- Akbari V, Sadeghi HM, Jafrian-Dehkordi A, Abedi D, Chou CP. Functional expression of a single-chain antibody fragment against human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2014;41(6):947-56.

17- Jaliani HZ, Farajnia S, Safdari Y, Mohammadi SA, Barzegar A, Talebi S. Optimized condition for enhanced soluble-expression of recombinant mutant *anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase. *Adv Pharm Bull*. 2014;4(3):261-6.

18- Naderi S, Alikhani MY, Karimi J, Shabab N, Mohamadi N, Jaliani HZ, et al. Cytoplasmic expression, optimization and catalytic activity evaluation of recombinant mature lysostaphin as an anti-staphylococcal therapeutic in *Escherichia coli*. *Acta Med Int*. 2015;2(2):72-7.

19- Napathorn SC, Kuroki M, Kuroki M. High expression of fusion proteins consisting of a single-chain variable fragment antibody against a tumor-associated antigen and interleukin-2 in *Escherichia coli*. *Anticancer Res*. 2014;34(8):3937-46.

20- Kim S, Cheung LH, Zhang W, Rosenblum MG. Improved expression of a soluble single chain antibody fusion protein containing tumor necrosis factor in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;77(1):99-106.

21- Huang R, Wang Q, Zhang X, Zhu J, Sun B. Trastuzumab-cisplatin conjugates for targeted delivery of cisplatin to HER2-overexpressing cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2015;72:17-23.

ملاحظه گزارش شد. در تفسیر نتایج می‌توان به این نکته اشاره کرد که غلظت‌های بالای پروتئینی می‌تواند به کاهش اختصاصیت (ویژگی) آنتی‌بادی منجر شود که شاید دلیلی برای اتصال غیراختصاصی مشاهده‌شده در مورد سلول‌های HER2 منفی باشد. از طرف دیگر غلظت‌های بالای پروتئینی می‌تواند منجر به تجمع پروتئینی شود که عاملی در اتصال غیراختصاصی به حساب می‌آید.

نتیجه‌گیری

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که بیان این قطعه آنتی‌بادی به‌منظور انجام آزمون‌های بر پایه اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی در تمامی مدل‌های بیانی قابل انجام است. در این راستا، دو عامل مهمی که بایستی مورد توجه قرار گیرند میزان بیان و فولدینگ مناسب مولکول است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین scFv بیان‌شده علیه پروتئین HER2 قابلیت شناسایی این آنتی‌ژن را دارد و می‌تواند در زمینه تشخیص این پروتئین در آزمایش‌های تشخیصی بر روی نمونه‌های مشکوک به بیان بیش از حد این پروتئین در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان پستان کمک کند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از تمامی همکاران بخش بیوتکنولوژی پزشکی که در انجام مطالعه حاضر کمک نموده‌اند نهایت تشکر را دارند. از جناب آقای دکتر/میرفرشچی (مدیریت شرکت آریوزن فارمد ایران) نیز به‌دلیل دراختیار گذاشتن داروی تراستوزومب (با نام آریوتراست) تشکر می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مژده حیدری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ زهرا علی‌آبادی فراهانی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ الهام بیات (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ شادی داموغ (نویسنده چهارم)، نگارنده بحث (۱۰٪)؛ معصومه سبزی‌نژاد (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ یگانه طالب‌خان گروسی (نویسنده ششم)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۰٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر با استفاده از گرنت پژوهشی مصوب انستیتو پاستور ایران به شماره ۹۹۶ انجام شده است.

منابع

1- Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*. 2003;421(6924):756-60.

2- Weisser NE, Hall JC. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol Adv*. 2009;27(4):502-20.

3- Galeffi P, Lombardi A, Pietraforte I, Novelli F, Di Donato M, Sperandei M, et al. Functional expression of a single-chain antibody to ErbB-2 in plants and cell-free systems. *J Transl Med*. 2006;4(1):39.

4- Sommaruga S, Lombardi A, Salvadè A, Mazzucchelli S, Corsi F, Galeffi P, et al. Highly efficient production of anti-