





جمهوری اسلامی ایران

پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی

عنوان طرح:

کلون سازی و بیان نانوبادی دوگانه علیه گیرنده های MUC1 & CD3 در میزبان
باکتریایی

کد طرح مصوب جهاد دانشگاهی: ۲۳۲۷

کد مصوب کمیته اخلاق در پژوهش:

IR.ACECR.IBCRC.REC.1394026

مسئول اجرای طرح: رضوان اسمعیلی، لیلا فرهمند

واحد سازمانی مجری: پژوهشکده سرطان پستان جهاد دانشگاهی

گروه پژوهشی: پروتئین های نو ترکیب

زمستان ۱۳۹۵

مشخصات مسئول و همکاران طرح مطابق پرسشنامه مصوب:

نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	تخصص	رتبه علمی	جمع کل نفر ساعت همکاری در طول مدت انجام طرح
رضوان اسمعیلی	مجری طرح	ژنتیک	استادیار	۱۶۰
لیلا فرهمند	مجری طرح	بیوتکنولوژی دارویی	استادیار	۳۰۰
کیوان مجیدزاده	همکار طرح	بیوتکنولوژی پزشکی	دانشیار	۲۴
علیرضا مجید انصاری	همکار طرح	بیوتکنولوژی دارویی	دکتری داروسازی	۱۸
حسن صنعتی	همکار طرح	انگل شناسی	کارشناسی ارشد	۱۰
علی اکبر زارع	همکار طرح	بیوتکنولوژی پزشکی	کارشناس ارشد	۳۰
ملیحه صالحی	همکار طرح	بیوتکنولوژی میکروبی	کارشناس	۱۰۰

چکیده فارسی:

مقدمه: درمان سرطان بر پایه آنتی بادی و کلاس های مختلف آن منجر به بروز نتایج برجسته کلینیکی در بهبود بیماران مبتلا شده است. نانوبادی ها تک دمین های متغیر آنتی بادی های شتری هستند. این کوچکترین قطعات متصل شونده به آنتی ژن با داشتن ویژگی های منحصر به فرد، برتری های زیادی نسبت به آنتی بادی های متداول درمانی دارند. MUC1 از دسته آنتی ژن های مرتبط با سلول سرطانیست که در بیش از ۹۰٪ انواع سرطان پستان بیان بیش از حد داشته و با متاستاز و عود بیماری ارتباط مستقیم دارد. همچنین به دلیل مکانیسم های مختلف فرار تومور از سیستم ایمنی ساختارهای دوگانه نانوبادی که بتواند علاوه بر اتصال به آنتی ژن سلول سرطانی، سلول های T سیتوتوکسیک را نیز علیه آن تحریک کند دارای اثر هم افزایی در ریشه کن کردن سلول توموری خواهد داشت.

مواد و روش ها: به منظور بیان نانوبادی در باکتری، کانستراکتی طراحی شد که شامل سکانس های نانوبادی علیه CD3 و نانوبادی ضد MUC1 بود. دو نانوبادی توسط لینکر ناحیه لولایی IgG2 لامبا، به یکدیگر متصل شدند و برای تولید ترشحی پروتئین، توالی هدایتگر به ابتدا و جهت تخلیص آن، دنباله هیستیدینی به انتهای کانستراکت اضافه شد. پس از کلونینگ، کانستراکت وارد باکتری بیانی گردید. بیان نانوبادی در میزبان باکتریایی انجام شد. تخلیص نانوبادی با کروماتوگرافی انجام گرفت. فعالیت ضد تکثیری نانو بادی دو گانه بر علیه گیرنده MUC1 که در میزبان باکتریایی تولید شده بود بررسی شد. در این راستا از رده سلولی SKBR3 که افزایش بیان MUC1 را دارد استفاده شد. میزان تکثیر سلولی با استفاده از روش MTT بررسی شد. همچنین اثر تحریکی نانو بادی ضد CD3 روی سیستم ایمنی نیز با این روش با استفاده از سلول های Jurkat T انجام شد. اتصال نانوبادی ضد MUC1×CD3 به سلول های SKBR3 و Jurkat T با استفاده از روش فلوسایتومتری انجام گرفت. توانایی نانوبادی ضد MUC1 در ایجاد آپوپتوز سلولی با استفاده از کیت تشخیص آپوپتوز انجام شد.

یافته ها: طراحی نانوبادی دوگانه علیه MUC1&CD3 به طور موفقیت آمیز انجام گرفت. مراحل کلون سازی و بیان در *E. coli* بخوبی انجام شد. نتایج تعیین غلظت پروتئین پس از خالص سازی، حاکی از بیان بالای نانوبادی به

صورت ترشحي در ميزبان باكتريايي بود. بررسي هاي آپوپتوزيس نشان داد نانو بادي ضد MUC1 اثر تحريك كننده

آپوپتوزي بر روي رده سلولي SKBR3 را دارد.

بحث و نتيجه گيري: در مقايسه با روش هاي پر هزينه و وقت گير توليدآنتي بادي ها، مي توان نانوبادي با

فعاليت دوگانه ضد MUC1&CD3 رابه طور موفقيت آميز، عملكردي و اثربخش در ميزبان هاي مقرون به صرفه از

نظر اقتصادي توليد كرد. با توجه به ويژگي هاي منحصر به فرد نانوبادي ها، پس از پشت سر گذاشتن مراحل تكميلي

بعدي، مي توان از آن در تشخيص و درمان هدفمند بيماران سرطاني استفاده كرد.

واژه هاي كليدي: نانوبادي دوگانه، MUC1، CD3 و درمان هدفمند.

Archive of SID

فهرست مطالب

فصل اول: کلیات تحقیق

۲	بیوتکنولوژی ملکولی
۳	فناوری زیستی پروتئین (Protein biotechnology)
۳	پروتئین‌های دارویی
۳	منابع پروتئین‌های دارویی
۴	سیستم‌های بیان کننده مورد استفاده در تولید پروتئین‌های نو ترکیب
۶	سیستم بیان Escherichia coli
۶	انواع کلونینگ
۶	وکتورهای مورد استفاده در کلونینگ
۷	کلونینگ مستقل از لیگاسیون (LIC)
۸	انواع وکتورهای پلاسمیدی در E.coli
۸	وکتورهای پلاسمیدی کلونینگ
۸	وکتورهای پلاسمیدی بیان
۱۰	حاملین خانواده PET
۱۱	راهکارهای تولید پروتئین نو ترکیب در E.coli
۱۲	بیان درون سیتوپلاسمی
۱۳	ترشح پروتئین نو ترکیب در باکتری E.coli
۱۴	ترشح خارج سلولی
۱۴	پیتید هدایتگر

۱۷	سرطان پستان
۱۷	سلول‌های سرطانی
۱۸	هدف درمانی
۱۹	روش‌های درمانی سرطان پستان
۱۹	شیمی درمانی
۲۰	پرتو درمانی
۲۰	ایمونوتراپی
۲۱	آنتی‌بادی‌ها
۲۲	تاریخچه آنتی‌بادی‌ها
۲۳	آنتی‌بادیهای کایمیریک انسانی _ موشی
۲۳	آنتی‌بادیهای انسانی شده
۲۴	مهندسی قطعات آنتی‌بادی
۲۴	آنتی‌بادی نوترکیب چند ظرفیتی
۲۵	آنتی‌بادی نوترکیب با ویژگی دو گانه یا چند گانه
۲۵	آنتی‌بادی‌های دو نقشی (Bi-functional)
۲۶	آنتی‌بادیهای تک دومی
۲۶	آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین در خانواده شترها
۲۷	مزایای نانوبادی نسبت به سایر آنتی‌بادیهای نو ترکیب
۲۹	نانوبادی‌ها و کاربرد های درمانی
۲۹	اهمیت بیوتکنولوژی نانوبادی‌ها
۲۹	نانوبادی بعنوان ابزار تشخیصی و درمانی در سرطان
۳۰	نانوبادی بعنوان اینترآبادی
۳۰	نانوبادی بعنوان واحد ساختمانی برای سازه های دستکاری شده
۳۱	نشانه‌های توموری

۳۱ نشانگرهای کربوهیدراتی
۳۱ ویژگیهای کلی موسین ها
۳۲MUC1
۳۲MUC1 ساختار
۳۴ نقش فیزیولوژیک MUC1
۳۴ اثرات موسین ها بر روی سیگنال های سلولی
۳۴ MUC1 و رسپتور های تیروزین کینازی
۳۴ نقش موسین ها در سرطان
۳۵ اهمیت MUC1 در سرطان پستان
۳۵ ایمنی درمانی علیه MUC1 در سرطان

فصل دوم: پیشینه تحقیق

۳۸پیشینه MUC1
۴۰ MUC1 و آنتی بادی ها
۴۱اهداف (اصلی - ویژه و کاربردی):
۴۱اهداف اصلی
۴۱اهداف ویژه
۴۱اهداف کاربردی

فصل سوم: روش اجرای تحقیق

۴۳ روش مطالعه
۴۵ لیست کل دستگاه های مورد استفاده
۴۶ باکتری مورد استفاده در پژوهش
۴۶ محیط های کشت مورد استفاده
۴۶ آنتی بیوتیک ها

۴۷..... پایگاه های اطلاعاتی و نرم افزارهای بیو انفورماتیک

فصل چهارم: یافته های تحقیق

۴۸..... Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody سنتز ژن

۴۸..... Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody تکثیر ژن

۴۸..... طراحی پرایمرها

۵۰..... PCR

۵۲..... PCR. تخلیص محصول

۵۳..... PCR کلونینگ محصول

۵۳..... PCR آماده سازی محصول

۵۴..... pET-32 Ek/LIC اتصال محصول PCR آماده شده با حامل

۵۴..... انتقال کاست آماده به میزبان باکتریایی

۵۵..... آماده سازی سلول های *E.coli* برای پذیرش پلاسمید

۵۶..... انتقال پلاسمید (ترانسفورماسیون)

۵۷..... کشت تعدادی از کلونی ها در مقیاس کوچک

۵۷..... تأیید کلونینگ

۵۷..... Colony PCR Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody به روش

pET-32 تعیین ترادف (Sequencing) ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody موجود در حامل

۵۸..... Ek/LIC

۵۸..... BL21(DE3) بیان ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody در سلول ها

۵۸..... تهیه سلول مستعد از باکتری *E.coli* BL21 DE3 و انتقال حامل pET-32 Ek/LIC به آنها

۵۹..... ترانسفورماسیون

۵۹..... IPTG القاء بیان آنتی بادی نو ترکیب در محیط کشت LB مایع با افزودن

۶۰..... SDS-PAGE بررسی بیان ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody با روش

۶۴..... الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE)

۶۶	روش رنگ‌آمیزی ژل SDS-PAGE
۶۷	تایید بیان آنتی بادی نوترکیب با استفاده از روش SDS-PAGE
۶۸	تایید بیان آنتی بادی نوترکیب با استفاده از روش سنجش وسترن بلات (Western Blotting)
۶۹	تخلیص آنتی بادی نوترکیب با استفاده از سیستم کروماتوگرافی تمایلی
۷۰	لازم به ذکر است خالصسازی پروتئین مربوطه از انستیتوی پاستور ایران به صورت خدمات انجام شد.
۷۰	بررسی عملکرد آنتی بادی و بقاء سلول‌ها پس از تیمار با آن:
۷۰	رده سلولی و کشت سلول:
۷۱	بررسی اتصال نانو بادی به آنتی ژن (in vivo Binding Study)
۷۱	بررسی تکثیر سلولی با استفاده از روش MTT
۷۲	بررسی آپوپتوز سلولی (Apoptosis):
۷۵	طراحی ساختار Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody
۷۶	واکنش PCR به منظور تکثیر و جداسازی ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody
۷۷	کلونینگ محصول PCR در حامل pET-32 Ek-LIC
Colony	تایید کلونینگ ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody در pET-32 Ek-LIC با روش Colony
۷۸	PCR
	تایید کلونینگ ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody در pET-32 Ek-LIC با استفاده از روش
۷۹	تعیین ترادف (Sequencing):
۸۰	القاء بیان پروتئین Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody
۸۰	بررسی بیان آنتی بادی نوترکیب با روش Reduced SDS-PAGE
	نتایج تایید بیان آنتی بادی نوترکیب Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody با استفاده از روش
۸۱	Western Blot
	نتیجه تخلیص آنتی بادی نوترکیب Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody با استفاده از سیستم
۸۲	کروماتوگرافی تمایلی
۲۸۰	تعیین میزان Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody از طریق میزان جذب نوری در طول موج

نانومتر..... ۸۳.....

بررسی اتصال آنتی بادی (MUC1-CD3) به آنتی ژن MUC1 سطح سلول سرطان پستان (Binding study)

Error! Bookmark not defined.

کاهش بقای سلولهای تیمار شده با نانو بادی MUC1-CD3:..... ۸۷.....

بررسی آپوپتوز سلولی..... ۸۹.....

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

نتیجه گیری..... ۹۴.....

پیشنهادات..... ۹۵.....

Archive of SID

فهرست اشکال

- شکل ۱: سیستم کلون سازی در حاملهای LIC ۴۹
- شکل ۲: لام نتوبار جهت شمارش سلولی ۷۰
- شکل ۳: نتیجه PCR ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ ۷۷
- شکل ۴: کلونینگ محصول PCR در حامل pET-32 Ek-LIC ۷۸
- شکل ۵ نتیجه Colony PCR مربوط به کلونینگ ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody ۷۹
- ستون شماره ۱ کنترل منفی، ستون شماره ۳ و ۴ مربوط به کلنی مثبت و ستون شماره ۵ Marker DNA ۷۹
- شکل ۶: نتایج بیان Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody با روش Reduced SDS-PAGE ۸۱
- شکل ۷ نتیجه وسترن بلاتینگ آنتی بادی نو ترکیب Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody ۸۲
- شکل ۸ نمونه تخلیص شده با ستون کروماتوگرافی ۸۳
- شکل ۹ نتیجه اتصال آنتی بادی MUC1-CD3 به مارکر سطحی MUC1 در رده ی سلولی SKBR3 سرطان پستان.
Error! Bookmark not defined.
- شکل ۱۰ مقایسه ی میزان جذب حاصل از نمونه های تست و کنترل منفی در رده های سلولی SKBR3 و MCF10A ۸۸
- شکل ۱۱ مقایسه ی میزان جذب حاصل از نمونه های تست JURKAT و کنترل منفی MCF10A ۸۸
- شکل ۱۲ نتایج اپوپتوز سلولی
Error! Bookmark not defined.

فهرست جداول

- جدول ۱: مزایا و معایب سیستم‌های بیان پروتئین ۵
- جدول ۲ مقایسه مزایا و معایب ۱۶
- جدول ۳ لیست مواد موجود در RCR mix ۵۰
- جدول ۴ لیست مواد حاضر در واکنش PCR به حجم ۲۵ ماکرولیتر ۵۱
- جدول ۶ اجزای واکنش ایجاد overhang ۵۳
- جدول ۷ اجزای واکنش اتصال محصول PCR آماده شده با حامل pET-32 Ek/LIC ۵۴
- جدول ۸ مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش Colony PCR ۵۷
- جدول ۹ اطلاعات تعیین درصد غلظت ژل جهت انجام PAGE- SDS ۶۰
- جدول ۱۰ تهیه بافر اکریل آمید ۶۰
- جدول ۱۱ بافر ژل تحتانی SDS-PAGE (PH8.8, Tris 1.5M) ۶۱
- جدول ۱۲ بافر ژل فوقانی SDS-PAGE (PH6.8, Tris 0.5 M) ۶۱
- جدول ۱۳ محصول بافر تانک SDS-PAGE X10 ۶۲
- جدول ۱۴ SDS% 10 ۶۲
- جدول ۱۵ ASP% 10 ۶۳
- جدول ۱۶ بافر نمونه 6x ۶۳
- جدول ۱۷ Tris HCL 4X ۶۴
- جدول ۱۸ بافر نمونه X2 ۶۷
- جدول ۱۹ جذب نوری ۶۰۰ نانومتر محیط کشت LB مایع، قبل و بعد از القاء بیان پروتئین ۸۰

Archive of SID



فصل اول

کلیات تحقیق

بیوتکنولوژی ملکولی

در سال ۱۹۷۳ استانی کوهن^۱ و هربرت بویر^۲ و همکارانشان روشی را برای انتقال اطلاعات ژنتیکی (ژن‌ها) از یک ارگانیسم به دیگری به کار گرفتند. این پروسه که بعدها تکنولوژی DNA نو ترکیب نامیده شد، محققان را در جداسازی ژن‌های اختصاصی و ابقای آن‌ها در ارگانیسم‌های میزبانی به صورت دائم، قادر ساخت. تکنولوژی DNA نو ترکیب در محدوده‌های وسیعی از مطالعات خصوصاً بیوتکنولوژی مفید است. بیوتکنولوژی به عنوان بزرگترین شاخه از این علم، از میکروارگانیسم‌ها در مقیاس انبوه برای تولید محصولات مهم تجاری استفاده می‌کند تا قبل از ظهور این تکنولوژی، مؤثرترین راه برای افزایش میزان بیان محصولات از یک میکروارگانیسم، القاء جهش و پروسه‌های انتخابی برای شناسایی ارگانیسم‌های دارای بیشترین ویژگی بود که این روش بسیار وقت‌گیر و پرهزینه می‌باشد؛ اما تکنولوژی DNA نو ترکیب یک وسیله قوی، سریع و مؤثر برای تولید ارگانیسم‌هایی با ویژگی‌های اختصاصی است. ترکیب تکنولوژی DNA نو ترکیب با بیوتکنولوژی مولکولی گویند. امروزه بیوتکنولوژی مولکولی بسیار گسترش یافته و از دستکاری‌های ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها

¹ S.Cohen

² H.Boyer



به مهندسی ژنتیک گیاهان و جانوران هم رسیده است. به عبارتی امروزه هم میکروارگانیسم‌ها و هم سلول‌های یوکاریوتی می‌توانند چنان مهندسی شوند که به صورت کارخانه‌های زیستی در سنتز پروتئین‌ها و سایر ترکیبات از آن‌ها استفاده شود. تکنولوژی DNA نو ترکیب که کلون کردن ژن^۱ یا کلون کردن مولکولی^۲ هم نامیده می‌شود، روش‌های مختلفی را در برمی‌گیرد که همگی در انتقال اطلاعات ژنتیکی از یک ارگانیسم به ارگانیسم دیگر نقش دارند. این تکنولوژی شامل مراحل زیر است:

۱- مولکول DNA مورد نظر از سلول دهنده، استخراج شده و به یک مولکول DNA ناقل^۳ متصل شده و یک مولکول DNA نو ترکیب ایجاد می‌کند.

۲- این سازه^۴ جدید به سلول میزبان منتقل شده و درون آن باقی می‌ماند. این پروسه را ترانسفورماسیون^۵ گویند. سلول‌هایی که این سازه‌ها را دریافت کرده‌اند از سلول‌های فاقد سازه شناسایی و انتخاب می‌شوند [۱].

فناوری زیستی پروتئین (Protein biotechnology)

فناوری زیستی پروتئین، به تولید تجاری و جداسازی پروتئین‌های ویژه‌ای، از منابع گیاهی، جانوری و میکروبی و کاربرد بعدی این پروتئین‌ها به منظور رسیدن به یک پدیده‌ی بیولوژیکی از پیش تعریف شده، اطلاق می‌شود. بسیاری از فناوری‌های علوم جدید و قدیمی در ارتباط تنگاتنگ با فناوری زیستی پروتئین قرار دارند که از میان آن‌ها می‌توان از فناوری‌های فرمانتاسیون (تخمیر)، آنتی‌بادی منوکلونال، مهندسی پروتئین، DNA نو ترکیب، تخلیص پروتئین و تثبیت پروتئین و علوم نظری میکروبیولوژی، شیمی، فیزیولوژی، بیوشیمی، ژنتیک و علوم گیاهی و جانوری را نام برد [۲].

پروتئین‌های دارویی

ما اکنون در آستانه انقلابی بزرگ در زمینه درمان بیماری‌ها قرار داریم و در طی دهه‌های اخیر پیشرفت وسیعی در کاربرد پروتئین‌ها به عنوان دارو و واکسن وجود داشته است و اکنون نیز ادامه دارد. پروتئین‌ها، فرایندهای فیزیولوژیکی بیماری را تنظیم می‌نمایند: بر روی برخی جایگاه‌ها به عنوان علائم پاراکرین و اندوکرین عمل نموده و در برخی موارد به عنوان ناقلین عصبی یا فاکتورهای رهش عمل می‌نمایند و اکنون برای مصارف درمانی در زمینه‌های متفاوتی نظیر

¹ Gene Cloning

² Molecular Cloning

³ Cloning Vector

⁴ Construct

⁵ Transformation

نورولوژی، اندوکرینولوژی، هماتوژی و سرطان استفاده می‌شوند [۳]. آنتی‌ژن‌های پروتئینی نوترکیب نیز در درمان و پیشگیری بسیاری بیماری‌ها به کار می‌روند [۲].

منابع پروتئین‌های دارویی

انتخاب منبع پروتئین اولین مرحله در طراحی فرایند تولید هر پروتئین است. تا سال ۱۹۸۲ که برای اولین بار انسولین انسانی با استفاده از باکتری E.coli نوترکیب به تولید رسید [۲]، تنها منبع پروتئین‌های دارویی، منابع طبیعی آن‌ها نظیر خون یا بافت‌های حیوانی بود. در بسیاری از این موارد سطح طبیعی تولید پروتئین پایین بود در حالی که مقادیر بالایی از منبع مورد استفاده برای تهیه مقادیر مناسب محصول پروتئینی مورد نیاز بود. بسیاری از این مشکلات با ظهور فناوری DNA نوترکیب برطرف شده‌اند. امروزه می‌توان ژن یا cDNA ی کد کننده هر پروتئین را جدا کرد و به یک سیستم بیان کننده مناسب وارد نمود و اجازه داد تا پروتئین در یک موجود بیگانه که معمولاً یک میکروارگانیسم است بیان شود. به این ترتیب با رشد و تکثیر انبوه ارگانیسم‌های نوترکیب می‌توان مقادیر قابل توجهی از هر پروتئین را تولید کرد [۴].

سیستم‌های بیان کننده مورد استفاده در تولید پروتئین‌های نوترکیب

انتخاب یک سیستم بیان کننده به منظور تولید بالای پروتئین‌های نوترکیب به عوامل متعددی بستگی دارد. این عوامل عبارتند از: ویژگی‌های مربوط به رشد سلول میزبان، میزان و نحوه بیان، تغییرات پس از ترجمه و فعالیت بیولوژیکی پروتئین مورد نظر علاوه بر این انتخاب یک سیستم بیان کننده نیازمند برآورد هزینه‌های طراحی، مراحل تولید و سایر ملاحظات اقتصادی می‌باشد. امروزه از سیستم‌های بیان کننده متعددی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود که می‌توان به عنوان مثال از سیستم‌های باکتریایی، مخمر، قارچ، حشرات و سلول‌های پستانداران نام برد.

سیستم‌های بیان کننده را به صورت زیر دسته‌بندی کرد:

۱- سیستم بیان پروکاریوتی: شامل *B.licheniformis*, *Acinetobacter*, *S.aureous*, *Escherichia coli* و *calcoaceticus* و سایر سلول‌های پروکاریوتی.

۲- سیستم بیان یوکاریوتی: شامل سلول‌های حیوانی، گیاهی و حشرات، مخمرها، قارچ‌ها، حیوانات و گیاهان.

۳- سیستم بیان عاری از سلول: در این سیستم بیان ابتدا سلول‌ها لیز شده و عصاره سلولی تهیه می‌شود. در مرحله بعد سوبسترا و نمک‌ها به این عصاره اضافه می‌گردد و سنتز پروتئین با اضافه کردن الگو (mRNA) آغاز می‌شود.

هر سیستم دارای مزایا و معایبی می باشد و در نهایت نوع و ساختار مولکولی ژنی که باید کلون شود، ساختار فیزیکی و شیمیایی پروتئین تولید شده، توانایی های سیستم بیانی و شرایط بهینه اقتصادی برای تولید پروتئین از جمله مهمترین عوامل در زمینه انتخاب سیستم بیان می باشند. به طور مثال پروتئین هورمون رشد دارای ۱۹۱ اسید آمینه می باشد. این پروتئین دارای دو پل دی سولفیدی و به صورت غیر گلیکوزیله تولید می گردد. براین اساس تولید این پروتئین در سیستم های بیان پروکاریوتی بر سیستم های بیان پستانداران و مخمری ارجحیت دارد در جدول ۱-۱ برخی از مزایا و معایب این سیستم ها آورده شده است.

جدول ۱: مزایا و معایب سیستم های بیان پروتئین

معایب	مزایا	باکتری ها
<p>پروتئین های نوترکیب دارای اصلاحات بعد از ترجمه نمی باشند. فعالیت بیولوژیک و ایمونوژنیسیته پروتئین نوترکیب ممکن است با پروتئین طبیعی متفاوت باشد.</p> <p>باکتری های گرم منفی دارای اندوتوسین بالایی می باشند. بیان بالا ممکن است منجر به ایجاد inclusion bodies گردد که ممکن است تخلیص آن را مشکل کند و فعالیت آن را نیز کاهش دهد.</p>	<p>حامل کونینگ فراوانی وجود دارد کنترل بیان ژن ساده می باشد. بازده بیان پروتئین نوترکیب بالا (تا ۵۰٪ کل پروتئین های سلول) کشت آن ساده است</p> <p>پروتئین های نوترکیب را به صورت فیوزن می توان تولید کرد</p>	<p>اشربشیاکلی</p>
<p>بیان انبوه پروتئین های نوترکیب به اندازه <i>E. coli</i> نمی باشد.</p> <p>اطلاعات ژنتیکی کمی در مورد آن وجود دارد کنترل بیان ژن مشکل می باشد.</p> <p>دستکاری های ژنتیکی پلاسمیدهای مخمری مشکل می باشد. گلیکوزیله کردن مخمر با انسان یکسان نمی باشد.</p>	<p>فیوزن پروتئین ها را مستقیماً به داخل محیط کشت ترشح می کند.</p> <p>اندوتوکسین های کمی دارد</p> <p>Generally Regarded As Safe (GRAS)</p> <p>پاتوژن انسانی نمی باشد</p> <p>اطلاعات فراوانی در مورد کشت انبوه آن و فرآیندهای پائین دستی آن وجود دارد.</p> <p>فرایندهای تخمیر مخمر نسبتاً ارزان قیمت می باشد</p> <p>مخمر توانایی گلیکوزیله کردن و ایجاد باندهای دی سولفیدی را دارد امکان ترشح پروتئین نوترکیب به محیط کشت در این سیستم وجود دارد.</p>	<p>استافیلوکوکوس ارئوس</p> <p>مخمر</p> <p>ساکارومیسس</p>
<p>بیان بالای پروتئین های نوترکیب در این ارگانیسم ها بدست نیامده است.</p> <p>اطلاعات ژنتیکی در مورد آن ها کامل نیست.</p> <p>وکتورهای کلونینگ وجود ندارد.</p>	<p>اطلاعات فراوانی در مورد فرمانتاسیون قارچ های رشته ای وجود دارد. هزینه کشت آن ها بالا نمی باشد.</p> <p>منبع بسیاری از آنزیم های صنعتی می باشند.</p> <p><i>A. niger</i> یک (GRAS) می باشد.</p> <p>توانایی ترشح مقادیر فراوانی از پروتئین را به محیط کشت دارند</p>	<p>قارچ ها</p> <p>گونه های اسپروژینوس</p>
<p>اطلاعات فراوانی در مورد مکانیسم های گلیکوزیلاسیون وجود ندارد. پروتئین نوترکیب ۱۰۰٪ فعال نمی باشد.</p>	<p>میزبان های بندپای کمی دارند بنابراین خطرناک نمی باشد</p> <p>وکتورهای Baculovirus تأییدیه FDA را برای تولید</p>	<p>سلول های کشت شده حشرات</p> <p>Baculovirus Vector</p>



سلول‌های پستانداران	پروتئین‌های دارویی را دارند. محصول پروتئینی نوترکیب تولید شده دارای تفاوت زیادی از نظر خصوصیات عملکردی و ایمونولوژیک با نوع طبیعی آن نمی‌باشد. تخلیص پروتئین ساده و ارزان می‌باشد.
پروتئین نوترکیب فعالیت بیولوژیک یکسان با نوع طبیعی دارد. وکتورهای تجاری در دسترس می‌باشد	کشت سلول مشکل می‌باشد. تولید پروتئین گران می‌باشد. رشد سلول‌ها کند می‌باشد.

سیستم بیان *Escherichia coli*

بسیاری از مزایای *E. coli*، این باکتری را ارگانیزمی با ارزش برای تولید بالای پروتئین‌های نوترکیب ساخته است که می‌توان از آن‌ها، توانایی رشد سریع در محیط‌های ساده و ارزان، دانش زیاد در مورد ویژگی‌های ژنتیکی و بیولوژی مولکولی، در دسترس بودن تعداد زیادی از ناقل‌های همسانه‌سازی (Cloning vectors) و گونه‌های میزبانی جهش یافته، کنترل آسان و میزان بالای بیان پروتئین نوترکیب را نام برد [۲، ۱۵].

اما علیرغم این مزایا، هر ژنی قادر به بیان در این ارگانیزم نیست. این امر ممکن است به علت ماهیت ساختاری منحصر به فرد و دقیق ترادف ژنی، پایداری و کارایی ترجمه mRNA، تاخوردگی پروتئین، تجزیه پروتئین توسط پروتئازها، تفاوت‌های عمده در درصد استعمال کردن بین ژن بیگانه و *E. coli* و سمیت بالقوه پروتئین برای میزبان، باشد. معایب عمده *E. coli* به عنوان یک سیستم بیان کننده شامل عدم توانایی انجام بسیاری از تغییرات پس از ترجمه که در پروتئین‌های پروکاریوتی یافت می‌شود، فقدان یک مکانیسم ترشحی برای ترشح مؤثر پروتئین به محیط کشت و توانایی محدود برای تسهیل شکل‌گیری وسیع باندهای دی سولفید می‌باشد [۶].

در صورت بیان بالا معمولاً پروتئین نوترکیب به صورت اجتماعی نامحلولی به نام Inclusion body (Ib) در سیتوپلاسم درآمده و تخلیص را مشکل‌تر نموده و فعالیت آن را کاهش می‌دهد. *E. coli* به عنوان یک باکتری گرم منفی، محتوای اندوتوکسین بالایی دارد که تب‌زا بوده و می‌تواند موجب شوک اندوتوکسیک و حتی مرگ انسان شود؛ بنابراین



جداسازی این اندوتوکسین ها در طی فرآیند تولید پروتئین دارویی بسیار حیاتی است. از طرفی پروتئین های تولید شده در E.coli به عنوان یک سلول پروکاریوت، دارای یک اسید آمینه فرمیل متیونین اضافی در انتهای N می باشد که ممکن است ویژگی های بیولوژیکی پروتئین را تغییر داده و یا حتی به عنوان یک ایمونوژن عمل کند [۷].

با وجود مسائل ذکر شده بسیاری از پروتئین های یوکاریوتی فعالیت بیولوژیکی کامل خود را در شکل غیر گلیکوزیله حفظ نموده و بنابراین در E.coli تولید می شوند [۶].

انواع کلونینگ

وکتورهای مورد استفاده در کلونینگ

وکتورهای یوکاریوتی و پروکاریوتی در این حوضه استفاده می شود که خصوصیات عمومی این وکتور ها مشابه می باشند گرچه در برخی ویژگی ها با هم متفاوت می باشند. جایگاه آغاز همانندسازی، رونویسی و توالی های تنظیمی باید به گونه ای باشد که برای سیستم آنزیمی میزبان قابل شناسایی باشد.

از وکتورهای سلول های پروکاریوتی می توان به پلاسمیدها، باکتریوفاژها (ویروس باکتری)، فاژ لامبدا، وکتورهای جانشین فاژ لامبدا، فاژ M³، کاسمیدها (Cosmids)، وکتورهای YAC و فاسمیدها و از وکتورهای سلول های یوکاریوتی می توان به باکلو ویروس (Baculovirus)، وکتورهای ویروسی پستانداران و وکتورهای گیاهان اشاره کرد.

کلونینگ مستقل از لیگاسیون (LIC)

کلونینگ مستقل از لیگاسیون (LIC) برای کلونینگ directional محصولات PCR بدون هضم با آنزیم محدودالاکثر یا برهم کنش های لیگاسیون توسعه داده شد. وکتورهای LIC از طریق تیمار یک backbone خطی با T4 DNA پلیمرز در حضور تنها یک dNTP ایجاد می شوند. فعالیت اگزونوکلئازی ۳' به ۵' T4 DNA پلیمرز نوکلئوتیدها را بر میدارد تا اینکه با یک residue مربوط به dNTP منفرد حاضر در مخلوط واکنش مواجه می شود. در این نقطه، فعالیت پلیمرز ۵' به ۳' آنزیم جهت پیشگیری موثر از برش بیشتر به مقابله با فعالیت اگزونوکلئازی می پردازد. توالی های پلاسمیدی مجاور (متصل به) جایگاه خطی (linearization) برای تولید overhang های تک رشته ای ۱۳ و ۱۴ بازی غیر مکمل ویژه در وکتور LIC طراحی می شوند. محصولات PCR با overhang های مکمل از طریق اتصال extension های ۵' مناسب به درون پرایمرها ایجاد می شوند. محصول PCR خالص می شود تا dNTP ها (و پلاسمید original اگر بعنوان الگو استفاده

می شد) حذف شوند و سپس با T4 DNA پلیمرز در حضور dNTP مناسب برای تولید overhang های سازگار با وکتور خاص تیمار شوند. کلونینگ بسیار موثر است زیرا فقط محصول موردنظر (مطلوب) توسط انیلینگ تشکیل می شود. وکتور LIC و اینسرت انیل شده بدرون سلول های مستعد *E. coli* ترنسفورم می شوند. تشکیل پیوند کووالان در اتصالات وکتور- اینسرت در درون سلول رخ می دهد تا پلاسمید حلقوی ایجاد شود.

وکتورهای LIC با گزینه های بیان مختلفی وجود دارند که همه آنها دارای یک جایگاه کلونینگ LIC یکسان هستند، بطوریکه یک اینسرت ژن هدف LIC-prepared می تواند بدرون هر یک از آنها یا همه آنها کلون شود.

الگوها برای آنالیز می توانند از طریق استراتژی های متنوعی ایجاد شوند. بطور مثال، با دنبال کردن ترنسفورماسیون واکنش های انیلینگ وکتور+ اینسرت LIC، کلون های باکتری می توانند بطور مستقیم از طریق PCR کلونی دنبال شده با رونویسی/ ترجمه محصولات PCR آنالیز شوند. بعنوان جایگزینی برای کلونینگ، واکنش های انیلینگ وکتور+ اینسرت LIC می تواند با T4 DNA لیگاز تیمار شود، رسوب داده شده و دوباره حل شود و مستقیماً برای آنالیز بکار رود. این فرایند امکان سنتز *in vitro* محصولات پروتئینی یک توالی DNA بطور مناسب تکثیر شده را در حدود ۳ ساعت فراهم می کند.

وکتور Ligation Independent cloning (LIC) یک روش ساده و کارآمد برای کلونینگ است و برخلاف بسیاری از روش های دیگر این روش به خالص سازی، آنزیم ها محدودالثر، هضم و اتصال نیازی ندارد.

انواع وکتورهای پلاسمیدی در *E.coli*

وکتورهای پلاسمیدی کلونینگ

پلاسمیدهای دارای تعداد کپی زیاد در کلونینگ مولکولی و تمامی دستکاری های معمول قطعات کوچک DNA های نو ترکیب به کار می روند. این پلاسمیدها دارای یک سری عناصر ضروری اند که در شناسایی باکتری های واجد آنها نقش دارند [۷]:

۱- شاخص آنتی بیوتیکی^۱

برای شناسایی باکتری های واجد پلاسمید از باکتری های فاقد پلاسمید نقش دارد. به این ترکیب که باکتری های

¹ Antibiotic selection marker

فاقد پلاسمید، قادر به تشکیل کلنی در صورت وجود آنتی بیوتیک اختصاصی نخواهند بود [۵].

۲- پروموتور باکتریوفازی

بسیاری از وکتورهای پلاسمیدی حاوی پروموتورهای مشتق از باکتریوفازهای T3 و T7 در مجاورت جایگاه برش آنزیم‌های محدودالاکثر (MCS)^۱ می‌باشند و مولکول‌های DNA خارجی در MCS الحاق می‌شوند. بسیاری از وکتورهای تجاری از جمله سری pGEM یا pBluescript حاوی پروموتور باکتریوفازی در دو جهت مخالف در دو طرف MSC می‌باشند که این مسئله به سنتز RNA از هر دو انتهای DNA خارجی اجازه می‌دهد [۶].

وکتورهای پلاسمیدی بیان^۲

انتخاب سیستم بیان برای تولید در سطح بالای پروتئین‌های نوترکیب به فاکتورهای زیادی بستگی دارد که عبارتند از: ویژگی‌های رشد سلولی، سطح بیان، بیان درون یا برون سلولی، تغییرات پس از ترجمه و فعالیت بیولوژیکی پروتئین مورد نظر. از طرف دیگر باید شرایط اقتصادی و هزینه استفاده از سیستم‌های بیانی مختلف را هم در نظر گرفت. از جمله سیستم‌های بیان مختلف می‌توان به سیستم‌های باکتریایی، مخمری، حشرات و پستانداران اشاره کرد. فواید زیادی در استفاده از سیستم باکتریایی و خصوصاً استفاده از سلول‌های *E. coli* به عنوان سیستمی با میزان بیان بالای پروتئین‌های نوترکیب، اثبات گردیده است [۵].

یک پلاسمید بیان، به عناصر متعددی نیاز دارد تا ساختار مناسب را برای بیان مؤثر یک پروتئین خارجی در سلول *E. coli* پیدا کند. این عناصر عبارتند از:

پروموتور در فرادست محل اتصال ریبوزومها (RBS)^۳ قرار دارد و تحت کنترل یک ژن تنظیم‌کننده می‌باشد. برای بیان پروتئین در مقیاس زیاد، باید پروموتور حامل بیان، قوی باشد و حداقل فعالیت رونویسی اولیه را داشته باشد. پروموتورها اغلب القاء‌پذیر حرارتی (مانند = پروموتور کنترل کننده تولید محصولات باکتریوفاز Lambda) و یا شیمیایی (= Ptrp = پروموتور کنترل کننده اوپرون تریپتوفان) می‌باشند.

یک پروموتور کارا دارای چند ویژگی است:

¹ Multiple Cloning Site

² Expression vector

³ Ribosome Binding Site



۱- قابل انتقال و استفاده در سویه‌های مختلف *E.coli* است.

۲- از قدرت رونویسی بالا برخوردار است، به طوری که محصول ژن فرودست آن به ۳۰-۱۰ درصد یا بیشتر از پروتئین‌های تام سلولی می‌رسد.

۳- دارای سطح بیان پایه‌ای پایینی است. این ویژگی به خصوص در مورد پروتئین‌هایی که برای سلول میزبان سمی و کشنده می‌باشند، اهمیت دارد. به علاوه سیستم‌های بیان‌کننده‌ای که به طور کامل قابل کنترل نیستند، می‌توانند موجب ناپایداری پلاسمید، کاهش در سرعت رشد سلول و از دست دادن تولید پروتئین نوترکیب شوند.

۴- القاء آن ساده و کم‌هزینه است. در تولید پروتئین‌ها در مقیاس بالا معمولاً القاء حرارتی بر القاء با ترکیبات شیمیایی نظیر IPTG^۱ به دلیل سمیت و هزینه آن ترجیح داده می‌شود [۵]

حاملین خانواده PET

انواع مختلفی از سیستم‌های بیان به منظور استفاده در سلول‌های *E.coli* طراحی و ساخته شده‌اند. سیستم pET یکی از قوی‌ترین سیستم‌هایی است که برای کلون کردن و بیان پروتئین‌های نوترکیب در *E.coli* طراحی شده است. این سیستم دارای عناصر زیر می‌باشد:

۱- جایگاه اتصال ریبوزوم (RBS): فاصله میان ناحیه شاین دالگرنو (SD) و کدون شروع، بر میزان ترجمه پروتئین اثر فراوان دارد. ساختمان ثانویه در ناحیه شروع ترجمه mRNA، نقش مهمی در میزان بیان ژن دارد و ایجاد یک ساختار سنجاق‌سری^۲، در فاصله میان SD و کدون شروع، مانع از دسترسی به زیر واحد S30 ریبوزومی و در نتیجه عدم ترجمه ژن می‌گردد. برای جلوگیری از ایجاد این حالت، استراتژی‌های مختلفی به کار گرفته شده است، غنی‌سازی این ناحیه با T و A باعث تقویت بیان ژن‌های خاص می‌گردد.

۲- سیگنال‌های شروع ترجمه: این سیگنال‌ها برای پروتئین‌هایی که خود فاقد این سیگنال‌ها می‌باشند، کاربرد دارند.

۳- وجود دنباله پروتئینی: بسیاری از سیستم‌های بیان pET دارای یک دنباله پروتئینی می‌باشند که به بیان بیشتر

¹ IsoPropyl-β-D-Thio Galactoside

² Hairpin

پروتئین هدف می‌انجامند. از جمله این دنباله‌ها می‌توان به دنباله هیستیدینی (His,Tag) (با ۶ تا ۱۰ اسیدآمیننه هیستیدین)، T7.Tag یا توالی‌های pelB و یا Omp اشاره کرد که دو مورد اخیر تنها در انتهای آمینی پروتئین هدف، بیان خواهند شد و پروتئین مورد نظر را به فضای پری‌پلاسمی هدایت کرده و موجب تقویت تاب‌خوردگی پروتئین و حفاظت از آن در برابر تجزیه پروتئولیتیکی می‌گردد؛ بنابراین وجود این دنباله‌های پروتئینی به تخلیص یک مرحله‌ای پروتئین با سیستم کروماتوگرافی گرایشی اجازه می‌دهند که روشی سریع و کم‌هزینه است و در صورت لزوم با پروتئازهای دارای جایگاه اختصاصی بر روی حامل حذف می‌شوند.

۴- جایگاه کلونینگ (MCS): سیستم‌های بیان pET دارای جایگاه برش آنزیم‌های محدودالثر در هر سه قالب خواندنی می‌باشند. در بیشتر موارد، دستکاری‌های ژنتیکی برای ایجاد انتهاهای مکمل ضروری است و این کار با طراحی پرایمرهای PCR مناسب که دارای ۱۰ تا ۱۲ باز اضافی جهت برش در انتهای 5' هستند، صورت می‌گیرد. بسیاری از جایگاه‌های برش آنزیمی، در وکتورهای مختلف، وجود دارند و بنابراین ژن‌های مورد نظر به راحتی میان آن‌ها قابل انتقال می‌باشند.

۵- مبدأ همانندسازی (Ori)^۱ مبدأ همانندسازی برای شروع همانندسازی در پلاسمید ضروری است.

۶- ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای انتخاب کلون‌های دلخواه بر روی محیط‌های کشت حاوی آنتی‌بیوتیک، کاربرد دارد. [۸]

به طور خلاصه از ویژگی‌های سیستم‌های بیان pET:

* میزان بالای بیان که تحت کنترل شدید می‌باشد.

* قابلیت استفاده از دنباله‌های پپتیدی در انتهای کربوکسیلی یا آمینی پروتئین به منظور خروجی پروتئین از

سلول، سنجش‌های ایمونولوژیکی و یا تخلیص پروتئین.

* وجود جایگاه برش آنزیم‌های محدودالثر در هر سه قالب خواندنی.

¹ Origin of replication

* شناس انتخاب سویه‌های مختلف میزبانی برای بهینه‌سازی میزان بیان پروتئین.

* وجود مبدأ همانندسازی فاز¹ fl¹ برای موتائزز و تعیین توالی با تولید مولکول DNA پلاسمیدی تک‌رشته‌ای از

طریق آلوده نمودن سویه‌های میزبانی حاوی f با یک فاز¹ کمی از جمله R408 [۸].

راهکارهای تولید پروتئین نو ترکیب در E.coli

سلول E.coli دارای چندین فضا می‌باشد که به ترتیب از داخل به خارج عبارتند از: سیتوزول، پری پلاسم و فضای

خارج سلولی. پروتئین‌های نو ترکیب تولید شده در E.coli را می‌توان به هریک از این فضاها هدایت کرد. هدایت پروتئین

نو ترکیب به هریک از این فضاها دارای مزایا و معایبی است که در جدول ۱-۲ ارائه شده است [۹].

بیان درون سیتوپلاسمی

تشکیل اجسام ذخیره‌ای مانع اصلی تولید پروتئین نو ترکیب به صورت سیتوپلاسمی است. البته تولید اجسام

ذخیره‌ای مزایایی را دارا است. ولی به دلایل زیر این مزایا ارزش چندانی ندارد:

۱. زحمت و هزینه لازم برای تاب‌خوردگی مجدد اجسام ذخیره چشمگیر است.

۲. باندهای دی‌سولفیدی به دلیل حضور تیوردوکسین‌ها در محیط سیتوپلاسم تشکیل نمی‌شوند [۹].

۳. در مورد اینکه پروتئین دوباره تاب‌خورده فعالیت زیستی خود را خواهد داشت یا نه اطمینانی وجود ندارد.

۴. بازده تولید پروتئین تخلیص شده و دوباره تاب‌خورده اندک است [۱۰].

امروزه عواملی که باعث تشکیل اجسام ذخیره می‌گردد روشن نیست. بررسی‌های آماری از ۸۱ پروتئین که در

E.coli دخالت داده یا نداده‌اند، نشان می‌دهد که چهار عامل اصلی در تشکیل اجسام ذخیره در E.coli دخالت دارند که

عبارتند از: میانگین بار، بخش سیستئینی، بخش پرولینی، هیدروفوبیسیته، تعداد کل اسید آمینه‌ها. دو عامل اول ارتباط

مستقیم و چهار عامل بعدی ارتباط ضعیفی با تشکیل اجسام ذخیره دارند. روش‌های تجربی گوناگونی برای به حداقل

رساندن تشکیل اجسام ذخیره و بهبود تاب‌خوردگی پروتئین استفاده شده است. این روش‌ها شامل رشد باکتری‌ها در دمای

پایین، انتخاب سویه‌های باکتریایی مختلف، جایگزینی اسید آمینه‌های انتخاب شده، بیان همزمان چپرون‌ها، استفاده از

¹ Phage f1 origin

تیوردوکسین باکتریایی به عنوان فیوژن و یا بیان همزمان آن با پروتئین مورد نظر، رشد و القای سلول تحت شرایط فشار اسمزی در حضور سوربیتول یا گلیسین بتائین، اضافه کردن فندهای غیرمتابولیزه شونده به محیط کشت، تغییر PH محیط کشت و در نهایت استفاده از سویه‌هایی است که دارای نقص در تیوردوکسین ردوکتاز هستند [۱۰]. مشکل عمده دیگر عدم تشکیل باندهای دی‌سولفیدی مناسب در محیط می‌شود که این عمل بستگی به طول زنجیره جانبی دومین اسید آمینه (اولین اسید آمینه پس از متیونین) دارد؛ بنابراین اسید آمینه‌هایی که دارای زنجیره جانبی کوتاه هستند مثل Gly، Ala، Pro، Ser، Thr، Val، Cys و تا حد کمتر Asp، Asn، Leu و Ile حذف متیونین را از انتهای آمینی پروتئین به کمک آنزیم متیونین آمینو پپتیداز تسهیل می‌کنند [۱۰]. یکی از راهکارهایی که برای حذف میتونین اضافی از انتهای آمینی پروتئین نو ترکیب کار گرفته شده است، بیان همزمان ژن متیونین آمینو پپتیداز در E.coli است [۹]. روش دیگر برای تولید انتهای آمینی حقیقی در *in vitro*، استفاده از اگزوپپتیداز دی‌پپتیدیل آمینو پپتیداز I^۱ است. این آنزیم دی‌پپتیدها را از انتهای آمینی برمی‌دارد، ولی توانایی حذف پیوندهای پپتیدی واجد اسیدآمینه پرولین را ندارد. دلبوگ^۲ و همکاران نوعی هورمون رشد انسانی تولید کردند که دارای توالی‌های اسید آمینه‌ای اضافی در انتهای آمینی بود که سپس با حذف این اسیدآمینه‌های اضافی با کمک آنزیم دی‌پپتیدیل آمینو پپتیداز، انتهای آمینی صحیح ایجاد شد. در این روش تعداد اسیدآمینه‌های اضافی در انتهای آمینی پروتئین نو ترکیب، باید زوج باشند. این روش تعداد اسیدآمینه‌های اضافی در انتهای آمینی پروتئین نو ترکیب، باید زوج باشند. این روش طوری طراحی شده است که برش متیونین را از انتهای آمینی پروتئین، امکان‌پذیر می‌سازد. بعلاوه دومین یا سومین اسیدآمینه در پروتئین هدف باید پرولین باشد [۱۱].

تجزیه پروتئین در فضای سیتوپلاسم E.coli نسبت به سایر قسمت‌ها بیشتر است؛ که این امر به دلیل تجمع بیشتر پروتئینها در سیتوپلاسم است. نهایتاً ایراد دیگری که بر بیان سیتوپلاسمی وارد است لزوم تخلیص پروتئین درون سلولی است [۱۰].

ترشح پروتئین نو ترکیب در باکتری E.coli

پری پلاسم E.coli مزایای فراوانی برای تجمع پروتئین هدف دارد. پری پلاسم دارای ۴ درصد از کل پروتئین‌های سلولی یا حدوداً ۱۰۰ نوع پروتئین است؛ بنابراین هدف در این مکان به خوبی تغلیظ شده و تخلیص آن نیز با سهولت بیشتری صورت می‌گیرد. محیط اکسیدکننده پری پلاسم تاب‌خوردگی مناسب پروتئین را تسهیل می‌کند. برش پپتید

¹ Exopeptidase dipeptidil aminopeptidase I
² Delboge

هدایتگر در طی عبور پروتئین از غشای سیتوپلاسمی به درون پری پلاسم، باعث تولید پروتئین با انتهای آمینی صحیح می‌گردد. تجزیه پروتئین در محیط پری پلاسم کمتر اتفاق می‌افتد [۱۲]. ترشح پروتئین به فضای پری پلاسم، تشکیل باندهای دی سولفیدی صحیح را افزایش می‌دهد. به حداقل رساندن اثرات سمی و مخرب احتمالی پروتئین نو ترکیب برای میزبان، از دیگر مزایای هدایت پروتئین نو ترکیب به فضای پری پلاسمی است. هدایت پروتئین به محیط کشت نیز به دلیل تخلیص ساده و ارزان و نیز محافظت پروتئین از پروتئولیز، بسیار مطلوب است [۱۲].

انتقال پروتئین از خلال غشای داخلی به درون پری پلاسم نیاز به توالی هدایتگر دارد. انواع متنوعی از پپتیدهای هدایتگر برای انتقال پروتئین به فضای پری پلاسم در *E. coli* مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این پپتیدهای هدایتگر، شامل توالی‌های هدایتگر پروکاریوتی، مثل *PhoA*، *OmpA*، *OmpT*، *LaB*، *OmpF*، بتا-لاکتاماز و انتروتوکسین‌های *ST-II*، *LT-A*، *LT-B* با منشأ *E. coli* و نیز پپتیدهای هدایتگر پروتئین *A* از استافیلوکوکوس اورئوس و اندونوکلئاز از باسیلوس سوبتیلیس و *PeiB* از اروینا و *RNase* موشی و پپتید هدایتگر هورمون رشد انسانی هستند [۱۳]. با این حال وجود یک پپتید هدایتگر ایمنوگلوبولین انسانی در پری پلاسم *E. coli* کاملاً موفقیت‌آمیز بوده است، ولی تولید گیرنده‌های سلول‌های *T* در پری پلاسم برخلاف شباهت‌های ساختاری بین این دو خانواده پروتئینی با مشکل مواجه بوده است؛ بنابراین علاوه بر پپتید هدایتگر خصوصیات ساختاری پروتئین نیز در ترشح پروتئین نقش دارد. راهکارهای گوناگونی که برای بهبود انتقال پروتئین به فضای پری پلاسم مورد استفاده قرار گرفته‌اند، شامل استفاده از عوامل مؤثر بر پردازش پروتئین مثل سیگنال پپتیداز *I*، استفاده از سویه‌های جهش یافته از ژن *PrIF*، بیان همزمان ژن‌های *SecE* و *prlA4* به همراه پروتئین هدف، کاهش بیان پروتئین هدف، حذف یا غیرفعال کردن ژن بتا-لاکتاماز برای جلوگیری از اشباع مسیرهای انتقال هستند [۱۰].

ترشح خارج سلولی

هدایت پروتئین به محیط کشت دارای مزایای فراوانی است که در جدول ۱-۲-۱ ارائه شده است [۱۴]. متأسفانه کوشش‌هایی که به منظور هدایت پروتئین به فضای خارج سلولی انجام شده با موفقیت‌های بسیار اندکی همراه بوده است. علت این است که عبور پروتئین از غشای سیتوپلاسمی فرآیند بسیار تمایزی است، به طوری که فقط خروج تعداد محدود و انتخاب‌شده‌ای از پروتئین‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد. تعدادی از مسیرهای بیوشیمیایی که انتقال پروتئین را از عرض غشا امکان‌پذیر می‌سازند، در گونه‌های مختلف باکتریایی شناخته شده‌اند. ولی مکانیسم‌های دقیق مولکولی آن‌ها به خوبی شناخته شده نیست. دستکاری مسیرهای انتقال به منظور تسهیل ترشح پروتئین‌ها همچنان به عنوان یک مشکل عمده

باقی مانده است و مسیرهایی که خروج اختصاصی پروتئین را امکان پذیر سازند شناخته شده نیستند [۱۵]. احتمالاً وارد شدن برخی از پروتئین های نو ترکیب به محیط پری پلاسم باعث ناپایداری غشاء خارجی و نشت نیمه اختصاصی آن به محیط خارج سلولی می شود [۱۰].

پتید هدایتگر

پتید هدایتگر نقش کلیدی در ترشح پروتئین ها و عبور آن ها از عرض غشاء در پروکاریوت ها و یوکاریوت ها دارد. پتید هدایتگر که اغلب در انتهای آمینی پروتئین های ترشحی وجود دارد، پروتئین تازه سنتز شده (پروتئینی که به طور کامل سنتز شده) را از سیتوپلاسم به مکان های انتقال در غشاء سیتوپلاسمی باکتری ها، غشاء شبکه آندوپلاسمی، غشاء درونی میتوکندری ها یا تیلاکوئیدهای کلروپلاستی یوکاریوت ها هدایت می کند. پس از وارد شدن پروتئین در غشاء پتید هدایتگر توسط آنزیم سیگنال پتیداز متصل به غشاء جدا می شود. پتید هدایتگر تاب خوردگی پروتئین را به تأخیر انداخته و آن را در یک حالت مستعد انتقال قرار می دهد [۱۶].

پتید هدایتگر دارای سه ناحیه کاملاً متمایز است:

۱- ناحیه N: انتهای آمینی با بار مثبت.

۲- ناحیه H: که ناحیه مرکزی هیدروفوب و غیرقطبی است.

۳- ناحیه C: که ناحیه بسیار قطبی است.

این نواحی در بین پتیدهای هدایتگر حفظ شده نیست ولی خصوصیات فیزیکی شیمیایی آن ها ثابت است [۱۷].

ناحیه N: مطابق مدل لوپ بار مثبت انتهای آمینی پتید هدایتگر نقش مهمی در هدف گیری پروتئین ها به سمت غشای فسفولیپیدی دارد [۱۸]. بار مثبت انتهای پتید هدایتگر توسط اسید آمینه های لیزین و آرژینین تأمین می شود. بار مثبت انتهای آمینی انتقال و پردازش را افزایش می دهد. با افزایش بار مثبت انتهای آمینی میانکنش بین پروتئین پیش ساز و SecA افزایش می یابد و نیاز به SecA برای ترانسلوکاسیون کم می شود. این امر نشان می دهد که ناحیه N در هدایت

پیش پروتئین به سمت سیستم ترانسلوکاز^۱ شرکت می کند [۱۹].

ناحیه H: این ناحیه که طول آن ۷ تا ۱۵ اسید آمینه است هسته هیدروفوبی پپتید هدایتگر را تشکیل می دهد. کارایی انتقال با افزایش طول و هیدروفوبیستی ناحیه H افزایش می یابد. اسیدآمینه های گلایسین و پرولین که شکننده هلیکس آلفا^۲ هستند، وسط این ناحیه قرار دارند و باعث تشکیل ساختار شبه سنجاق سری در این ناحیه می شوند. ساختار سنجاق سری وارد لپید دولایه ای غشاء می شود. حضور اسیدآمینه های شکننده هلیکس که باعث برش کارآمد و مؤثر پپتید هدایتگر می شوند، چندان ضروری نمی باشد [۲۰]. جهش زایی با حذف برخی اسیدآمینه ها در ناحیه هیدروفوب پپتید هدایتگر لیپوپروتئین OmpA نشان داده است که انعطاف پذیری فراوانی در این ناحیه وجود دارد. مطالعات جهش زایی بر روی یکسری پپتیدهای هدایتگر نشان داد که ظاهراً داشتن ساختار آلفا هلیکس در ناحیه هیدروفوب مهم است همچنین بررسی های بیوفیزیکی همان پپتیدی های هدایتگر جهش یافته نشان داد که احتمالاً در بخش هیدروفوب، ساختارهای آلفا هلیکس و صفحات بتا هر دو تشکیل می شوند و احتمالاً تبدیل این دو ساختار به یکدیگر نقش مهمی را عملکرد پپتید هدایتگر و ترانسلوکاسیون آن از غشا ایفا می کند [۲۰].

ناحیه C: یا مکان برش سیگنال پپتیداز، تنها قسمتی از پپتید هدایتگر است که توالی های اسیدآمینه ایی آن نسبتاً اختصاصی هستند [۲۱]. پس از ترانسلوکاسیون، پپتید هدایتگر توسط یک سیگنال پپتیداز غشایی برده شده و پروتئین بالغ به درون فضای پری پلاسمی رها می شود [۲۲]. مکان برش پپتید هدایتگر با قانون (1) Von Heijne - و (۳) یا مدل A-X-B تعریف می شود [۲۳]. حضور اسیدآمینه های کوچک و خنثی در موقعیت های (۱) - و (۳) - برای شناسایی مکان برش پپتید هدایتگر توسط سیگنال پپتیداز ضروری بوده ولی برای انتقال آن ضروری نیستند [۲۴].

جدول ۲ مقایسه مزایا و معایب

مزایا	معایب	استراتژی تولید
- تشکیل باندهای دی سولفیدی و فولدینگ مناسب پروتئین به دلیل حضور ایزومرازهای باندهای دی سولفیدی - فرار از پروتئولیز پروتئین - تولید پروتئین با انتهای آمینی حقیقی - کاهش چشمگیر آلاینده ها	- ترشح به محیط کشت معمولاً امکان پذیر نیست - رقیق شدن محصولات	ترشح به فضای خارج سلولی

¹ Translocase

² Helix breaking

<ul style="list-style-type: none"> - تخلیص آسان - عدم نیاز به شکافت سلولی برای دستیابی به پروتئین بیان شده 		
<ul style="list-style-type: none"> - تشکیل باندهای دی سولفیدی - تولید پروتئین با انتهای آمینی حقیقی - کاهش چشمگیر آلابندها 	<ul style="list-style-type: none"> - ترشح به پری پلاسم همیشه امکان پذیر نیست. - هیچ روش Larg Scale برای رها شدن انتخابی پروتئین های پری پلاسمی در دسترس نیست. - پری پلاسم باعث پروتئولیز می گردد. 	تولید پری پلاسمی
<ul style="list-style-type: none"> - حفاظت پروتئین از پروتئازها - Inclusion body برای جداسازی ساده تر است. - پروتئین غیرفعال بوده و به سلول آسیب نمی رساند. - تولید انبوه اغلب به دست می آید 	<ul style="list-style-type: none"> - انتهای آمینی صحیح به دست نمی آید. - Solubilization و فولدینگ در I vitro برای فعالیت لازم است پرخرج بوده و بازده کمی دارد. 	تولید درون سلولی به شکل Inclusion body
<ul style="list-style-type: none"> - نیاز به Solubilization و refolding نیست. 	<ul style="list-style-type: none"> - تولید انبوه درون سلولی برای سلول مضر است. - تخلیص پروتئین تولید شده مشکل است. - پروتئولیز پروتئین اغلب وجود دارد. - تشکیل باندهای دی سولفیدی اغلب ممکن نیست. - ایجاد انتهای آمینی غیر صحیح 	تولید درون سلولی به شکل محلول

سرطان پستان

از میان سرطان ها شیوع سرطان پستان در اکثر کشورهای پیشرفته در حال توسعه می باشد. سرطان پستان شایع ترین علت مرگ زنان در محدوده سنی ۳۵ تا ۵۵ سالگی را تشکیل می دهد. به دلیل مرگ آور بودن و میزان ابتلا زیاد، مبارزه علیه این سرطان با اهمیت زیادی دنبال می شود [۲۵].

سلول های سرطانی

در سلول های طبیعی رشد سلولی تحت کنترل است به این ترتیب که سلول های بدن همواره در حال رشد هستند و هنگامی که به علت فرسودگی از بین رفتند، یک سلول همانند آن ساخته می شود؛ بنابراین تعداد سلول های جدید تقریباً

مشابه با تعداد سلول‌هایی که از بین می‌رود هستند. ولی در سلول‌های سرطانی مهار تقسیم سلولی از کنترل خارج شده و مدام تکثیر می‌شوند و آن قدر تعدادشان زیاد می‌شود که سلامت بدن را به مخاطره می‌اندازد.

به طور کلی سلول‌های سرطانی از سه نظر با بافت سالم متفاوتند:

۱- اغلب آن‌ها نامیرا هستند یا حداقل از قابلیت تقسیم بسیار بیشتر نسبت به بافت‌های سالم برخوردارند.

۲- سیکل سلولی کوتاه‌تری نسبت به بافت‌های سالم مشابه دارد در نتیجه سریع‌تر رشد می‌کنند.

۳- اندرکنش‌های طبیعی سلول به سلول را که منجر به جلوگیری از تهاجم، متاستاز و رشد در یک محیط خارجی می‌شود را نشان نمی‌دهند.

سرطان‌زایی یک فرآیند چند مرحله‌ای است. رفتارهای غیر متعادل تومورهای بدخیم، بازتابی از اختلال‌های متعدد فیزیولوژی سلولی است. بررسی ژنتیکی سلول‌ها از تومورهای توپر نشان می‌دهد که تغییرها، جهش‌ها و یا حذف‌هایی در ژن‌های علامت ده و مهارکننده اتفاق افتاده است.

سلول‌های سرطانی پروتئین‌هایی را بروز می‌دهند که یا در سلول‌های سالم وجود ندارند یا به میزان ناچیزی وجود دارند. تومورها از بافت‌های خودی منشأ می‌گیرند اما طی روند بدخیم شدن احتمال دارد مولکول‌هایی را در سطح خود ایجاد کنند که برای سیستم فرد بیگانه باشد. چنین مولکول‌هایی آنتی‌ژن تومور نام دارند. بسیاری از آنتی‌ژن‌ها مولکول‌هایی هستند که مورد شناسایی لنفوسیت‌های T قرار می‌گیرند و قبل از این که به صورت تومور درآیند توسط سیستم ایمنی بدن سرکوب می‌شوند. البته تعدادی از آن‌ها نیز قابل شناسایی برای سیستم ایمنی نیستند.

اغلب سرطان‌ها به سه دسته عمده تقسیم می‌شوند:

کارسینوم: شامل سرطان‌هایی می‌شوند که از سلول‌های سازنده پوست تشکیل شده‌اند (مثل سرطان پوست) و یا لایه داخلی اعضا را می‌پوشانند (مثل سرطان ریه) و یا سازنده غدد هستند (مثل سرطان سینه).

سارکوم: این دسته سرطان‌هایی هستند که از بافت همبند مثل غضروف، استخوان و ماهیچه منشأ می‌گیرند. از این رو سرطان استخوان یا سرطان ماهیچه را در هر نقطه از بدن سارکوم می‌گویند.

لوسمی و لنفومها: شامل سرطان‌هایی است که از سلول‌های تشکیل دهنده خون و سلول‌های ایمنی منشاء می‌گیرند. یکی از مهم‌ترین سرطان‌های دسته کارسینوم سرطان پستان است که در ادامه مورد بررسی قرار می‌گیرد [۲۶].

هدف درمانی

اخیراً روش‌های درمانی خاصی برای سرطان مطرح شده که تحت عنوان درمان هدفمند^۱ نام‌گذاری شده است. هدف این درمان‌ها رساندن دارو با تکنیک‌های مختلف به موقعیت تومور یا سلول‌های سرطانی است. به این ترتیب میزان داروی مصرفی کاهش می‌یابد، آسیب بافت‌های سالم کم شده و بازده درمانی بالاتر رود. ایمونوتراپی از دسته درمان‌های هدفمند است که با استفاده از آنتی‌بادی‌ها صورت می‌گیرد. در ایمونوتراپی، یک آنتی‌ژن مناسب انتخاب می‌شود، یک آنتی‌بادی بر علیه آن تهیه می‌شود. آنتی‌بادی به صورت وریدی به بیمار تزریق شده و با واکنش آنتی‌ژن - آنتی‌کور به سطح سلول‌های سرطانی متصل می‌شود. یکی از مهم‌ترین مشکلات در درمان تومورهای سرطان پستان درمان ناموفق متاستازهاست. تومور اصلی با جراحی و رادیوتراپی به خوبی درمان می‌شود. این در حالی است که متاستازها یا آشکار نمی‌شوند و یا قابل درمان با جراحی یا رادیوتراپی نیستند. در حال حاضر شیمی درمانی برای درمان متاستازها به کار برده می‌شود ولی خاصیت سیستمیک و اثر سمیت بالای آن بافت‌های سالم را نیز درگیر می‌کند. ایمونوتراپی با آنتی‌بادی اختصاصی مثل هرسپتین در درمان متاستازها بسیار مؤثر است [۲۷].

روش‌های درمانی سرطان پستان

تشخیص و شروع به درمان سریع در مراحل اولیه این بیماری، از عوامل مؤثر در بهبود بیماران مبتلا به سرطان پستان است. پیشرفت روزافزونی در طی سال‌های گذشته در درمان سرطان‌ها از جمله سرطان پستان انجام گرفته است. در حال حاضر درمان‌هایی که برای سرطان پستان مطرح است بسته به شدت و درجه بدخیمی شامل جراحی قسمت یا تمام پستان، شیمی درمانی، پرتودرمانی^۲، ایمونوتراپی و درمان‌های جدید ژن درمانی، نوردرمانی و رادیو ایمونوتراپی است. معمولاً ۵۰ درصد بیماران با درمان مرکب که ترکیبی از جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی است معالجه می‌شوند. درمان موفق زمانی است که حتی یک سلول سرطانی بعد از درمان هم باقی نماند، چون همین تک سلول می‌تواند دوباره کل مجموعه را بازسازی و احیا نماید. درمان‌های معمول در ایران که برای سرطان پستان استفاده می‌شود شامل جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی (رادیوتراپی) و ایمونوتراپی است که مزایا و معایب هریک به تفکیک بررسی می‌شود [۲۸].

¹ Targeted Therapy

² Radiotherapy

شیمی درمانی

داروهای شیمیایی که به منظور درمان سرطان به کار برده می‌شوند بر روی تقسیم سلول‌های سرطانی اثر می‌گذارند. داروهای شیمی درمانی براساس مکانیسم عمل و یا خواص شیمیایی به پنج دسته طبقه‌بندی می‌شوند: عوامل آلکیله‌کننده، آنتی‌متابولیت‌ها، فرآورده‌های طبیعی، هورمون‌ها و آنتاگونیست آن‌ها و داروهای متفرقه. از مشکلات شیمی‌درمانی در درمان سرطان، پایین بودن ضریب درمانی داروها، پیدایش مقاومت اولیه و یا ثانویه در برابر داروها است. از طرفی اکثر داروهای شیمی‌درمانی که برای درمان سرطان‌ها استفاده می‌شوند، سیستمیک هستند یعنی سلول‌های بافت‌های سالم را نیز درگیر کرده و قابلیت انتخاب رده سلولی خاصی را ندارند. این باعث تحلیل شدید بدن، ضعف و کاهش مقاومت بدن در مقابل بیماری‌ها می‌شود. درمان قطعی سرطان توسط داروهای شیمی‌درمانی در ۸۰ درصد موارد امکان‌پذیر نیست ولی علائم بیماری را کاهش داده و طول زندگی بیماران را تا حدی افزایش می‌دهند. از جمله سرطان‌هایی که به شیمی‌درمانی پاسخ می‌دهند وی درمان قطعی حاصل نمی‌شود می‌توان به سرطان سینه، مثانه، پروستات، ریه، سارکوما بافت نرم، لوسمی مزمن و برخی از لنفوم‌ها نام برد. بعضی از سرطان‌هایی که به شیمی‌درمانی پاسخ نمی‌دهند شامل سرطان‌های گوارش، کبد، کلیه و پانکراس می‌باشند [۲۹].

پرتو درمانی

هدف از پرتودرمانی بهبود کامل بیماری و یا کاهش علائم و عوارض آن است که معمولاً پس از عمل جراحی برای از بین بردن باقیمانده توده توموری و کاهش احتمال عود مجدد و قبل از عمل جراحی با هدف کاهش حجم تومور و خطرات جراحی استفاده می‌شود. تجویز هم‌زمان شیمی‌درمانی با پرتودرمانی سبب بالا بردن بهره‌دهی درمانی آن می‌شود. اشعه تابیده شده در پرتو درمانی با ایجاد رادیکال‌های آزاد و نیز صدمه مستقیم به DNA سلول‌ها، می‌تواند آن‌ها را به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده سلول^۱ سوق دهد با توجه به اینکه سلول‌های سرطانی رشد و تقسیم زیادی دارند، نسبت به سلول‌های سالم حساسیت بیشتری به اشعه نشان می‌دهند و در اثر تابش اشعه از بین می‌روند. ولی به هر حال سایر سلول‌های سالم نیز که در حال تقسیم هستند اگر در معرض اشعه قرار بگیرند آسیب می‌بینند. در پرتودرمانی پوست و یا ارگان‌های سر راه تومور یکی از مشکلات موجود برای بالا بردن دوز درمانی است و این مشکل وقتی حادتر می‌شود که ارگان‌های حساس به اشعه در معرض قرار بگیرند. پرتودرمانی بیشتر برای از بین بردن تومور اصلی و یا باقیمانده آن به کار می‌رود و برای درمان متاستازهای کوچک و پراکنده در بدن کارایی ندارد [۳۰].

¹ Apoptosis

ایمونوتراپی

یکی از روش‌های مهم درمان سرطان، استفاده از فرآورده‌هایی است که به طور مستقیم یا غیرمستقیم با دستگاه ایمنی سر و کار دارند. این روش ایمونوتراپی نام دارد. آنتی‌بادی مونوکلونال رایج‌ترین داروی درمان سرطان به روش ایمونوتراپی محسوب می‌شود. درمان ایمنی¹ براساس وجود آنتی‌ژن تومور و آنتی‌کور بر علیه آن استوار است. در این روش آنتی‌ژن‌هایی که خاص سلول‌های سرطانی هستند انتخاب می‌شوند و آنتی‌کور بر ضد آن ساخته می‌شود. با کمک آنتی‌کور روند رشد سلول متوقف شده و سلول از حالت سرطانی بودن خارج می‌شود. ایمونوتراپی مانند شیمی درمانی به طور سیستمیک تزریق می‌شود اما برخلاف آن، تنها سلول‌های بدخیم را مورد حمله قرار داده و بر سلول‌های سالم تأثیری نداشته و بسیار اختصاصی‌تر از شیمی‌درمانی و پرتودرمانی عمل می‌کند. برای کشتن تعداد مشخصی سلول توموری مقدار مشخصی آنتی‌بادی لازم است. اهمیت این روش در آن است که می‌تواند همه سلول‌های توموری موجود را بکشد، بنابراین در بهبود نهایی مؤثر است. از ایمونوتراپی بیشتر به همراه شیمی‌درمانی برای از بین بردن متاستازهای کوچک و احتمالی بعد از جراحی یا از بین بردن تومور اصلی استفاده می‌شود. در این روش دستگاه ایمنی بیمار مبتلا به سرطان، نقش فعالی ندارد و به همین دلیل روش فوق ایمونوتراپی غیرفعال نام دارد. ایمونوتراپی علی‌رغم مزایای فراوان آن، روشی گران و پیچیده بوده و کاربرد آن به علت اشکالاتی نظیر تعیین دقیق میزان دوز مصرفی در بیماران مختلف نیاز به دقت فراوان و نیروی متخصص دارد. در این روش نیاز به تزریق مقدار زیادی آنتی‌بادی است که ممکن است با واکنش سیستم مواجهه شد. البته در آنتی‌بادی‌های جدید با انسانی کردن آن تا حد زیادی این مشکل را تقلیل داده‌اند. تا به حال آنتی‌ژن‌های زیادی که توسط سلول‌های سرطانی بیان می‌شوند شناخته شده که از مهم‌ترین آن‌ها آنتی‌ژن HER2 است.

آنتی‌بادی‌ها

آنتی‌بادی‌ها پروتئین‌های ایمونوگلوبولینی هستند که از لنفوسیت‌های B فعال شده ترشح می‌شوند. این مولکول‌های پروتئینی از نظر اندازه بزرگ بوده و برحسب کلاس آنتی‌بادی می‌تواند بین ۱۵۰ تا ۹۵۰ کیلو دالتون وزن داشته باشند. آنتی‌بادی‌ها از نظر ساختاری متشکل از دو زنجیره سنگین^۲ و دو زنجیره سبک^۳ می‌باشند که این ۴ زنجیره توسط پیوندهای کووالان و غیرکووالان به هم متصل هستند. هر زنجیره به سبک حاوی ۲۲۰ اسید آمینه و وزن مولکولی حدوداً ۲۵ کیلو دالتون می‌باشد در حالی که زنجیره سنگین با وزن مولکولی ۷۰-۵۰ کیلو دالتون حاوی ۴۲۰ اسید آمینه می‌باشد.

¹ Immunotherapy

² Heavy Chain (VH)

³ Light Chain (VL)

زنجیره‌های سبک و نیمی از زنجیره‌های سنگین در قسمت N-ترمینال، ایجاد دو قطعه مشابه می‌کنند (Fab)¹ که حاوی محل اتصال به آنتی‌ژن می‌باشند. از دو نیم دیگر زنجیره‌های سنگین یک قطعه FC² ایجاد می‌شود که مسئول اعمال بیولوژیک آنتی‌بادی می‌باشد. آنتی‌بادی‌ها براساس اختلاف در زنجیره‌های سنگین به ۵ کلاس IgE, IgA, IgM, IgG و IgD تقسیم می‌شوند. زنجیره سبک این مولکول‌ها نیز متفاوت بوده و از دو نوع کاپا و لامبدا تشکیل شده است. از نظر منشاء، آنتی‌بادی‌های ضد یک آنتی‌ژن خاص را می‌توان در دو دسته پلی‌کلونال و منوکلونال جای داد. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال (آنتی‌سرم‌ها از این دسته هستند) از کلون‌های مختلف لنفوسیت‌های B فعال شده ترشح می‌شوند و شامل مجموعه‌ای از آنتی‌بادی‌ها با ویژگی و خصوصیات متفاوت و علیه اپی‌توپ‌های مختلف یک آنتی‌ژن هستند. این آنتی‌بادی‌ها از نظر شاخص آنتی‌ژنیک، میل ترکیبی، ویژگی تیتراژ، کلاس و زیرکلاس (ایزوتیپ)³ ایمونوگلوبولین ناهمگن بوده و غالباً نسبت به سایر آنتی‌ژن‌ها واکنش متقاطع دارند. برخلاف آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال، همگن بودن، اختصاصی بودن و قدرت تولید نامحدود سه ویژگی اساسی آنتی‌بادی‌های منوکلونال است که آن‌ها را از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال متمایز می‌کند. این آنتی‌بادی‌ها از آن جهت منوکلونال نامیده می‌شوند که توسط یک کلون از سلول‌های تولید کننده آنتی‌بادی ساخته می‌شوند؛ بنابراین آنتی‌بادی‌های منوکلونال از نظر کلاس ایمونوگلوبولین، آلوتایپ، ایدئوتایپ، منطقه‌ی متغیر، ویژگی و میل ترکیبی برای آنتی‌ژن، همگن هستند. این آنتی‌بادی‌ها با میل ترکیبی زیاد علیه یک جایگاه آنتی‌ژنیک ایجاد می‌شوند و فقط اختصاصی آن ناحیه عمل می‌کنند. در حقیقت کلون تولیدکننده آنتی‌بادی منوکلونال از ادغام دو سلول مختلف تشکیل شده است و به بیانی دیگر یک سلول دو رگه (هیبرید) است. در نتیجه از واژه‌ی هیبریدوما جهت اطلاق این سلول استفاده می‌شود [۳۱].

تاریخچه آنتی‌بادی‌ها

تحقیقات بر روی مولکول آنتی‌بادی از سال ۱۹۳۰ توسط Landsteiner آغاز شد که در نهایت Porter و Edelman در سال ۱۹۷۲ جایزه نوبل پزشکی را به خود اختصاص دادند.

در سال ۱۹۷۵ با ابداع تکنولوژی هیبریدوما و به دست آوردن توانایی عرضه آنتی‌بادی منوکلونال تحول شگرفی در علوم پزشکی و داروئی ایجاد شد. در دهه ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ با پیشرفت‌های حاصله در مهندسی ژنتیک نمایش فزاینده‌ی عرصه را برای یافتن آنتی‌بادی‌های منوکلونال هموار نمود.

¹ Fragment of antigen binding

² Fragment Crystalline

³ Isotype

این تکنولوژی امکان ایجاد آنتی بادیهای با اختصاصیت بالا علیه اپیتوپهای خاص یک آنتی ژن را فراهم نموده است. اساس این روش ادغام سلولهای تولید کننده آنتی بادی بر گرفته شده از حیوان ایمن با سلولهای نامیرای میلومایی می باشد. سلولهای حاصل پس از کشت در محیط انتخابی مناسب، غربالگری شده و کلونهای دارای تمایل مناسب برای آنتی ژن انتخاب می شوند. آنتی بادیهای منوکلونال موشی در ابتدا توجه زیادی را به خود جلب کردند بصورتی که اولین آنتی بادی درمانی تحت عنوان OKT3 در سال ۱۹۸۶ برای درمان رد پیوند مورد تایید قرار گرفت اما عملاً بکارگیری این آنتی بادی با مشکلاتی همراه بود. در واقع تزریق آنتی بادی های منوکلونال موشی به انسان موجب برانگیخته شدن پاسخ ایمنی موسوم به HAMA می شود. از طرفی اندازه بزرگ این آنتی بادیها منجر به عدم نفوذ مناسب آن به بافت هدف می شود.

بدین ترتیب استفاده بهینه از آنتی بادیهای منو کلونال مستلزم ایجاد تغییرات ساختاری و عملکردی در مولکول آنتی بادی می باشد.

انواع آنتی بادی های نو ترکیب

با پیشرفت های صورت گرفته در مهندسی ژنتیک تلاشهایی در جهت غلبه بر مشکلات آنتی بادیهای منوکلونال موشی صورت گرفت. بدین ترتیب کلاس جدیدی از آنتی بادیها تحت عنوان آنتی بادیهای نو ترکیب بوجود آمدند. بطور کلی اهداف مهندسی آنتی بادی را می توان تولید آنتی بادیهایی با خاصیت ایمنی زایی کمتر، ایجاد پایداری، افزایش قدرت اتصال به آنتی ژن، کاهش اندازه آنتی بادی و ایجاد آنتی بادیهایی با عملکردهای جدید دانست.

آنتی بادیهای کایمریک انسانی _ موشی

ساخت آنتی بادیهای کایمریک اولین قدم در جهت حذف پاسخ ایمنی علیه آنتی بادیهای منوکلونال به شمار می رود این آنتی بادی ها ۷۰-۶۰ درصد انسانی بوده و از طریق اتصال نواحی VH و VL آنتی بادی منوکلونال به نواحی ثابت آنتی بادی انسانی ایجاد می شوند. با وجود این گاهی بروز پاسخ ایمنی موسوم به HACA¹ علیه نواحی متغیر موشی دیده شده است [۳۲]. مزیت دیگر کایمر کردن آنتی بادی، افزایش طول عمر آن در جریان خون می باشد. در آنتی بادیهای کایمر انسانی _ موشی قسمت Fc² از IgG³ انسانی گرفته شده است که می تواند آنتی بادی کایمر را همچون IgG انسانی به

¹ Human Anti Chimeric Antibody

² Fragment crystalline

³ Immunoglobulin class G3

رسپتور ویژه FC بر سطح سلولهای اندوتلیال (FcRn) متصل کرده، در نتیجه آنتی بادی اندوستیوز شده و بجای تخریب داخلی سلولی دائماً به صورت یک جریان چرخه ای به خون بر می گردد. در صورتی که آنتی بادی موشی قابلیت اتصال به FcRn را ندارد و با ورود به مسیرهای تخریب داخل سلولی مرتباً از سیر کولاسیون خارج می شود [۳۳].

آنتی بادیهای انسانی شده

در اوایل دهه ۱۹۹۰ آنتی بادیهای انسانی شده از طریق انتقال نواحی بسیار متغیر (CDR) آنتی بادیهای مونوکلونال موشی به نواحی داربستی آنتی بادی انسانی ساخته شدند. در واقع ۹۰-۹۵ درصد این آنتی بادیهای انسانی می باشد. این تکنولوژی اثر بارزی بر کاهش ایمنی زایی، افزایش نیمه عمر آنتی بادی در جریان خون و حفظ کلیه فعالیت‌های بیولوژیک آن داشته است [۳۲].

با وجود این برخی مطالعات تاثیر پذیری نواحی CDR از برخی اسید آمینه های کلیدی در نواحی داربستی را نشان داده اند. بنابراین خارج ساختن آنتی بادی از قالب خود می تواند منجر به کاهش تمایل آنتی بادی برای آنتی ژن شود. امروزه از مدل سازی های کامپیوتری برای رفع این مشکل استفاده می شود. بدین ترتیب ابتدا توالی نواحی VL و VH آنتی بادی مونوکلونال تعیین و ساختار سه بعدی نواحی CDR و برهمکنش آن با مناطق داربستی مورد بررسی قرار می گیرد. پس از تعیین موقعیت اسید آمینه های کلیدی، مناطق مناسب انتخاب و انتقال داده می شوند. استفاده از آنتی بادی‌های انسانی شده گسترش زیادی داشته است، بصورتی که بیش از نیمی از آنتی بادی‌های نو ترکیب تأیید شده بوسیله FDA را آنتی بادی‌های انسانی شده تشکیل می‌دهند [۳۴].

مهندسی قطعات آنتی بادی

برای بسیاری از کاربردها، تنها بخش متصل شونده به آنتی ژن از مولکول آنتی بادی مورد نیاز بوده و وجود نواحی ثابت غیر ضروری و حتی مضر می باشد. بنابراین تلاشهایی در جهت هر چه کوچکتر کردن مولکول آنتی بادی صورت گرفته است. در این راستا ابداع تکنولوژی نمایش فازی گام مهمی در تولید قطعات آنتی بادی بود. ایجاد پیوند فیزیکی بین فنوتیپ و ژنوتیپ مهمترین خصوصیت این تکنولوژی می باشد. با استفاده از این تکنیک می توان کتابخانه های متنوع ژنی را تبدیل به مجموعه‌ای از پروتئین های نمایش داده شده بر سطح فاز نمود که در مراحل بعد به منظور یافتن پروتئین با ویژگی مطلوب تحت فرایند غربالگری قرار می گیرند [۳۵].

کوچکترین نوع قطعات آنتی بادی، تحت عنوان Fv از قرار گرفتن VL و VH در کنار هم بوجود می آید. از آنجاکه

برهمکنش هیدروفوب بین این دو دومن قوی نیست، ایجاد اتصالات کووالان برای ساخت مولکول پایدار لازم است. معمولترین طرح استفاده از یک لینکر قابل ارتجاع به طول ۱۵-۲۰ اسید آمینه است که دو دومن فوق را بهم متصل می کند. قطعه حاصل با وزن مولکولی KD25، (FV)، تک زنجیره ای یا (scFv¹) گفته می شود. در روش دیگر اتصال دودومن از طریق ایجاد یک باند دی سولفیدی صورت گرفته و فرم حاصل (dsFv) نامیده می شود که نسبت به (scFv) در برابر حرارت پایدارتر است [۳۶].

شکل دیگر قطعات آنتی بادی، fab می باشد که از یک زنجیره سبک کامل به همراه دومن CH₁ و VH زنجیره سنگین تشکیل شده است. اگر چه fab با وزن مولکولی ۵۰KD بزرگتر از scFv می باشد اما این مولکول بدلیل دارا بودن اتصالات کووالان طبیعی از پایداری بیشتری برخوردار است. از دیگر قطعات آنتی بادی می توان به مینی بادی اشاره نمود که در آن دو قطعه fab یا scFv به یک دومن CH-3 متصل شده اند [۳۲].

آنتی بادی نو ترکیب چند ظرفیتی

آنتی بادیهای کامل مولکولهایی چند ظرفیتی هستند و این مساله موجب افزایش تمایل کلی (avidity) آنها برای آنتی ژن می شود. در طراحی آنتی بادیهای چند ظرفیتی، قابلیت ارتجاع جایگاههای متصل شونده به آنتی ژن اهمیت دارد. در مورد آنتی بادیهای ویژه مارکرهای سرطانی اگر نحوه مهندسی بصورتی باشد که ساختار ارتجاعي تر بوده و قابلیت اتصال متقاطع رسپتورهای مجاور هم را داشته باشد، اثرات درمانی بهتری ایجاد خواهد شد. اخیرا همودیمرهایی از fab ساخته شده است که با رسپتورهای مجاور بر سطح یک سلول اتصال متقاطع داشته و مسیر انتقال پیام داخل سلولی و آپوپتوز را فعال نموده است [۳۷].

در مطالعات هدف گیری سرطان با استفاده از آنتی بادیها، مولکولهای کوچک مثل scFv سریعا از خون پاکسازی می شوند در حالی که آنتی بادیهای کامل نیز بزرگتر از حدی هستند که نفوذ موثر به تومور داشته باشند. براین اساس مولتی مرهایی با وزن ۶۰ الی ۱۲۰ کیلودالتون مولکولهایی ایده آل برای هدف گیری تومور به حساب می آیند [۳۸].

آنتی بادی نو ترکیب با ویژگی دو گانه یا چند گانه

اتصال دو یا چند جایگاه اتصالی به آنتی ژنهای متفاوت امکان اتصال متقاطع ایبی تویهای گوناگون را فراهم می آورد. مهمترین کاربرد این آنتی بادیها فرخوانی پاسخ ایمنی به محل تومور می باشد. بعنوان مثال ساخت آنتی بادیهایی با دو

¹ Single chain variable fragment

ویژگی $^{1}bsAb$ که از یک سو به مارکرهای توموری سطح سلول و از سوی دیگر به زنجیره CD3 در سطح سلولهای T متصل می شود، می تواند موجب القای آبشار کمپلمان، فاگوسیتوز و هدایت کشندگی سلول هدف توسط سلولهای T سیتوتوکسیک شود. پر ابهت ترین ویژگی این کلاس از آنتی بادی ها علاوه بر عدم نیاز به حضور مولکول های کمک تحریک کننده و افکتورها، داشتن حداکثر فعالیت ضد توموری با کمترین غلظت مورد نیاز است [۳۹].

یکی از راهکارهایی که در گذشته برای ساخت bsAb مورد استفاده قرار گرفت ادغام دو ردهی سلولی هیبریدوما با هم و انتخاب ردهی سلولی quadroma در بین سلول های حاصل است اما انجام این تکنیک بسیار وقت گیر و گران است. امروزه ابتدا قطعات آنتی بادی دارای تمایل مناسب از کتابخانه های ژنی جدا سازی شده، سپس اتصال قطعات مورد نظر در سطح ژنی انجام می شود.

آنتی بادی های دو نقشی (Bi-functional)

در این استراتژی از آنتی بادی اختصاصی تومور برای هدایت یک جزء عملکردی ثانویه به بافت هدف استفاده می شود. بعنوان مثال با اتصال آنتی بادی به سایتوکینها از جمله، IL-2، GM-CSF، IL-12 این عوامل در محدوده تومور متمرکز شده و مستقیم اثر کشندگی تومور توسط آنتی بادی و یا پاسخ ایمنی را افزایش می دهد [۴۰].

روش دیگر، اتصال آنتی بادی به سوپر آنتی ژنها است. سموم باکتری گرم مثبت از این دسته می باشند. مشخص شده است که این آنتی ژنها قادر به فعال سازی سلولهای T سیتوتوکسیک و ترشح سایتوکینها هستند [۴۱]. همچنین مولکول آنتی بادی می تواند برای حمل سایر مولکولها مانند داروهای رادیوایزوتوپها، لیپوزولها، سموم و پپتیدها، پروتئین هایی مثل آنزیمها و یا پیش داروها نیز مورد استفاده قرار گیرد.

آنتی بادی های تک دومنی

کوچک نمودن هر چه بیشتر قطعات متصل شونده به آنتی ژن و ساخت آنتی بادی هایی با یک تک دومن منفرد همواره از اهداف مهندسی آنتی بادی بوده است. با این حال استفاده از این آنتی بادیها با محدودیت هایی همراه است. از آنجا که خاصیت اتصال به آنتی ژن و بلوغ میل پیوندی در شرایط *in vivo* با حضور هر دو قطعه VL و VH صورت می پذیرد بنابراین قطعات VH به تنهایی از تمایل و اختصاصیت کمتری برای آنتی ژن برخوردار هستند. از طرفی عدم وجود، VL موجب در معرض قرار گرفتن نواحی آب گریز VH و در نتیجه عدم حلالیت آن می شود [۴۲].

¹ Bi-specific antibody

بنابراین استفاده عملی از این قطعات منوط به بکارگیری روشهای مهندسی پروتئین در جهت افزایش تمایل و حلالیت آنها خواهد بود.

آنتی بادی های زنجیره سنگین در خانواده شترها

در سال ۱۹۹۳ یک مشاهده اتفاقی توسط پروفیسور ریموند هامرز منجر به کشف مقادیر زیادی از IgG2 و IgG3 در سرم شترهای یک کوهانه و لاما شد که فاقد زنجیره سبک بود. به این ترتیب این آنتی بادی زنجیره سنگین یا HcAb¹ بدلیل غیاب دومین CH₁ وزن مولکولی کمتری نسبت به آنتی بادهای معمولی داشته و اتصال به آنتی ژن در آنها تنها از طریق یک دومین VH منفرد صورت می گیرد. این ناحیه VHH یا نانوبادی نامیده می شود تا از VH آنتی بادهای معمولی متمایز گردد [۴۳]. بنابراین VHH با وزن مولکولی ۱۲-۱۵ کوچکترین قطعه آنتی بادی متصل شونده به آنتی ژن است که از یک ایمنوگلوبولین عملکردی مشتق شده است. نانوبادی ها به واسطه جابجایی ۵ اسید آمینه که در دومین VH آنتی بادی های کلاسیک در مهره داران بسیار حفاظت شده میباشد و در واکنش های هیدروفوب با دومین های VL دخالت دارد. متمایز می شوند. این تک دومین مزایای زیادی در بیوتکنولوژی دارد. آنها به خوبی در میکروارگانیزم ها بیان شده و پایداری و حلالیت بالایی دارند [۴۴].

مطالعات نشان دهنده وجود تفاوت های ساختاری بین VH و VHH می باشد. گرچه در VHH نیز سه ناحیه CDR وجود دارد اما ناحیه CDR₃ در آن طویل تر و متوسط تعداد اسید آمینه های آن ۱۸ عدد در مقایسه با ۱۴ عدد در انسان و ۱۱ عدد در موش میباشد [۴۴]. به نظر می رسد این افزایش طول تا حدی منجر به اتصال بهتر به آنتی ژن شده و عدم وجود VL را جبران نماید. از طرفی وجود اسید آمینه های آب دوست در ناحیه CDR₃ و نیز در نواحی داربستی VHH موجب حلالیت زیاد این قطعه می شود. همچنین علاوه بر باند دی سولفیدی داخل دومینی نانوبادی ها دارای یک باند دی سولفیدی اضافه تر در ناحیه CDR₁ یا FR2 میباشد. در مطالعات کریستالوگرافی نانوبادی از ۹ رشته β که در دو صفحه قرار دارند و دو صفحه با پیوندهای دی سولفیدی در مقابل هم مستحکم شده است تشکیل شده است. به دلیل ماهیت تک دومینی، نانوبادی ها مزایای زیادی برای مصارف بیوتکنولوژی دارند.

مزایای نانوبادی نسبت به سایر آنتی بادهای نو ترکیب

(۱) سهولت تولید

¹ Heavy Chain Antibody

اندازه کوچک و طبیعت تک زنجیره ای VHH موجب سهولت کلون سازی و ایجاد کتابخانه آنتی بادی، غربالگری و انتخاب قطعات با تمایل مناسب برای آنتی ژن می شود. از طرفی بر خلاف قطعات Fab و scFv که تولید آنها در میکروارگانیسم ها اغلب منجر به تجمع ذرات نامحلول و غیرفعال می شود، VHH را می توان براحتی در E.coli تولید و تخلیص نمود [45]. همچنین سایز کوچک ژنی (۳۵۰-۳۸۰) و ماهیت مونومری مزیتی به شمار می آید تا بتوان به راحتی آنها را با ملکول های دیگر به صورت ژنتیکی یا شیمیایی متصل کرد. نیمه عمر کوتاه و پاک شدن سریع در خون ممکن است در مصارف درمانی باعث محدودیت در اثر بخشی نانوبادی ها شود که برای حل این مشکل میتوان به راحتی در شکل های دو نقشی با هدف قرار دادن پروتئین های سرم مثل آلبومین یا ایمنوگلوبولین ها نیمه عمر آنها را افزایش داد [46]. طراحی مولکول های مولتی مر و یا مهندسی نانوبادی ها با اضافه کردن قطعه FC با افزایش دادن سایز و واکنش با گیرنده های FC یکی دیگر از روش های افزایش نیمه عمر نانوبادی در سرم میباشد [47].

۲) حلالیت و پایداری زیاد

وجود اسید آمینه های آب دوست و عدم حضور قطعات اضافی مانند لینکرها، موجب حلالیت زیاد VHH و عدم تجمع آن می شود [48]. یک خصوصیت قابل توجه VHH پایداری ساختاری آن می باشد. نشان داده شده است که قطعات VHH پس از یک هفته انکوباسیون در 37°C ، ۸۰ درصد فعالیت خود را حفظ می نمایند. بعلاوه این آنتی بادیها قادرند خاصیت اتصالی خود را پس از انکوباسیون طولانی مدت در دمای 90°C به سرعت بدست آورند [49].

VHH از نظر ساختاری بسیار محکم است. بصورتی که دناتوراسیون در حضور عوامل chaotropic مانند اوره معمولاً اتفاق نمی افتد. حتی VHH دناتوره شده با گوانیدیم هیدروکلراید به سرعت پس از دیالیز به فرم اولیه خود بر می گردد [42].

VHH ها قابلیت اتصال به سطوح بیوسنسوری را به صورت عملکردی دارا می باشند و این سطح رامی توان بارها با اسید و باز تیمار کرد. نتیجه این یافته ها پتانسیل VHH را بعنوان یک جاذب ایمنی^۱ و یا یک جزء ساختاری بیوسنسورها تأیید می کند [45].

۳) ویژگی نسبت به آنتی ژن و تمایل بالا

¹ Immunosorbent

تمایل VHH های جداسازی شده از کتابخانه های ایمن در حد نانومولار و مشابه منومرهای جداسازی شده از آنتی بادیهای منوکلونال می باشد. اگر چه بایندهای خیلی ویژه برای برخی هاپتن ها مانند فنیل اکسازولون از کتابخانه های سنتتیک جدا شده اند اما افینیتی در VHH جدا شده از کتابخانه ایمن ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بهتر از VH های انسانی شتری شده علیه همان مدل آنتی ژن است [۵۰].

۴) شناسایی اپی توپهای منحصر بفرد فضایی

ناحیه متصل شونده به آنتی ژن در آنتی بادیهای معمولی بسته به نوع آنتی ژن از یک سطح صاف یا مقعر تشکیل شده است. بنابراین این آنتی بادیها قادر به شناسایی اپی توپهای فرو رفته و مخفی نمی باشند [۵۱]. با وجود این اندازه کوچک VHH و طولی بودن ناحیه CDR₃ در آن امکان شناسایی چنین اپی توپهایی را فراهم می آورد. بصورتی که مشخص شده است پس از ایمن سازی شترها با یک آنزیم، بیشترین تعداد HcAb های جدا شده دارای خاصیت مهار کنندگی برای آن آنزیم خواهند بود [۵۰].

تا کنون VHH های مهار کننده برای آنزیم های لیزوزیم، کربونیک ایندراز، آلفا آمیلاز و تبالاکتاماز با این روش جداسازی شده اند [۵۰].

۵) همولوژی زیاد با دومن VH انسانی

مقایسه توالی VH انسانی و VHH درجه بالایی از همولوژی را نشان می دهد [۵۲]. انسانی کردن آنتی بادیهای VHH شتری در مقایسه با انواع موشی، به علت کوچکتر بودن و همولوژی بالا با VH انسانی بسیار ساده تر و کارا تر است. با توجه به ساختار، VHH می توان پیشبینی کرد که اغلب جایگزینی ها با سکانس انسانی، بجز در مورد اسید آمینه های کلیدی مشترک در ناحیه داربستی FR2 بدون تغییر در عملکرد و خواص آن قابل اجراست [۵۳].

نانوبادی ها و کاربرد های درمانی

اگرچه نانوبادی ها در مواردی که نیازمند پایداری بالا می باشد نظیر استفاده در شامپو برای پیشگیری از شوره سر، یا به عنوان مواد گیرنده در تخلیص بر اساس ایمونوافینیتی، یا استفاده در بیوسنسورها بسیار مناسب و کارا هستند با این وجود کانون توجه بیشتر به کاربردهای درمانی آنها خواهد بود که بسیار چالش برانگیز است. هم اکنون مطالعات مختلفی برای استفاده در بیماریهای مختلف شامل: سرطان، بیماری های عفونی، التهابی، بیماری های اتوایمیون، خنثی کردن

سموم، بیماری های دستگاه خون ساز و بیماری های تحلیل برنده اعصاب در حال انجام است.

اهمیت بیوتکنولوژی نانوبادی ها

VHH ها به دلیل خواص بی نظیرشان که شامل: سایز کوچک و تمایل زیاد به آنتی ژن، پایداری، حلالیت، راحتی کلون کردن کتابخانه های بالغ شده در *in vivo* بازده بیان و یک پاراتوپ با پیچیدگی کمتر است. در بیوتکنولوژی و موارد تشخیصی کاربرد فراوان دارند. مزیت VHH ها به عنوان واحدهای سنجش در بیوسنسورها، استفاده در جاذب های ایمنی و تولید مهارکننده های آنزیمی رقابتی مورد بررسی قرار گرفته است

نانوبادی بعنوان ابزار تشخیصی و درمانی در سرطان

یک مسئله تعیین کننده در درمان سرطان، تشخیص بیماری در مراحل اولیه آن می باشد. یک عامل تصویر برداری ایده آل باید بتواند مقادیر لازم از نشانه را برای تعیین کوچکترین مقدار متاستاز حمل نموده، اتصال غیر اختصاصی نداشته باشد بتواند بصورت موثر به بافت توموری نفوذ کند و در عین حال کونژوگه متصل نشده به سرعت از سیستم گردش خون حذف شود. عوامل هدف گیری که هم اکنون در آزمونهای بالینی مورد استفاده قرار می گیرند، اغلب از منوکلونالهای موشی مشتق شده اند. این آنتی بادی ها بدلیل ایمنوژن بودن، نیمه عمر زیاد در خون و نفوذ کم به بافت توموری، مشکلاتی را ایجاد می کنند [۵۴].

عوامل تصویر برداری از نوع VHH که اندازه کوچکی دارند گزینه مناسبی در این زمینه به شمار می روند زیرا قدرت نفوذ موثر به تومورهای سخت، تمایل بالا و سرعت پاکسازی مناسب از خون را دارا می باشند. در تومورهای موشی نشان داده شده است که VHH اختصاصی تومور با سرعت بیشتری نسبت به scFv از جریان خون پاکسازی می شود و در عین حال در محل تومور بصورت ویژه متمرکز می شود. بصورتی که میزان VHH چند ساعت پس از تزریق در تومور ۱۰ برابر میزان آن در خون می باشد [۴۸].

نانوبادی بعنوان اینترابادی

بیان داخل سلولی آنتی بادیها (اینترابادی) یک ساز و کار قوی برای مهار عملکرد یک مولکول انتخابی در بدن موجودات است. مسئله مهم در طراحی اینترابادیها هدایت آنها به ارگانل مناسب، بعنوان مثال شبکه ER، گلژی، غشاء سلولی، میتوکندری و یا محیط سیتوپلاسمی و در عین حال حفظ پایداری و خاصیت اتصالی آن می باشد. تا کنون قطعه scFv بیشترین استفاده را در ساخت اینترابادیها داشته است. بصورتی که ساخت scFv اختصاصی علیه پروتئین های

کلیدی مسیرهای انتقال سیگنال درون سلولی مانند 2-erbB, EGFR, bc12, caspase ها و نیز پروتئین های پوششی ویروسها مثل HIV گزارش شده است [۵۵].

در برخی موارد مشاهده شده است که اینترابادی پس از ورود به جایگاه مورد نظر تجمع پیدا کرده و یا تمایل آن برای آنتی ژن کاهش می یابد. بنابراین بکارگیری یک بایندر پایدار مانند VHH می تواند تا حدی بر این مشکلات غلبه کند. اخیر گزارش شده است ساخت اینترابادی از نوع VHH علیه پروتئین P1۵ ویروس پورکین مانع ایجاد ذرات ویروسی در داخل سلول شده است [۵۶].

نانوبادی بعنوان واحد ساختمانی برای سازه های دستکاری شده

همانطور که اشاره شد چند ظرفیتی بودن موجب افزایش تمایل کلی و نیز اتصال متقاطع دو یا چند آنتی ژن می شود. ساختارهای دو ظرفیتی یا دو ویژگی از scFv که بوسیله لینکرهای پپتیدی بهم متصل شده اند بسیار مستعد تجمع و تشکیل توده مولکولی می باشند [۵۷]. از طرفی این ساختارها بدلیل بیان کم و حساسیت پروتئولیتیکی که در نتیجه وجود لینکرهای پپتیدی در ساختار آنهاست، کاربرد بالینی زیادی نداشته اند. در حالیکه اشکال چند ظرفیتی ساخته شده با استفاده از VHH شتری چنین مشکلاتی را ندارند. در ساختارهای دو تایی ایجاد شده از VHH های متفاوت، هر یک از بایندها کاملاً عملکرد خود را حفظ نموده اند و هیچ نشانه ای از تشکیل توده مولکولی در آنها دیده نمی شود [۵۸].

نشانه های توموری^۱

نشانه های توموری به طور وسیعی در مورد سرطان پستان نیز کاربرد دارند. یک نشانگر توموری ایده آل در سرطان پستان، اولاً باید اختصاصی برای پستان باشد، ثانیاً آنقدر باید حساسیت کافی داشته باشد تا بتواند وجود تومورهای کوچک را برای تشخیص اولیه و یا برای غربالگری، تشخیص دهد. البته هیچ نشانگری با ویژگیهای بالا تا بحال کشف نشده است؛ اما با این حال بعضی از نشانگرها برای تعیین عود مجدد بیماری بعد از درمان اولیه و یا برای پیگیری بیماری مفیدند [۵۹].

نشانه های کربوهیدراتی

همانطور که گفته شد یکدسته از نشانگرهای توموری عمده سرطان پستان نشانگرهای توموری کربوهیدراتی می

¹ Tumor markers

باشند که زیرمجموعه ای از خانواده موسین ها می باشند. ویژگی های کلی موسین ها در زیر شرح داده می شود محصولات ژن MUC1 نیز از همان ویژگیهای کلی موسین ها تبعیت می کند.

ویژگیهای کلی موسین ها

موسین ها گلیکوپروتئین هایی با دو مشخصه عمده هستند (۱) محتوای زیاد چندقندیهای دارای اتصال O (محتوای کربوهیدراتی موسین ها عمدتاً بیشتر از ۵۰٪ است و اغلب بین گونه ها، افراد، بافت ها و حالت های پیشرفته تومور متفاوت و پیچیده هستند) (۲) وجود توالیهای تکراری اسید آمینه ای (توالیهای پیپتی).

در مرکز اسکلت پلی پپتیدی خوشه های زنجیره های O- گلیکان به آن متصلند. این توالیها غنی از سرین، ترئونین و پرولین هستند. موسین ها اغلب تعدادی زنجیره N- گلیکان دارند ولی O- گلیکان های آنها غالبند. دو نوع موسین ترشچی و متصل به غشاء وجود دارد. موسین ترشچی در موکوس موجود در ترشحات دستگاه گوارش، تنفس و تولید مثل یافت می شود. موکوس از حدود ۹۴٪ آب و ۵٪ موسین تشکیل شده است و بقایای آن مخلوطی از مولکولهای مختلف سلول و الکترولیت ها و بقایای سلول ها می باشد. موسین های ترشچی عموماً ساختمان الیگومری دارند و لذا وزن مولکولی آنها غالباً بالاست. مابع موکوسی چگالی بالایی داشته و غالباً به شکل ژل است. این خصوصیات موکوس به خاطر محتوی موسینی آن است. محتوی زیاد O- گلیکانها ساختمان موسین ها را کشیده کرده است. محتوی زیاد N- استیل نورامینیک (NeuAc) و سولفات که در بسیاری از موسین ها یافت می شود، باعث منفی شدن یار سطحی آنها می گردد [۶۰، ۶۱]. موسین ها با توجه به خواصشان به روان سازی و ایجاد نوعی سد فیزیکی محافظ بر روی سطوح اپیتلیال کمک می کنند. موسین های متصل به غشاء در انواع تعامل های سلول- سلول شرکت دارند. بسیاری از سلول های سرطانی به میزان زیادی موسین می سازند. شاید نقش موسین ها در اینجا این باشد که برخی از آنتی ژنهای سطحی این گونه سلولها را بپوشانند و بدین ترتیب از سلول ها در برابر سیستم ایمنی محافظت نمایند. همچنین موسین ها حامل اپی توپهای پپتیدی و کربوهیدراتی مختص سرطان هستند. از ویژگی های دیگر موسین های موجود در غشاء بیان زیاد آنها به اضافه گلیکوزیلاسیون غیر عادی آنها در تومورهای پستان، تخمدان، پانکراس، کولون، ریه و پروستات و دیگر تومورهای بافتی است از جمله مهمترین موسین ها MUC1 است که در سرطان های مختلف با منشاء اپیتلیال و در بیش از ۹۰٪ همه انواع سرطان پستان بیان بیش از حد دارد چون در این تحقیق به طور عمده بحث در مورد MUC1 است، ویژگی های کلی این گلیکوپروتئین بیشتر توضیح داده می شود. [۶۰، ۶۱].



MUC1

موسین های پلی مورفیک اپیتلیال (PEM) یک نام عمومی برای گلیکوپروتئین های بزرگی است که توسط ژن MUC1 کد می گردد. ژن MUC1 در کروموزوم 1q21 قرار دارد. گلیکوپروتئین MUC1 در بسیاری از بافت های اپیتلیال مثل مثانه، پستان، معده، پانکراس، تخمدان و مجاری تنفسی بیان می گردد. در بافت نرمال پستان MUC1 فقط در سطح راسی سلول های اپیتلیال در مجاری و آسینی های بافت پستان وجود دارد. MUC1 ممکن است وارد مجرای غدد شیری شده و به همراه قطرات چربی شیر در ترشح شود. لازم به ذکر است که MUC1 برای اولین بار در شیر شناسایی شد. در بافت های توموری، قطبیت توزیع MUC1 در سلولهای اپیتلیال از بین می رود و این گلیکوپروتئین در کلیه سطوح سلول بیان می گردد و در نهایت MUC1 در اثر سرطانی شدن سلول، به داخل مایعات بیولوژیک ریخته می شود که می توان آن را توسط سنجش های ایمنی اندازه گیری کرد [۶۰، ۶۲].

ساختار MUC1

موسین MUC1 دارای وزن مولکولی بین ۲۵۰-۱۰۰۰ کیلو دالتون است. این گلیکوپروتئین دارای یک هسته پلی پپتیدی به اضافه زنجیره های کربوهیدراتی است زنجیره های کربوهیدراتی غنی از گالاکتوز آمین، گلوکز آمین، گالاکتوز، فوکوز و سیالیک اسید است [۶۳]. این گلیکوپروتئین دارای سه دومین^۱ است دومین خارج سلولی شامل پپتیدی O-گلیکوزیله است. این قسمت پپتیدی از توابع تکراری ۲۰ اسید آمینه ای تشکیل شده است^۲ (VNTR) که هر VNTR پنج جایگاه بالقوه O-گلیکوزیلاسیون دارد [۶۰]. تعداد VNTR بر حسب پلی مورفیسم در جمعیت های مختلف فرق میکند. برای مثال در مردم اروپای شمالی از ۲۸ تا ۱۲۵ بار تکرار دیده می شود [۶۳].

گلیکوزیلاسیون MUC1 تحت کنترل آنزیمی است. ابتدا بعد از تغییرات پس ترجمه، یک هسته چهارقندی تشکیل می شود سپس روند گلیکوزیلاسیون در دستگاه گلژی ادامه پیدا می کند. فعالیت این آنزیمها در هنگام سرطانی شدن سلولها دستخوش تغییرات می گردد و منجر به نامنظم شدن روند گلیکوزیلاسیون و حتی کاهش روند گلیکوزیلاسیون می گردد. در حالت کلی گلیکوزیلاسیون در سلول سرطانی کمتر از گلیکوزیلاسیون در سلول نرمال است، بنابراین مشخص است که در این حالت MUC1 دارای هتروژنیسیته مختلف خواهد بود. چون درجه گلیکوزیلاسیون و ماهیت ظهور اپی توپهای پپتیدی، مختلف خواهد بود، این هتروژنیسیته سبب تولید آنتی بادیهای مونوکلونال مختلف علیه این موسین شده

¹ Domain

² Variable Number of Tandem Repeat

است [۶۰]، همچنین این امر سبب شده است که MUC1 اسامی مختلفی داشته باشد که از جمله آنها میتوان به CA15-CA1، 3، 31، MCA، CA549، CA27.29، BCM، M26، PUM، PEM، آنتی ژن PF3 و Episialine اشاره کرد. بیشتر این نامگذاریها بر اساس چگونگی کشف آنها، و یکسری از آنها به علت نام آنتی بادی واکنش دهنده با آن میباشند [۶۴].

[۶۵]. ساختار کلی MUC1 به همراه سایر ملکولها و موسینها در (شکل) آمده است. همان طور که در شکل مشاهده میشود MUC1 به همراه MUC4 بیش از ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر از سطح سلول اپیتلیال گسترش پیدا کرده است. علاوه بر دومین خارج سلولی، MUC1 دارای یک قسمت عرض غشایی و یک دومین داخل سیتوپلاسمی است که معتقدند نقش پیام رسانی دارد، زیرا این قسمت از MUC1 با پروتئین بتاکتینین و سایر ملکولهای پیام رسان مانند Grb2/sos ارتباط دارد. تیروزین قسمت سیتوپلاسمی MUC1 دچار فسفریلاسیون میگردد اما مشخص نیست که آیا این فسفریلاسیون و متعاقب آن پیام رسانی، در پاسخ به محرکهای فیزیولوژیک روی میدهد یا نه. برای مثال فعال کردن erbB1 با EGF سبب افزایش فسفریلاسیون تیروزین قسمت سیتوپلاسمی MUC1 میگردد. مطلب بالا نشان دهنده نقش MUC1 در پیام رسانی سلولی است [۵۹].

نقش فیزیولوژیک MUC1

نقش فیزیولوژیک اکثر موسینها حفاظت سطح سلولهای اپیتلیال در برابر عوامل میکروبی و پروتئولیز است. با اینکه نقش اصلی MUC1 خوبی شناخته نشده است اما احتمال می دهند که در اتصالات سلولی نقش داشته باشد. MUC1 اتصالات بین سلولی و سلول - خارج سلول را کم می کند زیرا MUC1 در سلول سرطانی عملکرد Cadherin E را که یک مولکول موثر در چسبندگی سلولی است و فقدان آن سبب متاستاز می گردد، مختل می کند [۶۶].

اثرات موسینها بر روی سیگنالهای سلولی

موسینهای گذرغشایی برخلاف موسینهای ترشحاتی از سلول اپیتلیال بوسیله عمل در سیگنالهای سلولی که باعث رشد و بقاء سلول میشود محافظت می کند. سرطانهای انسانی از این مکانیسم حفاظتی با بیان بیش از حد موسینهای گذرغشایی به ویژه MUC1 و MUC4 بهره می برند. علاوه بر نقش MUC1 در تشخیص و پیش آگهی سرطان پستان ثابت شده است که این گلیکوپروتئین در مسیرهای مختلف انتقال پیام در سلولهای بدخیم دخالت دارد [۶۷].

¹ Carbohydrate Antigen 15-3

² Mucin like Carcinoma Associated Antigen

³ Breast Cancer Mucin

⁴ Peanut Reactive Urinary Mucin

⁵ Polymorphic Epithelial Mucin

MUC1 و رسپتور های تیروزین کینازی

انتهای کربوکسیلی دومین سیتوپلاسمی MUC1، دارای ۱۲ محل بالقوه فسفریلاسیون می باشد که در واقع به عنوان سوسترایی برای تیروزین کینازها می باشد. فسفریلاسیون این انتهای کربوکسیلی واکنش بین MUC1-C و افکتورهای مسیر Wnt, β -Catenin را تنظیم می کند.

همچنین این دومین مسیر NF-Kb را از طریق واکنش مستقیم با $IKK\alpha$ و $IKK\beta$ و RELA فعال می کند بنابراین MUC1 در تنظیم مسیرهایی که منجر به پیشرفت تومورزایی است دخالت می کند.

نقش موسین ها در سرطان

مطالعه سلول های توموری نشان می دهد که مقدار و همچنین الگوی گلیکوزیلاسیون MUC1 بیان شده در این سلولها، باعث تعدیل پاسخ های ایمنی به این سلولها می گردد. گلیکوزیلاسیون MUC1 در سرطان های مختلف دستخوش تغییر می شود و بنابراین اپی توپهای جدیدی در سطح این پروتئین ظاهر می گردد که برای سیستم ایمنی ناشناخته است. با این حال MUC1 سلول های سرطانی را از حمله سیستم ایمنی حفظ می کند که بیان کننده نقش دوگانه MUC1 در سیستم ایمنی است [۶۷].

اهمیت MUC1 در سرطان پستان

از بین موسین ها نقش MUC1 در سرطان پستان بیشتر از بقیه مورد مطالعه قرار گرفته است MUC1 در بیش از ۹۰٪ همه انواع سرطان پستان بیان بیش از حد دارد. (۶۵-۱۰۰٪ در کارسینوما موسینی و ۹۲-۱۰۰٪ در داکتال کارسینوما) [۶۷] با مطالعاتی که در سرطان پستان انجام شده است نشان داده شده است که مسیر سیگنالی MUC1 با ErbB2/HER2 مرتبط می باشد. همچنین در غدد پستانی موش و سلول های سرطانی پستان در ارتباط با ErbB3 و ErbB4 دیده شده است؛ و در یک مطالعه که در سال ۲۰۱۳ انجام گرفت دیده شد درمان با مهار کننده های آنکوپروتئین MUC1 باعث از بین رفتن مقاومت به هرسپتین در بیماران مبتلا به سرطان پستان می شود. ثابت شده است که بیان بیش از حد MUC1 در سرطان پستان مانع مرگ سلولی در پاسخ به استرس های اکسیداتیو، آسیب DNA و هیپوکسی می شود. [۶۷]

ایمنی درمانی علیه MUC1 در سرطان

ایمنی درمانی به ویژه علیه MUC1 در سرطان پستان بسیار مورد تحقیق قرار گرفته است. عدم موفقیت این روش

دلایل مختلفی دارد ایمونوژن استفاده شده برای بیشتر مطالعات ناحیه ۲۰ اسید آمینه ای است این ناحیه در سلول های نرمال بسیار گلیکوزیله است اما در سلول سرطانی کمتر گلیکوزیله است. از این رو هدف خوبی برای درمان می باشد؛ اما به دلیل هتروژنیسیته تومور در محدوده گلیکوزیلاسیون باعث متفاوت بودن پاسخ به درمان می باشد. ثانیاً این امکان وجود دارد که واکنش ناحیه اسید آمینه های تکراری با سایر مولکول ها مانع واکنش این ناحیه با آنتی بادی های ضد MUC1 شود از طرفی به دلیل سایز کوچک این ناحیه، آنرا اپی توپ کوچکی می سازد که ملکول های MHC تولید شده در مقابل آن قادر به مونتاژ شدن بر روی این اپی توپ نمی باشند [۶۷].

بیان بیش از حد موسین های گذر غشایی در سرطان های مختلف و شناسایی MUC1 به عنوان یک پروتئین آنکوژن، آنرا هدف خوبی برای تولید آنتی بادیها، واکسن ها و داروهای مهارکننده قرار داده است.

نانوبادی دوگانه تولید شده در این تحقیق به دلیل کوچکتر بودن اندازه آن (۱/۵ اندازه آنتی بادی های کلاسیک) و دسترسی بهتر به اپی توپ ها بسیاری از مشکلات آنتی بادی های کلاسیک را نخواهد داشت از طرفی به دلیل ساختار دوگانه و دو نقشی از یک سو مارکر توموری MUC1 را که در سلول های توموری پستان بیان بیش از حد داشته بلوکه کرده و از طرف دیگر بدون دخالت مولکول های MHC باعث فعال شدن سلول های T سیتوتوکسیک در محل تومور شده و از این طریق به صورت سریال سلول های توموری را از بین می برند. همچنین شکل دوگانه آن منجر به افزایش سایز و افزایش نیمه عمر و در نتیجه ماندگاری بیشتر در سرم می شود.

فصل دوم

پیشینه تحقیق

پیشینه MUC1

با مطالعاتی که در سرطان پستان انجام شده است نشان داده شده است که مسیر سیگنالی MUC1 با ErbB2/HER2 مرتبط می‌باشد. همچنین در غدد پستانی موش و سلول های سرطانی پستان در ارتباط با ErbB3 و ErbB4 دیده شده است؛ و در یک مطالعه که در سال ۲۰۱۳ انجام گرفت دیده شد درمان با مهار کننده های آنکوپروتئین MUC1 باعث از بین رفتن مقاومت به هرسپتین در بیماران مبتلا به سرطان پستان میشود. [۶۸]

در سال ۱۹۹۳ یک مشاهده اتفاقی توسط پروفیسور ریچارد هامرز منجر به کشف مقادیر زیادی از IgG2 و IgG3 در سرم شترهای یک کوهانه و لاما شد که فاقد زنجیره سبک بود. به این ترتیب این آنتی بادی زنجیره سنگین یا HcAb بدلیل غیاب دومین CH ۱ وزن مولکولی کمتری نسبت به آنتی بادهای معمولی داشته و اتصال به آنتی ژن در آنها تنها از طریق یک دومین VH منفرد صورت می گیرد. این ناحیه VHH یا نانوبادی نامیده می شود تا از VH آنتی بادهای معمولی متمایز گردد [۴۳] بنابراین VHH با وزن مولکولی ۱۲-۱۵ کوچکترین قطعه آنتی بادی متصل شونده به آنتی ژن است که از یک ایمونوگلوبولین عملکردی مشتق شده است. نانوبادی ها به واسطه جابجایی ۵ اسید آمینه که در دومین VH آنتی بادی های کلاسیک در مهره داران بسیار حفاظت شده می باشد و در واکنش های هیدروفوب با دومین های VL دخالت دارد. متمایز میشوند. این تک دومین مزایای زیادی در بیوتکنولوژی دارد. آنها به خوبی در میکروارگانیسیم ها بیان شده و پایداری و حلالیت بالایی دارند [۴۴].

مطالعات نشان دهنده وجود تفاوت های ساختاری بین VH و VHH می باشد. گرچه در VHH نیز سه ناحیه CDR وجود دارد اما ناحیه ۳ در آن طویل تر و متوسط تعداد اسید آمینه های آن ۱۸ عدد در مقایسه با ۱۴ عدد در انسان و ۱۱ عدد در موش می باشد. [۴۳]

در سال ۱۹۹۷، FDA، CA 15-3 و CA 27.29 را به عنوان نشانه توموری در تعیین عود مجدد بیماران سرطان پستان تایید کرده است؛ مانند سایر نشانه های توموری CA 15-3 و CA 27.29 برای تشخیص اولیه و پیش آگهی مناسب نیستند. هر چند در مورد پیش آگهی، مقالات مختلف نظرات متفاوتی را دارند. به بعضی از این مطالعات اشاره می کنیم.

Berruti و همکاران در سال ۱۹۹۴ اهمیت CA 15-3 را در ۱۱۵ بیمار سرطان پستان بررسی و از CA 15-3 به عنوان یک نشانه پیش آگهی مطلوبی یاد کرده است [۶۹].

Molina و همکاران در سال ۱۹۹۸ سه نشانه توموری erbB-2 و CEA و CA 15-3 را به عنوان فاکتور پیش آگهی در مراحل مختلف بیماران سرطان پستان بررسی کرده اند و استفاده همزمان از این سه نشانه را برای ارزیابی بیماران مبتلا به سرطان سینه پیشنهاد کرده اند. [۷۰]

در یک مطالعه دیگر Shering و همکاران در سال ۱۹۹۸ با مطالعه بر روی بیماران سرطان پستان، نقش CA 15-3 را به عنوان یک فاکتور پیش آگهی ناچیز دانسته و آنرا مفید ندانسته اند [71].

MC Laughlin R و همکاران نقش CA 15-3 را در تشخیص اولیه سرطان پستان بر روی ۴۱۴ بیمار مورد بررسی قرار داده و نقش CA 15-3 را در این مورد به عنوان نشانه توموری رد کرده اند.

Ebelling و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشانه های توموری CA15-3 و CEA و CA27.29 را در ۲۲۰ بیمار سرطانی اندازه گیری کردند و در نهایت یک ارتباط بسیار نزدیک بین غلظت CA 15-3 و CA 27.29 در بیماران تحت درمان قرار گرفته مشاهده کردند و پیشنهاد کردند که اندازه گیری همزمان CA 15-3 و CA 27.29 با ویژگی ۸۱٪ از سایر نشانه ها بهترند.

Molina و همکاران در سال ۱۹۹۹ سه نشانه توموری CA15-3 و CEA و erbB-2 را در سرم ۲۵۰ بیمار سرطانی سینه به منظور تشخیص عود مجدد سرطان اندازه گیری کردند و به این نتیجه رسیدند که نشانه های توموری فوق ابزار مفیدی برای تشخیص اولیه متاستاز و همچنین تعیین عود مجدد بیماری سرطان پستان می باشند. [۷۲]

Kumpulainen و همکاران در سال ۲۰۰۲ غلظت CA15-3 را در ۲۷۲ بیمار سرطانی به منظور بررسی میزان بقاء این بیماران اندازه گیری کردند و اندازه گیری آن را به همراه سایر نشانه ها مثل حالت گره ها، مراحل و درجه تومور به منظور تعیین عمر این بیماران مفید دانسته اند. [۷۳]

در یک مطالعه دیگر Ali و همکاران در سال ۲۰۰۲، غلظت دو نشانه توموری CA15-3 و HER2 را در ۵۶۶ بیمار سرطانی اندازه گیری کرده و پیش نهاد کردند که اندازه گیری همزمان CA 15-3 و HER2 نتایج بهتری را نسبت به اندازه گیری فقط CA 15-3 در بر دارد. [۷۴]

در یک مطالعه دیگر Duffy و همکاران در سال ۲۰۰۰ نقش CA 15-3 در ۳۶۸ بیمار سرطان پستان مورد مطالعه قرار داده و نقش آن را از اندازه تومور در پیش آگهی قویتر دانسته اند. [۷۵]

مطالعات متعدد دیگری نیز در رابطه با نقش CA 15-3 و CA 27.29 و CEA در سرطان پستان صورت گرفته است. اکثر این مطالعات با استفاده از کیت های مختلف صورت گرفته است و نمونه های بیماران سرطان پستان نیز از کلیه

مراحل این سرطان یعنی مراحل ۱ و ۲ و ۳ و ۴، افراد نرمال، زنان شیرده، بیماران با تومور خوش خیم پستان و سایر بیماریها استفاده شده است. کلاً نظریه واحدی مبنی بر استفاده از محصولات ژن MUC1 یعنی (CA 15-3 و CA 27.29) در سرطان پستان وجود ندارد اما به هر حال FDA هم CA 15-3 و هم CA27.29 را تأیید کرده است. در تشخیص اولیه سرطان، کاربرد CA15-3 یا CA27.29 توسط تمام محققین رد شده است، اما در مورد نقش آن در پیش آگهی، نظرات متفاوتی دارند. اکثر محققین این دو نشانه را در پیگیری درمان و تعیین عود مجدد بیماری مفید می دانند. جالب است که در سال ۱۹۹۷ جامعه سرطان شناسی بالینی آمریکا (ASCO) CA15-3 و CA27.29 را برای غربالگری، تشخیص، مرحله بندی و حتی پیگیری عود مجدد بیماران سرطان پستان قبول نکرده بود اما در بازنگری که در سال ۲۰۰۰ انجام داده است CA15-3 و CA 27.29 را برای پیگیری درمان و پیشگویی عود مجدد بیماری قبول کرده است.

به هر حال با توجه به موارد گفته شده و مطالعات صورت گرفته، CA15-3 و CA 27.29 به عنوان نشان توموری در سرطان پستان مورد قبول واقع شده و امروزه در آزمایشگاههای تشخیص طبی از این دو نشان به منظور ارزیابی بیماران سرطان پستان استفاده می شود.

MUC1 و آنتی بادی ها

در سال ۱۹۹۸ کارگاهی توسط جامعه زیست شناسی و پزشکی سرطان برگزار گردید که در آن ۵۶ آنتی بادی مونوکلونال بر علیه گزارش گردید. در این کارگاه ویژگیهای این آنتی بادیها به طور کامل تشریح شد به طوریکه نتایج بسیار خوبی در مورد ویژگیها و خصوصیات آنتی بادیهای مونوکلونال تهیه شده بر علیه MUC1 به دست آمد. در این کارگاه مشخص گردید که اکثر آنتی بادیها با قسمت پتپید مرکزی MUC1 واکنش می دهند و توالی اسید آمینه ای هیدروفیل PDTRPAP به عنوان اپی توپ غالب معرفی شد. ضمناً مشخص شد که کربوهیدراتهای زنجیره جانبی MUC1 در واکنش آنتی بادیهای مونوکلونال با قسمت پتپیدی تداخل ایجاد می نمایند. به علاوه مشخص شد که خود کربوهیدراتها هم اپی توپ خاصی برای بعضی آنتی بادیهای مونوکلونال هستند بطوریکه ۱۶ تا از ۵۶ آنتی بادی مونوکلونال، بر علیه قسمت کربوهیدراتی MUC1 بود. علاوه بر تولید آنتی بادی مونوکلونال بر علیه قسمت پتپیدی و قندی، دو آنتی بادی مونوکلونال نیز بر علیه قسمتهای غیر تکراری هسته پتپیدی MUC1 گزارش شده است با پیشرفت فناوری DNA نو ترکیب، تولید آنتی بادیهای نو ترکیب بر علیه آنتی ژنهای مختلف نیز آغاز شده است به طوریکه در مورد MUC1 یک آنتی بادی نو ترکیب

¹ American Society of Clinical Oncology



(ScFVs) از مخزن ژنهای ایمونوگلوبین موش و یک آنتی بادی نو ترکیب VHH از مخزن ژنهای ایمونوگلوبین شتر،

گزارش شده است

اهداف (اصلی - ویژه و کاربردی):

اهداف اصلی:

کلون سازی و بیان نانوبادی بر علیه گیرنده های CD3 & MUC1 در میزبان باکتریایی

اهداف ویژه:

1. طراحی ساختار نانوبادی دوگانه علیه MUC1 و CD3
2. کلون سازی ساختار نانوبادی دوگانه علیه MUC1 و CD3
3. بیان نانوبادی در میزبان باکتریایی مقرون به صرفه از نظر اقتصادی
4. بررسی فعالیت و عملکرد نانوبادی دوگانه تولید شده

اهداف کاربردی:

تولید نانوبادی با فعالیت دوگانه با هدف جلوگیری از رشد سلول های سرطانی و تحریک رشد سلول های ایمنی

فصل سوم
روش اجرای تحقیق

Archive of SID

روش مطالعه:

مطالعه از نوع طراحی روش است

مدل طراحی و مراحل اجرایی کار:

۱. استخراج سکانس مربوط به نانوبادی های MUC1 و CD3 از پایگاه های اطلاعاتی معتبر
۲. طراحی ساختار نانوبادی دوگانه ضد MUC1 و CD3
۳. سنتز سکانس cDNA مربوط به هر دو نانوبادی بعد از بهینه کردن codon usage
۴. طراحی پرایمرهای مناسب جهت استخراج ژن و انتقال به حامل مناسب
۵. سنتز پرایمرهای طراحی شده
۶. PCR با استفاده از پرایمرهای مناسب که محل اتصال آنها در دوطرف ژن تهیه شده واقع است، انجام گرفت. محصول PCR حاصله، توسط ژل آگاروز الکتروفورز شده که طولی معادل طول ژن تهیه شده (که همان cDNA کامل است) را نشان داد.
۷. محصول PCR از روی ژل استخراج شد و در وکتور مناسب قرار گرفت و در باکتری Ecoli کلون شد. سلول های نو ترکیب در محیط کشت مربوطه کشت داده شد و سپس با روش غربالگری مناسب انتخاب شدند. قرار گرفتن ژن در وکتور با استفاده از هضم آنزیمی و انجام PCR بر روی ژن مورد نظر مشخص گردید. برای اطمینان از سکانس صحیح ژن، DNA sequencing با استفاده از پرایمرهای forward و reverse مناسب که محل اتصال آنها در دوطرف ژن در وکتور واقع است انجام شد.
۸. در مرحله بعد وکتور حامل ژن مورد نظر، به جهت بیان پروتئین به باکتری بیانی منتقل شد و سلولهای باکتری در محیط مناسب کشت داده شدند.
۹. بعد از شناسایی باکتری های حاوی وکتور و ژن مورد نظر، حضور و طول محصول با استفاده از بُرش آنزیمی مناسب مورد تأیید قرار گرفت.
۱۰. باکتری های حاوی وکتور و ژن به جهت بیان پروتئین نو ترکیب در محیط مناسب کشت داده شدند.
۱۱. مطالعات بیان ژن و تولید پروتئین نو ترکیب بوسیله روشهای SDS-PAGE و Western Analysis انجام گرفت.



۱۲. با توجه به در نظر گرفتن یک دنباله پروتئینی (His Tag) جهت خالص سازی از این منطقه استفاده شد و با استفاده از ستون Nickel affinity chromatography خالص سازی انجام گرفت.
۱۳. بررسی عملکرد نانو بادی تولیدشده با استفاده از روش MTT assay بر روی دو رده سلولی jurkat و SKBR3 که رده سلولی اول جهت بررسی آنتی بادی علیه CD3 و رده سلولی دوم جهت بررسی آنتی بادی علیه MUC1 استفاده شد.
- تجزیه و تحلیل داده ها در هر مرحله با توجه به پروتکل های مربوط به هر تکنیک انجام شد.

Archive of SID



لیست کل دستگاه‌های مورد استفاده

۱. دستگاه اتوکلاو

۲. سمپلر ۱-۱۰، ۱۰-۱۰۰، ۱۰۰-۱۰۰۰، ۱۰۰۰- (μlit)

۳. دستگاه سانتریفیوژ

۴. دستگاه میکروسانتریفیوژ

۵. انکوباتور ۳۷ °C

۶. شیکر انکوباتور ۳۷ °C

۷. هود بیولوژیک (II)

۸. دستگاه ترموسایکلر

۹. دستگاه Vortex

۱۰. دستگاه Semidry

۱۱. دستگاه Power supply

۱۲. دستگاه Blotting

۱۳. دستگاه Gel document

۱۴. دستگاه تعیین غلظت Picodrop

۱۵. تانک الکتروفورز ستونی

۱۶. تانک الکتروفورز عمودی



ELISA Reader. ۱۷

۱۸. گرم کننده

۱۹. دستگاه یخ ساز

۲۰. دستگاه فلوسایتومتری

باکتری مورد استفاده در پژوهش

باکتری‌های مورد استفاده در پژوهش، سویه‌های NovaBlue GigaSingles از گونه کلی باسیل گرم منفی (E.coli) به عنوان میزبان اولیه برای کلون سازی و سویه BL21 (DE3) از گونه کلی باسیل گرم منفی (E.coli)، سویه تیوردوکسین ردوکتاز منفی (TrxB) جهش یافته به عنوان میزبان بیانی استفاده شد. همچنین سویه BL21(DE3) و سویه NovaBlue GigaSingles دارای مقاومت ژنومی به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین هستند که از آن به منظور حذف آلودگی‌های محیط استفاده شد.

محیط‌های کشت مورد استفاده

محیط‌های کشت مورد استفاده، محیط‌های LB آگار و LB مایع بود. محیط LB مایع در لوله (۵ میلی‌لیتر در هر لوله) و محیط‌های LB آگار در پلیت‌های ۱۵ میلی‌لیتری تهیه شدند و در شرایط کاملاً استریل و در کنار شعله از آنها استفاده شد.

آنتی بیوتیک‌ها

آمپی‌سیلین: پلاسمید بیانی مورد استفاده در این پژوهش "pET-32 Ek/LIC Vector" دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است؛ بنابراین باکتری‌های ترانسفورم شده با این پلاسمید، نسبت به آمپی‌سیلین مقاوم خواهند بود. آمپی‌سیلین با غلظت ۵۰ mg/ml در الکل ۷۰ درجه تهیه و به اندازه‌ای به محیط کشت اضافه شد که غلظت نهایی آن ۱۰ µg/ml شود.



تتراسیکلین: سویه NovaBlue GigaSingles باکتری *E.coli* دارای مقاومت ژنومی نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین هستند. به همین دلیل در کلیه مراحل برای انتخاب و احتراز از آلودگی‌های محیطی به محیط کشت، این آنتی‌بیوتیک اضافه شد، تتراسیکلین با غلظت ۱۰ mg/ml در الکل ۹۶ درجه تهیه و به اندازه‌ای به محیط کشت اضافه شد که غلظت نهایی آن ۱/۲۵۰ µg/ml شود.

پایگاه های اطلاعاتی و نرم‌افزارهای بیو انفورماتیک

بانک اطلاعاتی (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

نرم افزار online تهیه Restriction map از جایگاه (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) (Biolab cutter)

نرم افزار (Gene Runner (V: 3.05)

نرم افزار (CLC Sequence Viwer (V: 6)

نرم افزار Chromas

نرم افزار Exel

طراحی ساختار Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody

در طراحی این ساختار، دو نانوبادی با استفاده از یک لینکر به یکدیگر متصل شدند. سکانس نانوبادی ضد MUC1 از دکتر فاطمه رهبری زاده با کد gbEu645744.1 گرفته شد (دانشگاه تربیت مدرس تهران) و سکانس نانوبادی علیه گیرنده های CD3 از patent های پایگاه اطلاعاتی NCBI با کد (2011/0275787A1) تهیه شد. پس از بهینه کردن Codon usage جهت بیان در *E.coli*، کاست ژنی به صورت زیر طراحی شد.



کاست ژنی از انتهای N به ترتیب تشکیل شده است از:

سیگنال پپتید¹ StII¹ که از 23 اسید آمینه تشکیل شده (MKKNIAFLASMFVFSIATNAYA) موبه منظور ترشح پروتئین به فضای خارج سلولی *E.coli* قرار داده شد سپس سکانس نانوبادی علیه CD3 قرار گرفت لینکر ناحیه لولایی IgG2² (AHHSEDPSSKAPKAPMA) برای اتصال دو نانوبادی استفاده شد و پس از آن نانوبادی ضد MUC1 در کاست جای داده شد. به منظور سهولت تخلیص پروتئین پس از بیان با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی ۶ هیستیدین در انتهای C ترمینال کاست قرار داده شد.

سنتر ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody

سنتر ژن به شرکت Sinaclon سفارش داده شد. ژن سنتر شده در حامل ۱۸ pGH به ما تحویل داده شد.

تکثیر ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody

طراحی پرایمرها

بر اساس توالی overhang های موجود در حامل pET32Ek/LIC، یک جفت پرایمر طراحی شد. به منظور قرار دادن ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody بلافاصله بعد از محل LIC که بر روی پرایمر forward قرار دارد و این محل برای این است که هیچ اسید آمینه اضافه ای بین N-Terminal پروتئین بیان شده وجود نداشته باشد (Nativa N-Terminal).

الف) پرایمر Forward: یک اولیگونوکلئوتید بطول ۱۵ باز و دارای یک محل برش برای آنزیم انتروکیناز که به نام F-tras نامگذاری شد.

5 'GAC GAC GAC AAG ATG 3 '

ب) پرایمر Reverse: یک اولیگو نوکلئوتید بطول ۱۵ باز و به نام R-tras نامگذاری شد.

5 'GA GGA GAA GCC CGG TAA 3 '

¹ heat – stable enterotoxin 2

² llama IgG2 hing linker



:PCR

مواد مورد نیاز:

PCR mix (2X) -۱

جدول ۳ لیست مواد موجود در RCR mix

غلظت	موارد مورد استفاده	
3 mM	MgCl ₂	1
100 mM	KCl	2
0.4 mM	dNTP	3
20 mM	Tris-HCl (PH8.4)	4

۲- پرایمرهای مخصوص حامل pET32Ek/LIC

'Forward primer: 5' GAC GAC GAC AAG ATG 3'

'Reverse primer: 5' GA GGA GAA GCC CGG TAA 3'

۳- DNA الگو (10 ng/μl) زن مورد نظر داخل حامل قرار داشت لذا جهت جداسازی آن از تکنیک PCR

استفاده شد.



۴- آنزیم (2.5U/ul) Pfu DNA polymerases (فرمنتاز)

۵- آب دیونیزه استریل یا آب مقطر استریل

۶- Mineral oil

روش انجام کار:

مواد بالا به نسبت ذکر شده در جدول ۴ در یک تیوپ اپندورف ۰/۵ میلی لیتری با یکدیگر مخلوط شدند. در نهایت ۸ تیوپ به حجم ۲۵ ماکرولیتر (در مجموع ۲۰۰ ماکرولیتر)، آماده برای واکنش زنجیره ای پلیمرز شدند.

جدول ۴ لیست مواد حاضر در واکنش PCR به حجم ۲۵ ماکرولیتر

غلظت	موارد مورد استفاده	
12.5 μ l	PCR mix	1
2 μ l	Primer Forward	2
2 μ l	Rrimer Reverse	3
2 μ l	DNA Template	4
1.25 unit	Pfu DNA polymerases	5
9.5 μ l	آب مقطر استریل	6
25 μ l	مجموع	

قبل از قرارگیری تیوپها داخل دستگاه ترموسایکلر بر روی هر کدام از آنها ۱۵ میکرولیتر از Oil ریخته شد.

شرایط دستگاه به صورت زیر (جدول ۵) تعیین شد.



Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody RCR زمان بندی جدول ۵ جدا کردن ژن Error! No text of specified style in document.

Cycle	Time	Temperature	Step	
1	2 minutes	94° C	First Denaturation	1
30	1 minutes	94° C	Denaturation	2
	45 Sec	61° C	Annealing	3
	2 minute	72° C	Extension	4
1	5 minute	72° C	Final Extension	5

تخلیص محصول PCR

مواد مورد نیاز

برای تخلیص محصول PCR ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody از کیت QIAquick

PCR Purification kit (Qiagen) ساخت شرکت کیازن امریکا استفاده شد.



روش کار:

- ۱) مقدار $100 \mu\text{l}$ از محصول PCR (این PCR با استفاده از Expend Long Template PCR system انجام شد) روی ستون موجود در کیت قرار داده شد.
- ۲) سپس ستون مربوطه درون یک لوله جمع آوری DNA قرار داده شد.
- ۳) پس از چند دقیقه ستون مربوطه در شرایط 12000 rpm 1 min سانتریفیوژ گردید.

کلونینگ محصول PCR

آماده سازی محصول PCR

برای انجام کلونینگ ابتدا لازم است که overhang های مربوط به حامل بر روی محصول PCR ایجاد شود. بدین منظور مواد ذکر شده در جدول زیر در یک تیوپ استریل با یکدیگر مخلوط گردیدند و به مدت یک ۳۰ دقیقه در ۲۲ درجه سانتیگراد و ۲۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

جدول ۶ اجزای واکنش ایجاد overhang

مقدار	نام ماده	
$2 \mu\text{l}$	25 mM dATP	۱
$3 \mu\text{l}$	0.2 pmol (PCR) محصول	۲
$0.4 \mu\text{l}$	2.5 U/ μl T4 DNA Polymerase	۳
$2 \mu\text{l}$	10X T4 DNA Polymerase Buffer	۴
$11.5 \mu\text{l}$	آب مقطر استریل	۵
$1 \mu\text{l}$	100 mM DTT	۶
$20 \mu\text{l}$	مجموع	



اتصال محصول PCR آماده شده با حامل pET-32 Ek/LIC

موار ۱ و ۲ ذکر شده در جدول ۷ در یک تیوپ استریل با یکدیگر مخلوط گردیدند و به مدت یک ۵ دقیقه در ۲۲ درجه سانتیگراد قرار داده شد؛ و در مرحله آخر EDTA به مخلوط اضافه شد. در این مرحله محصول PCR آماده شده وارد حامل pET-32 Ek/LIC شد.

جدول ۷ اجزای واکنش اتصال محصول PCR آماده شده با حامل pET-32 Ek/LIC

مقدار	نام ماده	
۱ μ l	Ek/LIC Vector	1
3 μ l	T4 DNA Polymerase treated Ek/LIC insert (0.02 pmol)	2
1 μ l	mM EDTA 25	3

انتقال کاست آماده به میزبان باکتریایی

محصول واکنش اتصال (Ligation) داخل سلول‌های E.coli مهندسی شده ترانسفورم شد. سپس کلونی‌ها رشد کرده، کشت داده و پس از طی مراحل تخلیص پلاسمید، پلاسمیدها به منظور تعیین صحت (از نظر دارا بودن ژن مورد نظر) مورد برش آنزیمی قرار گرفتند. به طور کلی مراحل انتخاب کلونی صحیح به ترتیب مراحل زیر می‌باشد:

۱- ترانسفورمیشن

۲- انتخاب کلونی صحیح (Colony Selection) شامل مراحل زیر:

الف: کشت تعدادی از کلونی‌ها در مقیاس کوچک

ب: تخلیص پلاسمید

ج: برش آنزیمی توسط آنزیم‌های محدود الاثر (Restriction Enzyme)



د: الکتروفورز پلاسمید برش داده شده و بررسی آن از منظر دارا بودن ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3

Nanobody

آماده سازی سلول های *E.coli* برای پذیرش پلاسمید

برای انتقال پلاسمیدها به سلول های *E.coli* با استفاده از تیمارهای خاص، سلول های باکتری جهت وارد شدن

پلاسمیدها آماده شدند. سلول های تیمار شده کامپیتنت Competent نامیده می شوند.

مواد لازم:

- محیط های کشت LB آگار و LB مایع

- آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (50 mg/ml) و تتراسیکلین (10 mg/ml)

- الکل ۷۰٪

- کلرید کلسیم (۰/۱ مولار) سرد

- IPTG میلی مولار

روش کار:

۱- از استوک میزبان باکتریایی *E.coli* سویه NovaBlue GigaSingle موجود در فریزر ۷۰- درجه

سانتی گراد، ۱۰ میکرولیتر برداشته و با لوپ شیشه ای بر روی پلیت حاوی LB آگار واجد تتراسیکلین کشت داده و پلیت به

مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد.

۲- از کلنی های رشد یافته روی پلیت های فوق، از هر یک، یک کلنی برداشته و در محیط مایع LB واجد

تتراسیکلین تلقیح شد و به مدت ۳-۴ ساعت بر روی انکوباتور متحرک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد.



۳- هنگامی که جذب نوری (OD) سلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD600) به ۰/۴ رسید (فاز لگاریتمی)، سلول‌ها به کمک سانتریفوژ و با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه رسوب داده شدند و مایع رویی دور ریخته شد.

۴- رسوب سلولی به دست آمده در ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار CaCl₂ (کلرید کلسیم) سرد حل شد و به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت.

۵- سلول‌ها در دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد.

۶- رسوب سلولی در ۳۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ مولار کلرید کلسیم سرد حل شد.

انتقال پلاسمید (ترانسفورماسیون)

پس از آماده شدن سلول‌های کامپیتنت طبق روش یاد شده، جهت انجام ترانسفورماسیون به این روش عمل شد:

۱- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های کامپیتنت به لوله‌های اپندورف استریل منتقل شدند.

۲- محلول پلاسمید مورد نظر به سلول‌های کامپیتنت اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت.

۳- سلول‌ها مستقیماً از روی یخ به حمام ۴۲ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و به مدت ۹۰ ثانیه در این نگهداری شدند (با این تغییرات دمایی عملاً شوک حرارتی به باکتری داده می‌شود که این شوک باعث ورود پلاسمیدها به داخل باکتری خواهد شد).

۴- به هر لوله ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB مایع اضافه شد.

۵- سلول‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا جدار سلول‌ها از تیمار CaCl₂ فارغ و ترمیم گردند.

۶- مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه NovaBlue GigaSingle به پلیت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین و تتراسیکلین با استفاده از لوپ شیشه‌ای آغشته به الکل ۷۰٪ پس از حرارت‌دهی آن اضافه شد.

۷- پلیت‌ها به مدت یک شب (۱۶ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

کشت تعدادی از کلونی‌ها در مقیاس کوچک

از کلونی‌های مشاهده شده بر روی پلیت انتخابی، تعدادی از کلونی‌های انتخاب شدند. این نکته قابل ذکر می‌باشد که البته این کشت کلونی‌ها در ۵ میلی‌لیتر LB مایع حاوی آمپی‌سیلین و تتراسایکلین در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انجام شد.

تأیید کلونینگ

تأیید کلونینگ ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody به روش Colony PCR

Colony PCR نوعی از PCR، مشابه با روش معمولی PCR است. با این تفاوت که برخلاف PCR که در آن از ژن یا وکتوری به عنوان الگو استفاده می‌شود، در این روش مستقیماً از خود کلونی‌های باکتری به عنوان نمونه DNA استفاده می‌شود. هنگامی که کلون وارد واکنش PCR می‌شود، در مرحله واسرشت سازی (Denaturation) (به علت دمای ۹۴-۹۲ درجه سانتی‌گراد) باکتری کاملاً لیز شده و محتویات سلولی از جمله پلاسمید از سلول خارج شده و وارد فضای واکنش PCR شود. حال اگر در این کلون پلاسمیدی وجود داشته باشد که حاوی ژن مورد نظر ما باشد، تکثیر صورت خواهد گرفت. احتمال پاسخ‌های منفی کاذب، بدلیل تهیه نامناسب محلول واکنش PCR، سبب شده تا این روش تنها به عنوان یک روش غربالگری اولیه مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۸ مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش Colony PCR

مواد	نمونه آزمون	کنترل منفی	کنترل مثبت
DNA	Colony	0	2µl (50 ng/µl)
Master mix	12.5 µl	12.5 µl	12.5 µl
Primer F-tras	2µl	2µl	2µl
Primer R-tras	2µl	2 µl	2 µl
Pfu DNA polymerases	0.25µl	0.25µl	0.25µl



DDW	8 μ l	11.5 μ l	6 μ l
Total	25 μ l	25 μ l	25 μ l

روش کار:

روش PCR در این آزمایش دقیقاً مشابه PCR معمولی بوده و تنها تفاوت موجود این است که به جای استفاده از الگوی پلاسمیدی یا DNA از خود کلونی ها به عنوان الگو استفاده می شود. در این مطالعه پس از انجام ترانسفورماسیون محصول Ligation به باکتری NovaBlue GigaSingle پس از حدود ۱۶ ساعت تعداد زیادی Colony رشد نمود. از کلنی های مربوطه ماتریس تهیه شده و طبق روش فوق Colony PCR انجام شد.

تعیین ترادف (Sequencing) ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody موجود در**حامل pET-32 Ek/LIC**

از آنجایی که هدف نهایی ما از کلونینگ ژن در میزبان باکتریایی، بیان ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody بود در نتیجه وجود موتاسیون در این ژن می تواند سبب ایجاد مشکلات احتمالی در فعالیت و کارایی پروتئین بیان شده شود. لذا پلاسمید کلون شده جهت تعیین ترادف به شرکت پیشگام ارسال گردید. جهت انجام Sequencing از پرایمرهای اختصاصی حامل pET-32 Ek/LIC استفاده گردید. جهت بررسی سکانس ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody از نرم افزار CLC Sequence Viewer (Version: 6) استفاده گردید و سکانس ژن اصلی (Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody) با سکانس دریافت شده پس از Sequencing هم تراز (Align) گردید.

بیان ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody در سلولها BL21(DE3)

به منظور بیان آنتی بادی نوترکیب، باید حامل PET-32 Ek/LIC را که حاوی ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody است، به سلولهای *E. coli* ای که قادر به سنتز RNA پلیمراز فاژ T7 هستند منتقل نمود. به همین منظور از سلول *E. coli* BL21 (DE3) به عنوان سویه موتانت TrxB استفاده شد.

تهیه سلول مستعد از باکتری *E. coli* BL21 DE3 و انتقال حامل PET-32 Ek/LIC به آنها

تهیه سلول مستعد با روش ذکر شده در قسمت روشهای عمومی انجام شد.

ترانسفورماسیون

۲ میکرولیتر از پلاسمید نو ترکیب تأیید شده به ۱۰۰ میکرولیتر از سلولهای مستعد تهیه شده *E. coli* BL21 (DE3) منتقل شد.

باکتریهای *E. coli* BL21(DE3) روی پلیت LB آگار دارای آمپی سیلین با غلظت نهایی ۲۰ (mg/ml) کشت داده شدند و به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند.

القاء بیان آنتی بادی نو ترکیب در محیط کشت LB مایع با افزودن IPTG

مواد لازم:

۱۰۰ IPTG میلی مولار، لوله حاوی LB مایع (۵ ml)، آمپی سیلین ۵۰ mg/ml

روش انجام کار:

۱- یک کلنی از پلیت حاوی باکتریهای دارای پلاسمید نو ترکیب برداشته و در ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین (با غلظت نهایی (۲۰ mg/ml)) تلقیح شد؛ و لوله بر روی انکوباتور متحرک در ۳۷ درجه سانتی گراد و rpm ۱۵۰ به مدت ۳-۴ ساعت گرماگذاری شد.

۲- پس از رسیدن کدورت محیط به حدی که جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر در حدود ۰/۲ تا ۰/۴ بود، یک میلی لیتر از محیط را به عنوان نمونه قبل از القاء برداشته و جذب نوری آن را در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده و سپس از محلول IPTG استریل، مقدار لازم برای غلظت نهایی ۱ mM (یک میلی مولار) را تحت شرایط کاملاً استریل، در کنار شعله به لوله حاوی محیط کشت اضافه کرده و پس از خوب مخلوط کردن، لوله مجدداً تحت شرایط فوق بر روی انکوباتور متحرک قرار گرفت.

۳- پس از گذشت ۲ و ۴ ساعت از زمان القاء، میزان جذب نوری یک میلی لیتر از محیط کشت، در طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد.



۴- این یک میلی لیتر محیط کشت حاوی باکتری، در ۹۰۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی و رسوب باکتری به صورت جداگانه در ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد.

بررسی بیان ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody با روش SDS-PAGE

جدول ۹ اطلاعات تعیین درصد غلظت ژل جهت انجام PAGE- SDS

Protein MW rangs, kDa	%.Recommended gel
۵۰-۵~	%۱۸
۶۰-۵~	%۱۶
۸۰-۱۰~	%۱۴
۱۵۰-۲۰~	%۱۲
۲۰۰-۳۰~	%۱۰
۲۵۰-۴۰~	%۸
۳۰۰-۶۰~	%۶
۴۰۰-۱۰۰~	%۴

روش کار:

طرز تهیه بافر و سایر مواد مورد نیاز

۱. (۸، ۳۰:۰) Acrylamide: bisacrylamide

جدول ۱۰ تهیه بافر اکریل آمید

مقدار	مقدار	وزن مولکولی	موارد مورد استفاده
30%	60.0	71.08 g	Acrylamide



0.8%	1.6 g	154.17 g	N',N methylenebisacrylamide	
حجم با آب دیونیزه به 200 میلی لیتر رسانده شد.				

۸، ۳۰۰۰) Acrylamide: bisacrylamide بعد از ساخته شدن با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر، فیلتر شده و در ظرف تیره

رنگ در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۲. بافر ژل تحتانی (PH8.8, Tris 1.5M)

جدول ۱۱ بافر ژل تحتانی SDS-PAGE (PH8.8, Tris 1.5M)

غلظت نهایی	مقدار	وزن مولکولی	موارد مورد استفاده
1.5M	181.7 g	121.14 g	Tris base
	750 ml	18 g	D.D. Water
روی PH 8.8 با HCL تنظیم شد.			
حجم با آب دیونیزه به 1000 میلی لیتر رسانده شد.			

۳. بافر ژل فوقانی (PH6.8, Tris 0.5mM) بعد از ساخته شدن با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر، فیلتر شد و در دمای ۴ درجه

سانتی گراد نگهداری شد.

۳. بافر ژل فوقانی (PH6.8, Tris 0.5mM)

جدول ۱۲ بافر ژل فوقانی SDS-PAGE (PH6.8, Tris 0.5 M)

غلظت نهایی	مقدار	وزن مولکولی	موارد مورد استفاده
---------------	-------	-------------	--------------------



1.5M	60.5 g	121.14 g	Tris base	
	750 ml	18 g	D.D.Water	
روی PH 6.8 با HCL تنظیم شد.				
حجم با آب دیونیزه به 1000 میلی لیتر رسانده شد.				

بافر ژل فوقانی بعد از ساخته شدن با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر، فیلتر شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

۴. محلول بافر تانک 10x

جدول ۱۳ محصول بافر تانک 10x SDS-PAGE

غلظت نهایی	مقدار	وزن مولکولی	موارد مورد استفاده
0.025 M	30.28 g	121.14 g	Tris
0.192 M	144.13 ml	75.07 g	Glycine
0.1%	10 g	288.38 g	SDS
حجم با آب به 1000 میلی لیتر رسانده شد.			

محلول بافر تانک 10x نیازی به تنظیم PH ندارد.

۵. SDS% 10

جدول ۱۴ SDS% 10

حجم نهایی	مقدار	وزن مولکولی	موارد مورد استفاده
10%	5.0 g	288.38 g	SDS
حجم با آب به 50 میلی لیتر رسانده شد.			



❖ 10% SDS بعد از ساخته شدن با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر، فیلتر شده و در دمای آزمایشگاه نگهداری شد.
 ۶. 10% ASP

جدول ۱۵ 10% ASP

حجم نهایی	مقدار	وزن مولکولی	موارد مورد استفاده
10%	0.1 g	228.20 g	Ammonium persulfate (ASP)
حجم با آب به یک میلی لیتر رسانده شد.			

❖ 10% SDS تازه و در هنگام استفاده تهیه شد.

۷. بافر نمونه:

الف: بافر نمونه 6x

جدول ۱۶ بافر نمونه 6x

مقدار	وزن مولکولی	موارد مورد استفاده	
4.06 g	121.14 g	Tris	1
60 ml	92.10 g	Glycerol	2
6 g	288.38 g	SDS	3
0.001	691.9 g	Bromophenol blue	4
2 ml		2-Mercaptoethanol	5

بافر نمونه 6x بعد از ساخته شدن با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر، فیلتر شده و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.



ب: بافر نمونه 2X

ابتدا Tris-HCL 4X تهیه شد.

جدول Tris HCL 4X^{۱۷}

حجم نهایی	مقدار	وزن مولکولی	موارد مورد استفاده
4X	6.05 g	121.14 g	Tris
	0.4 g	288.38	SDS
PH روی 6.8 تنظیم شد و حجم با آب مقطر به 100 میلی لیتر رسانده شد.			

براساس جذب نوری نمونه‌های گرفته شده از محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر، سوپرناتانت قبل و بعد از القاء باکتری در بافر نمونه ۲ x حل کرده و پس از ورتکس کردن، نمونه‌ها سانتریفوژ شدند و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. با توجه به اینکه سایز پروتئین در حدود ۳۵kd است ژل ۱۲٪ SDS-PAGE تهیه شد.

الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید در حضور SDS (SDS-PAGE)

روش انجام کار:

۱- روش تهیه ژل تحتانی یا جداکننده:

ژل تحتانی براساس جدول ۱۰ تهیه می‌شود، درصد ژل بستگی به وزن مولکولی پروتئین دارد. هرچه وزن مولکولی نمونه پروتئینی، بیشتر باشد از ژل با درصد پایین‌تری استفاده می‌شود.

- محلول‌ها به جز TEMED، اضافه شدند و با هم خوب مخلوط شدند.

- به مدت ۵ دقیقه، با پمپ خلاء عمل گازگیری انجام شد و سپس TEMED اضافه شد.

۲- روش تهیه ژل فوقانی:

از این ژل به منظور متراکم کردن نمونه پروتئینی استفاده می‌شود و عموماً از ژل ۵٪ استفاده می‌شود. از این ژل



براساس مقادیر جدول ۱۱ تهیه می‌گردد.

- محلول‌ها به جز TEMED، اضافه شدند و با هم خوب مخلوط شدند.

- به مدت ۵ دقیقه، با پمپ خلاء عمل گازگیری انجام شد و سپس TEMED اضافه شد.

۳- روش تهیه ژل:

۱- صفحات شیشه‌ای، شانه و پلاستیک انتهای صفحات با آب و الکل ۷۰٪ کاملاً تمیز شد و ۳ فضا ساز بین دو صفحه شیشه‌ای قرار داده شد و با گیره محکم شد و قالب شیشه‌ای به طور عمودی روی سطح صاف قرار گرفت.

۲- مقدار ۱ میلی‌لیتر از مخلوط ژل تحتانی به طور جداگانه با TEMED مورد نیاز برای مقدار ژل مورد نظر، مخلوط و به فضای بین شیشه‌ها ریخته شد. (به خاطر بالا بودن مقدار TEMED، این مقدار ژل سریع می‌بندد و بنابراین در فاصله بین انتهای شیشه‌ها ژل قرار گرفته و از نشت ژل تحتانی جلوگیری می‌شود).

۳- مقدار TEMED مورد نیاز برای ژل تحتانی به مخلوط بقیه مواد ژل تحتانی اضافه شد و کاملاً مخلوط شد و سپس داخل قالب شیشه‌ای تا ارتفاعی که حدود ۳ سانتی‌متر فضا برای ژل فوقانی باقی بماند ریخته شد. سپس مقداری اتانل به آرامی و با دقت به گونه‌ای که سطح بالای ژل به هم نخورد. روی ژل ریخته شد (مدتی طول می‌کشد تا ژل ببندد).

۴- پس از اطمینان از بسته شدن ژل تحتانی، اتانل روی ژل خالی شد و سطح ژل چندین بار با آب مقطر شسته شد.

۵- به ژل فوقانی تهیه شده، TEMED اضافه شد و پس از مخلوط کردن، بلافاصله روی ژل تحتانی ریخته شد و سریعاً شانه داخل ژل قرار داده شد.

۶- پس از اطمینان از بسته شدن ژل فوقانی، شانه به آرامی خارج شد و داخل چاهک‌ها، با آب مقطر شسته شد.

قالب شیشه‌ای با گیره به سیستم الکتروفورز وصل شد و محفظه بالا و پایین سیستم با بفر تانک پر شد.

۴- روش آماده‌سازی نمونه

۱- پس از گذشت زمان‌های موردنظر باکتری‌ها را رسوب داده و در **sample buffer(6x)** و آب مقطر بر اساس میزان **OD** آن‌ها و بر طبق فرمول زیر حل کرده و پس از جوشاندن آنها بیان پروتئین نمونه به وسیله ژل **SDS-PAGE** بررسی شدند.



Sample buffer=OD×100×4 DW=OD×100–sample buffer

۲- پس از سرد شدن نمونه‌ها، در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و ذرات درشت و تجمع یافته حذف شد.

۳- نمونه‌ها با استفاده از سرنگ هامیلتون در داخل چاهک‌ها قرار گرفت.

مقدار نمونه قرار داده شده در هر چاهک بستگی به اندازه چاهک، میزان خلوص نمونه، روش رنگ‌آمیزی و نوع بافر نمونه 6x و 2x دارد.

۴- سیستم الکتروفورز به منبع تغذیه متصل شد. (در صورت استفاده از ولتاژ ثابت، هنگامی که نمونه داخل ژل فوقانی بود از ولتاژ ۱۰۰ ولت و بعد از ورود نمونه به داخل ژل تحتانی، از ولتاژ ۱۲۰ ولت استفاده شد).

۵- پس از اتمام الکتروفورز (رسیدن رنگ نشانه به انتهای ژل)، منبع تغذیه خاموش شد و قالب شیشه‌ای از تانک خارج و فضا سازها از قالب شیشه‌ای خارج شدند و با قرار دادن یکی از فضا سازها بین دو صفحه شیشه‌ای، شیشه بالایی جدا شد و سپس ژل رنگ‌آمیزی شد.

روش رنگ‌آمیزی ژل SDS-PAGE

به منظور مشاهده باندهای پروتئینی، لازم است ژل را رنگ‌آمیزی نمود. روش‌های مختلفی برای رنگ‌آمیزی ژل‌های SDS-PAGE وجود دارد که متداول‌ترین آنها روش رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو و یا نیترات نقره می‌باشد. عموماً از روش کوماسی بلو استفاده می‌شود، زیرا یک روش سریع و ارزان بوده و ثبات رنگ طولانی است.

-مواد لازم:

رنگ کوماسی بلو، محلول رنگ بر (محلول اسید استیک: متانل) شامل (۵۰۰ میلی‌لیتر اتانل با ۴۰۰ میلی‌لیتر آب و ۱۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک).

-روش کار:

۱- ابتدا ژل داخل ظرف رنگ‌آمیزی قرار گرفت و مقداری رنگ به آن اضافه شد تا حدی که رنگ روی ژل را بگیرد و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفت.

۲- رنگ روی ژل خالی شد و ژل با آب مقطر شسته شد.



۳- ژل داخل محلول رنگ بر، روی شیکر قرار گرفت تا زمینه ژل شفاف شده و باندهای پروتئینی نمایان شوند.

۴- باندهای پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱۸ بافر نمونه 2x

مقدار	وزن مولکولی	موارد مورد استفاده	
25 ml		Tris HCl 4X 6.8	1
4 g	288.38 g	SDS	2
20 ml	92.10 g	Glycerol	3
0.001 g	691.9 g	Bromophenol Blue	4
2 ml	691.9 g	2-Mercaptoethanol	5

❖ بافر نمونه 2x این محلول، بعد از ساخته شدن با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر، فیلتر شده و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تایید بیان آنتی بادی نو ترکیب با استفاده از روش SDS-PAGE

یک کلنی از پلیت حاوی باکتری‌های دارای پلاسمید نو ترکیب برداشته و در ۵ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین تلقیح شد و لوله بر روی انکوباتور متحرک در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۵۰ rpm به مدت ۳-۴ ساعت گرماگذاری شد. پس از رسیدن کدورت محیط به حدی که جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر در حدود ۰/۵ تا ۰/۶ بود، یک میلی لیتر از محیط را به عنوان نمونه قبل از القاء برداشته و جذب نوری آن را در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده و سپس از محلول IPTG استریل، مقدار لازم برای غلظت نهایی ۱ mM (یک میلی مولار) را تحت شرایط کاملاً استریل، در کنار شعله به لوله حاوی محیط کشت اضافه کرده و پس از خوب مخلوط کردن، لوله مجدداً تحت شرایط فوق بر روی انکوباتور متحرک قرار گرفت. پس از گذشت ۴ و ۲ و ۸ ساعت از زمان القاء، میزان جذب نوری یک میلی لیتر از محیط کشت، در

طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد. از مرکاپتواتانل (2ME) در بافر نمونه استفاده شد و پروتئین موردنظر احیاء شده و در نتیجه باند دی سولفیدی جدا شد.

تایید بیان آنتی بادی نو ترکیب با استفاده از روش سنجش وسترن بلات (Western

(Blotting)

روش کار:

۱. در یک ژل ۱۲٪ کوچک SDS-PAGE، نمونه های قبل و پس از القاء در کنار نشانگر وزن مولکولی و کنترل مثبت (Actylase) به داخل هر چاهک منتقل گردید. پس از انجام الکتروفورز ژل خارج شده و قسمت Stacking آن جدا شد.

۲. کاغذ نیتروسولوز که به اندازه ژل بریده شده، به همراه فیلترهای کاغذی و ژل، درون بافر انتقال دهنده قرار داده شد.

۳. Pad های کاغذی لازم جهت قرار دادن ژل روی دستگاه semidry را از آب مقطر خارج نموده و درون بافر انتقال قرار داده شد.

۴. سطح دستگاه Semidry را به طور کامل با آب مقطر شسته و سپس خشک شد.

۵. سپس ابتدا یک Pad، روی سطح دستگاه قرار داده، آنگاه کاغذ نیتروسولوزی روی آن قرار می گیرد و با استفاده از پی پت پاستور تمام حباب های هوای بین این دو سطح خارج می گردد. سپس ژل بر روی کاغذ نیتروسولوز قرار گرفته و به همین ترتیب حباب های هوا خارج می گردد. در مرحله بعد Pad دیگری روی ژل قرار داده و بعد از خارج نمودن حباب های هوا درب دستگاه بسته می شود.

۶. سپس ولتاژ دستگاه روی ۱۵ و زمان انتقال روی ۳۵ دقیقه تنظیم شده و دستگاه روشن شد.

۷. بعد از اتمام کار دستگاه کاغذ نیتروسولوز خارج و در محلول پانسو-اس قرار می گیرد. سپس مکان باندهای پروتئینی و شاخص وزن مولکولی که در این محلول رنگ آمیزی شده است با مداد علامت گذاری شد.

۸. با دو بار شستشو بوسیله آب مقطر، نمونه ها رنگبری شد.

۹. سپس غشا کاغذی درون Blocking Agent که در اینجا 3% BSA می باشد قرار می گیرد و ظرف مربوطه به مدت ۱۶ ساعت در ۴- درجه سانتی گراد قرار داده شد.

۱۰. کاغذ از محلول بلوک کننده خارج و ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با بافر شستشو (Tween در PBS با غلظت (۵/۰:۱۰۰۰)، شستشو داده شد.

۱۱. غشا در آنتی سرم اختصاصی (6721abcam) HRP anti His tag antibod به مدت ۱ ساعت انکوبه می گردد. (آنتی بادی به نسبت ۱:۱۰۰۰ در PBS تهیه شده است).

۱۲. سپس غشا مربوطه ۳ بار و هر بار ۱۰ دقیقه با محلول شستشو (Tween در PBS با غلظت ۵/۰:۱۰۰۰) شستشو داده شد.

۱۳. در این مرحله محلول DAB اضافه می شود (این محلول باید بصورت تازه تهیه شده باشد). پس از ظاهر شدن باند های پروتئینی، واکنش بلافاصله با آب مقطر متوقف گردید.

تخلیص آنتی بادی نوترکیب با استفاده از سیستم کروماتوگرافی تمایلی

به دلیل وجود His•Tag fusion proteins، در طراحی سکانس ژن، پروتئین مورد نظر با استفاده از ستون های کروماتوگرافی تمایلی از بقیه پروتئین های موجود در سلول های *E.coli* تخلیص گردید.

ابتدا ستون کروماتوگرافی Ni-TED حاوی رزین های مخصوص His.Tag دو مرتبه با Washing buffer (2ml) (25 mM Imidiasol) +18 ml PBS1x elution buffer شستشو داده شد. نمونه های آماده شده سوپرناتانت باکتری به ستون اضافه شدند تا محتویات ستون به آهستگی خارج شود. این مرحله دوبار تکرار شد. در ادامه ستون با ۱۰ CC بافر شستشو دهنده شستشو داده شد. ۱۰ برابر حجم رزین داخل ستون از بافر شستشو دهنده استفاده شد. ۲ CC Elution buffer (0.085 gr imidiazol +5ml PBS 1x 250mM imidiazol) به ستون اضافه شد و

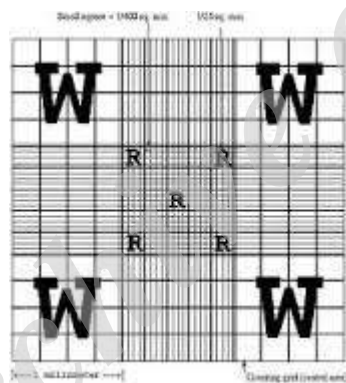
محتویات ستون در لوله های استریل جمع آوری شدند. این محتویات شامل قطعه آنتی بادی تخلیص شده بود.

لازم به ذکر است خالص سازی پروتئین مربوطه از انستیتوپاستور ایران به صورت خدمات انجام شد.

بررسی عملکرد آنتی بادی و بقاء سلول ها پس از تیمار با آن:

شمارش سلولی:

شمارش سلولی به این صورت انجام شد: 10 μ l تریپان بلو و 10 μ l از سوسپانسیون سلولی به یک ول از پلیت ۹۶ خانه منتقل و بعد از پیپتاژ کامل، 10 μ l از نمونه به لام نئوبار منتقل و زیر میکروسکوپ مشاهده شد.



شکل ۲: لام نئوبار جهت شمارش سلولی

تعداد سلول های زنده در هر ۴ سوی خانه های ۱۶ تایی (قسمت های W در شکل) شمارش و میانگین گرفته شد.

محاسبه تعداد سلول های زنده در 1ml سوسپانسیون سلولی به این صورت انجام شد:

$$\text{میانگین تعداد سلول های زنده} \times 2 \text{ (ضریب رقت)} \times 10^4 \text{ (ضریب حجم)}$$

رده سلولی و کشت سلول:



رده ی سلولی سرطان پستان انسانی SKBR3 (MUC1+) و رده سلولی خونی Jurkat (CD3+) که از مرکز ملی ذخایر ژنتیک ایران تهیه شدند، در محیط RPMI1640 (powder, Gibco, 31800-022) و ۱۰ درصد سرم تازه ی جنین گاوی (FBS) (۱۰ qualified, US origin, Gibco, 26140095) و رده سلولی سالم (MCF10A) به عنوان کنترل در محیط (DMEM:Hams F12 + 5% سرم اسب + 2mM L-glutamine, انسولین 10µg/ml, + 0.5 µg/ml Hydrocortison + 20µg/ml EGF(Epithelial growth factor) + 100ng/ml سم وبا)

در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO₂ کشت داده شدند.

بررسی اتصال نانوبادی به آنتی ژن (in vivo Binding Study)

در این مرحله، توانایی اتصال نانوبادی تولید شده در باکتری به آنتی ژن MUC-1 در سلول سرطان پستان انسانی SKBR3 با روش فلوسیتومتری بررسی شد.

تعداد 6×10^5 سلول SKBR3 در هر تیوب از نمونه ها ریخته شد و پس از ۲ بار شست و شو با 200µl PBS.FBS4%، سانتریفیوژ گردید. به تیوب ها 1000µl از محیط 4% FBS.PBS اضافه گردید. به تیوب تست 200µl نانوبادی ضد MUC-1 (4µg/ml)، به تیوب کنترل منفی 200µl PBS 1X اضافه شد. تمامی نمونه ها به مدت over night در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، نمونه ها با دور 1200rpm و در ۴ درجه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سوپ رویی دور ریخته شد. سپس ۲ بار با 4% FBS.PBS شست و شو داده شدند. در مرحله بعد به نمونه ها ۲۰۰µl از آنتی بادی (anti His tag antibody FITC conjugate (abcam 1206) با رقت ۱:۲۵۰ اضافه شد و ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید. پس از اتمام انکوباسیون، نمونه ها ۲ بار طبق مرحله قبل با 4% FBS.PBS شسته شدند و در نهایت محتویات هر میکروتیوب به لوله های فلوسیتومتری حاوی یک میلی لیتر PBS- (4% FBS) اضافه گردید و میزان fluorescent staining سلول ها با دستگاه فلوسیتومتری خوانده شد و آنالیز داده ها توسط نرم افزار 2.4 Flowmax® آن انجام شد.

بررسی تکثیر سلولی با استفاده از روش MTT

این تست به منظور بررسی فعالیت عملکردی نانوبادی با فعالیت دوگانه MUC1-CD3 در از بین بردن سلول های SKBR3 با واسطه نانو بادی (MUC1-CD3) ضد مارکر MUC1 و افزایش پرولیفیریشن سلولهای Jurkat به واسطه سر CD3 دار نانوبادی طراحی شده انجام گردید. برای انجام این تست و به دست آوردن بهترین غلظت سلولی و بررسی تعداد سلول مناسب رقت سازی انجام شد.

در این تست سه رده سلولی انتخاب شد که به صورت سه بار تکرار از هر سلول (SKBR3 و MCF10A, Jurcat) در نظر گرفته شد. بعد از شمارش سلولی و برداشتن حجم مورد نیاز ۵۰۰۰ سلول در حجم ۲۰۰ میکرولیتر در هر ول، جمعا ۵ ول در مورد SKBR3، ۵ ول در مورد Jurcat و ۵ ول در مورد MCF10A از یک پلیت ۹۶ خانه انتخاب شد. نمونه ها در رقت های مختلف ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲ (300µg/ml, 150µg/ml, 37/5µg/ml, 4/6µg/ml, 0/29µg/ml, 0/009µg/ml) و از آنتی بادی به هر میکروتیوب تست اضافه شد و سپس داخل هر ول از پلیت ۹۶ خانه به ریخته شد. نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور (۳۷ درجه سانتی گراد، ۵٪ CO₂) انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون سلول ها با آنتی بادی، در هر خانه از پلیت کشت سلول ۲۲ µl محلول MTT ریخته شد. بعد از ۳ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C کریستال های فورمازن تشکیل شده در ۱۰۰ µl DMSO حل شد و بعد از گذشت ۵ تا ۱۰ دقیقه جذب نوری نمونه ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با طول موج تصحیح ۶۳۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر خوانده و اندازه گیری شد. کنترل نیز با شرایط مشابه تهیه شد با این تفاوت که هیچ گونه مداخله ای روی سلول ها انجام نشد. تعداد تکرار برای هر نمونه ۳ بار بود. بقا نسبی سلول نسبت به نمونه کنترل با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\% \text{ Viability} = ([\text{OD}]_{\text{test}} / [\text{OD}]_{\text{control}}) \times 100$$

به طوری که [OD]test جذب نمونه مورد آزمایش و [OD]control جذب نمونه کنترل است.

بررسی آماری و مقایسه نمونه ها برای مشخص شدن معنی دار بودن یا نبودن گروه ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و 16 COMPUSYN انجام شد.

بررسی آپوپتوز سلولی (Apoptosis):

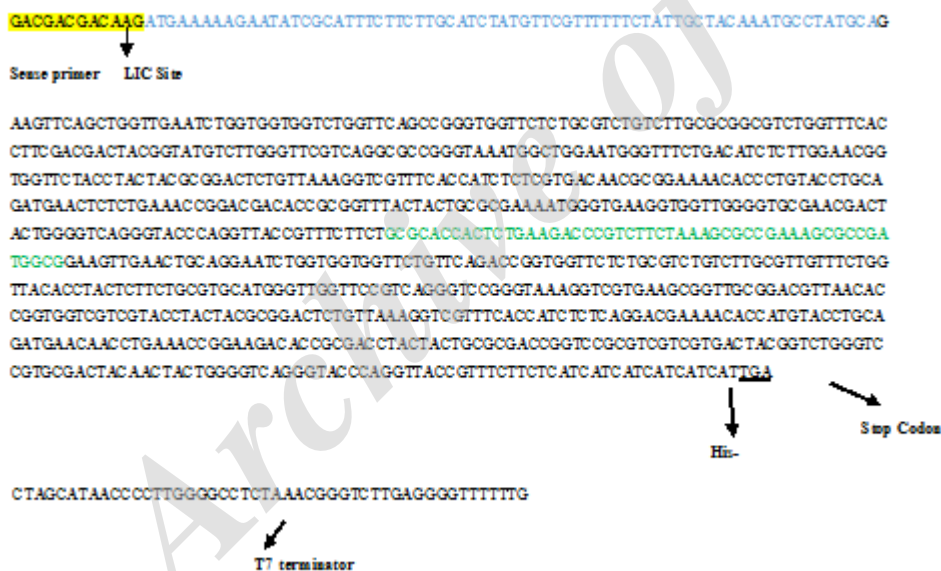
آپوپتوز با استفاده از کیت FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری تعیین گردید. 1×10^6 سلول در هر گروه سلول استفاده شد. یک گروه سلول SKBR3 به عنوان تست و یک گروه سلول MCF10A (کنترل منفی) در نظر گرفته شد. سپس به هر دو گروه ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی MUC1-CD3 اضافه و نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور انکوبه شدند و سپس بعد از شستشو با نمک بافر فسفات محتوی ۴ درصد سرم جنین گاوی (PBS.FBS4%) در غلظت نهایی 1×10^6 بافر اتصال دهنده موجود در کیت Annexin V Binding Buffer معلق شدند و سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از آنها جدا شدند و در یک تیوب ۵ میلی لیتر تست ریخته شد سپس ۵ میکرو لیتر از FITC Annexin V و ۵ میکرو لیتر از 7-AAD به نمونه ها اضافه شد و بعد به آرامی سلول ها ورتکس شدند و برای ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شدند. در آخر ۴۰۰ میکرو لیتر از Annexin V Binding Buffer به نمونه ها اضافه شد و با دستگاه فلوسایتومتری آنالیز داده ها انجام گردید. در کلیه مراحل جهت جلوگیری از آپوپتوز ناشی از نور، تیوب ها در فویل آلومینیومی پیچیده شدند.

فصل چهارم
یافته‌های تحقیق

طراحی ساختار Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody

همانطور که در شکل (۲) نشان داده شده است سکانس مربوط به نانوبادی مورد نظر در یک کاست ژنی وارد شده

است.



شکل ۲: سکانس مربوط به نانوبادی با فعالیت دوگانه MUC1-CD3



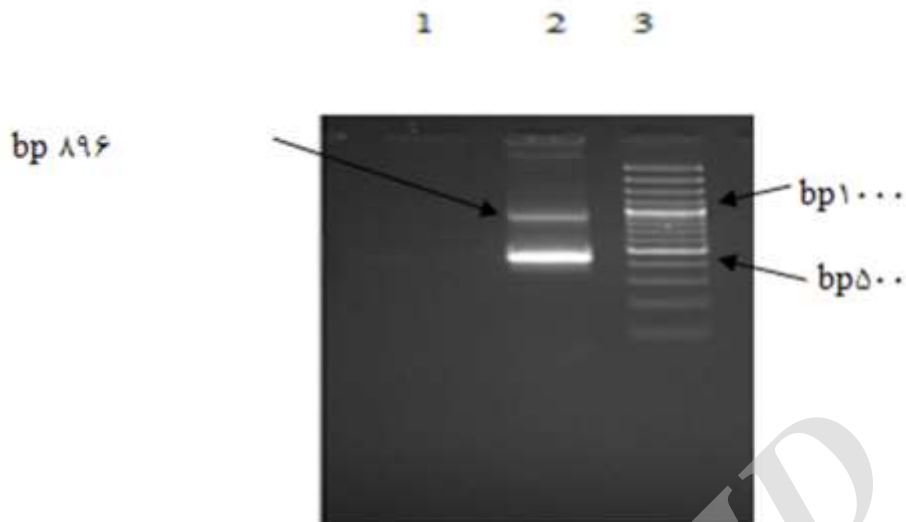
زرد: LIC overhang

ابی: Signal peptide

سبز: Linker

واکنش PCR به منظور تکثیر و جداسازی ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody

۱. واکنش PCR طبق روش استاندارد ذکر شده انجام شد. نتیجه به دست آمده نشان دهنده تکثیر یک قطعه ۸۹۶ جفت بازی بود که همان ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody است (شکل ۳). باند حدود ۵۰۰ یک باند غیر اختصاصی است که با توجه به اینکه دو نانوبادی پشت سر هم قرار گرفته است وجود این باند غیر اختصاصی دور از انتظار نیست و با توجه به اینکه این نانوبادی پیور شده مشکلی از این بابت وجود ندارد.



شکل ۳: نتیجه PCR ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody بر روی ژل آگارز ۱/۵٪.

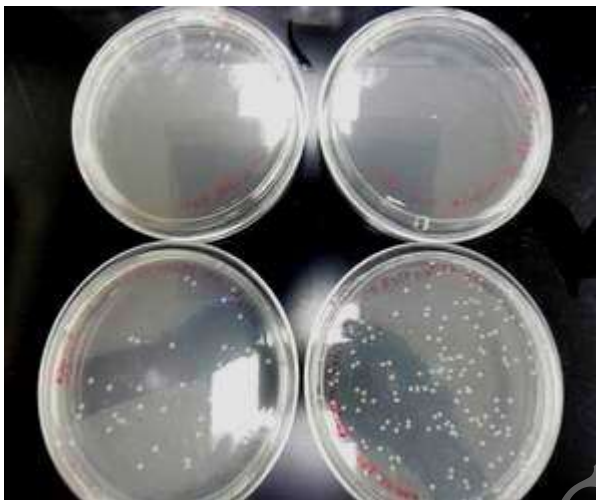
ستون ۱: کنترل منفی، ستون ۲: محصول PCR و ستون ۳: Marker DNA

کلونینگ محصول PCR در حامل pET-32 Ek-LIC

با استفاده از سیستم LIC به طور مستقیم محصول PCR به حامل متصل شد. با توجه به اینکه اگر در این سیستم

insert وارد وکتور T نشود، وکتور Self ligate نمی شود می توان نتیجه گرفت تمام کلونی های حاصل حاوی قطعه ما

بودند(شکل ۴).

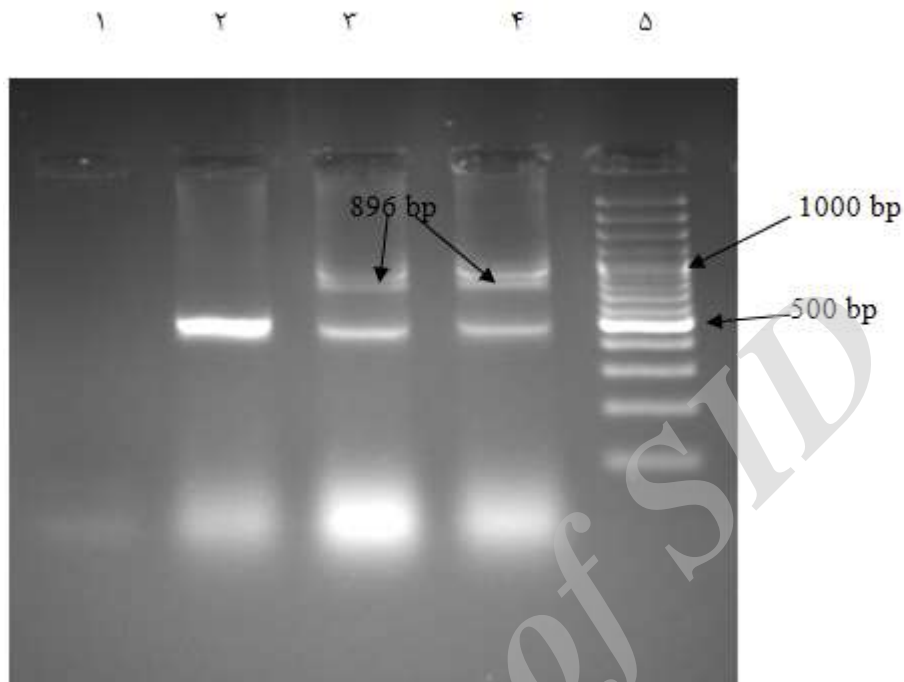


شکل ۴: کلونینگ محصول PCR در حامل pET-32 Ek-LIC

تایید کلونینگ ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody در pET-32 Ek-LIC با

روش Colony PCR

۲. نتیجه Colony PCR از کلونی های موجود در محیط ماتریکس تهیه شده، قطعه حدود ۸۹۶ جفت بازی که همان ژن سنتز شده ما بود را نشان داد (شکل ۵). **باند حدود ۵۰۰ یک باند غیر اختصاصی است که با توجه به اینکه دو نانو بادی پشت سر هم قرار گرفته است وجود این باند غیر اختصاصی دور از انتظار نیست و با توجه به اینکه این نانوبادی پیور شده مشکلی از این بابت وجود ندارد.**



شکل ۵ نتیجه Colony PCR مربوط به کلونینگ ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody

ستون شماره ۱ کنترل منفی، ستون شماره ۳ و ۴ مربوط به مربوط به کلنی مثبت و ستون شماره ۵ Marker DNA

تایید کلونینگ ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody در PET-32 Ek-LIC با

استفاده از روش تعیین ترادف (Sequencing)

به منظور تایید نهایی کلونینگ ژن Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody و نیز تایید سکانس ژن

کلون شده حامل/ PET-32 Ek-LIC Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody جهت تعیین ترادف به شرکت

پیشگام ارسال شد. نتیجه تعیین ترادف در ضمیمه ۱ نشان داده شده است.



القاء بیان پروتئین Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody

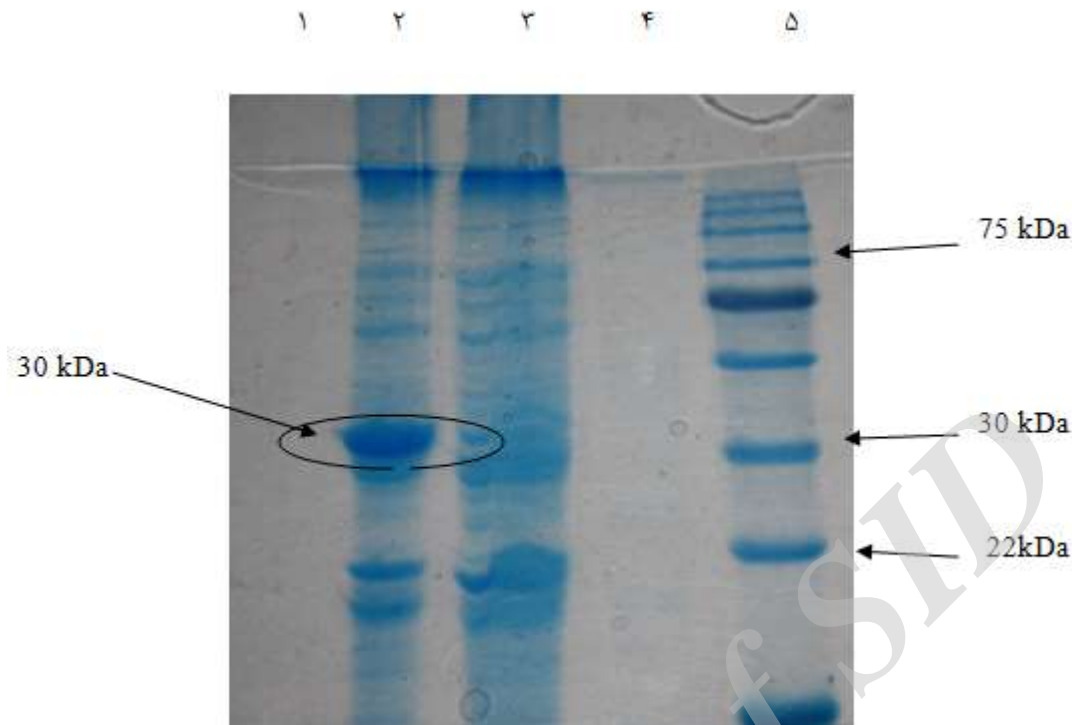
القاء بیان آنتی بادی نو ترکیب در محیط مایع، با IPTG با غلظت یک میلی مولار (mM1) براساس روش ذکر شده در قسمت روش کار در صورت گرفت و میزان جذب نوری محیط، قبل و بعد از القاء بیان پروتئین به صورت جدول ۴-۱ بود.

جدول ۱۹ جذب نوری ۶۰۰ نانومتر محیط کشت LB مایع، قبل و بعد از القاء بیان پروتئین

نمونه	قبل از القاء	۲ ساعت پس از القاء	۴ ساعت پس از القاء
۱	۰/۴۷	۱/۶۸	۲/۹
۲	۰/۴۴	.۸۸	۲/۷
۳	۰/۵	۱/۹	۱/۳
۴	۰/۶	۱/۹۸	۲/۱
۵	۰/۳۹	۱/۲	۳/۲۸
۶	۰/۴۶	۱/۳	۲/۷۱

بررسی بیان آنتی بادی نو ترکیب با روش Reduced SDS-PAGE

پس از تهیه ژل SDS-PAGE ۱۲٪ براساس روش ذکر شده و انتقال ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه به آن، پس از رنگ آمیزی ژل با روش کوماسی بلو، باندهای مورد انتظار ۳۰ کیلو دالتونی مشاهده شد (شکل ۶).



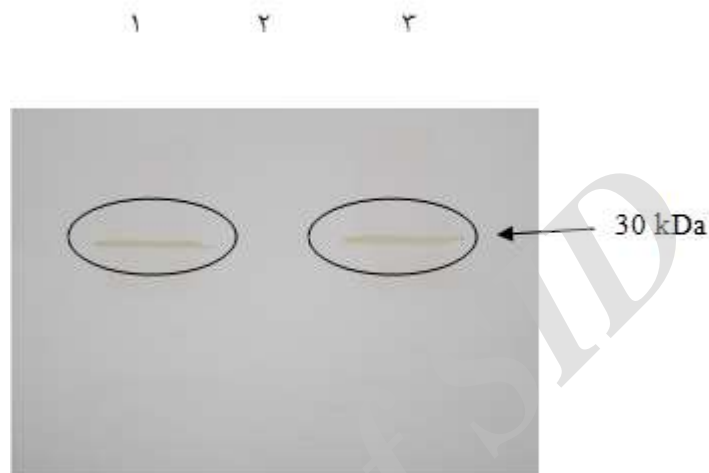
شکل ۶: نتایج بیان Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody با روش Reduced SDS-PAGE

ستون ۲ نمونه ۴ ساعت پس از القاء بیان، ستون ۳ نمونه قبل از القاء بیان و ستون ۵ مارکر پروتئینی.

نتایج تایید بیان آنتی بادی نو ترکیب Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody با استفاده از روش Western Blot

پروتئین هایی که در مرحله قبل بوسیله SDS-PAGE از لحاظ اندازه از یکدیگر جدا شده بودند، با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ به غشا نیترو سلولزی منتقل شدند. طی واکنش بین آنتی بادی و آنتی ژن یک باند در محدوده ۳۰ کیلو دالتون مربوط به پروتئین مورد نظر ظاهر گردید. نتایج مشاهده شده در شکل ۷

حضور باند پروتئینی مشاهده شده در سوپرناتانت سلولی به روش SDS-PAGE را تایید کرد.

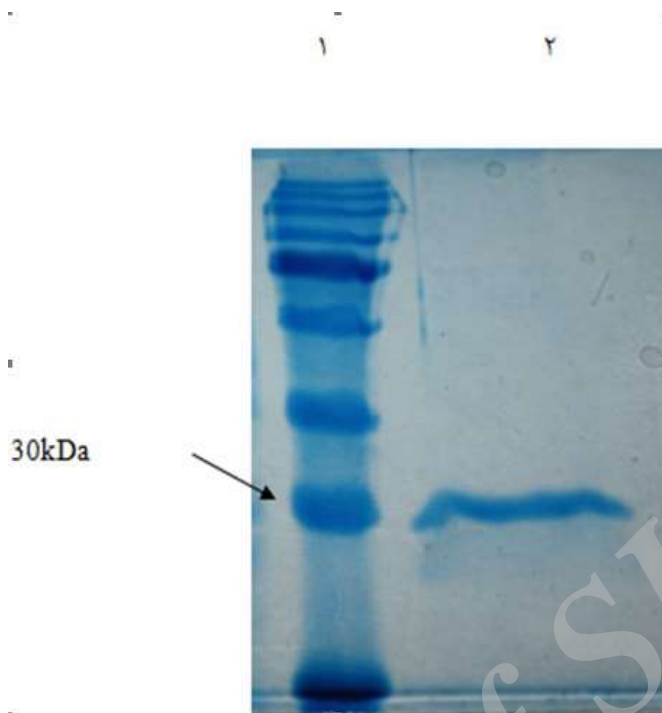


شکل ۷ نتیجه وسترن بلاتینگ آنتی بادی نوترکیب Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody

ردیف ۱ و ۳: سلول بیان کننده پروتئین مورد نظر در ساعت سوم بعد از القا بیان که به صورت دوپلیکت انجام شده است. ردیف ۲ نمونه قبل از القای بیان (به عنوان کنترل).

نتیجه تخلیص آنتی بادی نوترکیب Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody با استفاده از سیستم کروماتوگرافی تمایلی

همانطور که در شکل ۸ مشخص است تخلیص آنتی بادی نوترکیب Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody به روش کروماتوگرافی تمایلی، در حد بسیار خوب انجام شده است.



شکل ۸ نمونه تخلیص شده با ستون کروماتوگرافی

ستون شماره ۱: مارکر پروتئینی، ستون شماره ۲: نمونه مربوط به Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody تخلیص شده.

تعیین میزان Bispecific Anti MUC1 & CD3 Nanobody از طریق میزان جذب نوری در

طول موج ۲۸۰ نانومتر

غلظت پروتئین در محلول با توجه به روش ذکر شده در قسمت روشهای عمومی با دستگاه اسپکتوفتومتر

BIOCHROM مارک محاسبه گردید، میزان قطعه آنتی بادی نو ترکیب تولید شده به میزان ۶۵۰-۹۰۰ $\mu\text{g/ml}$ محاسبه

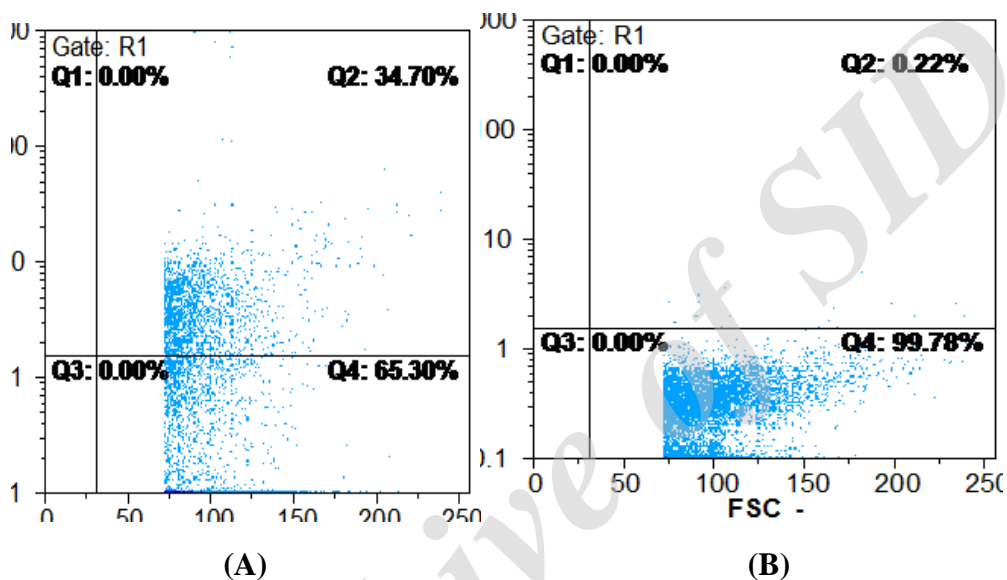
شد.

نتایج حاصل از بررسی اتصال آنتی بادی (MUC1-CD3) به آنتی ژن MUC1 سطح سلول سرطان

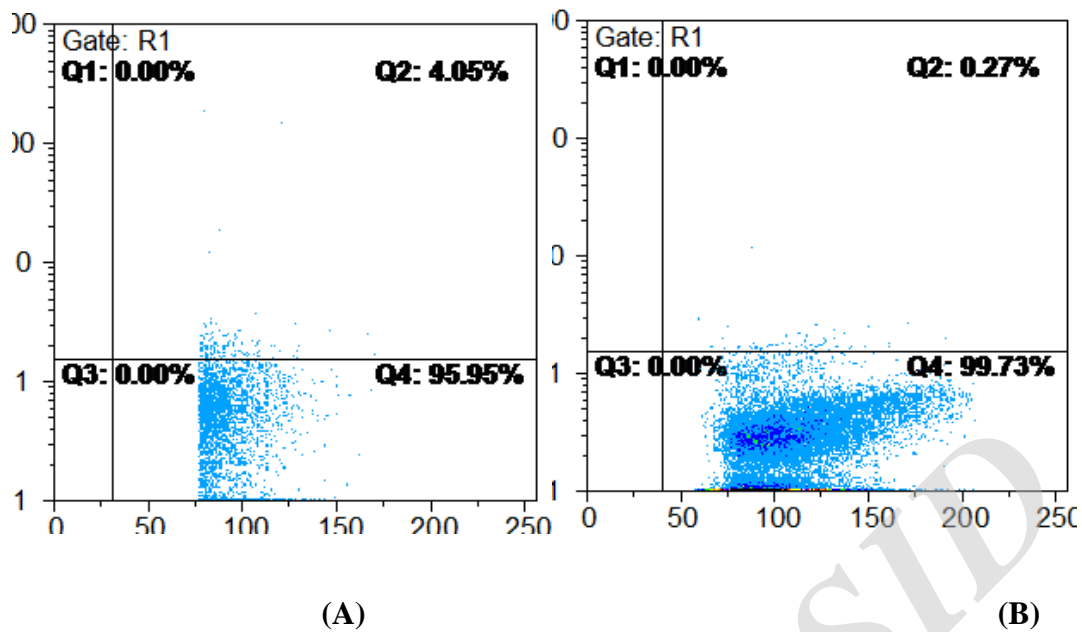
پستان (Binding study)

نتایج به دست آمده از این بررسی نشان داد که سلول های SKBR3 بر خلاف MCF10A (رده سلولی

سالم) توسط آنتی بادی ضد (MUC1-CD3) و کنژوگه فلورسنت ضد آن (Anti 6X Histag (FITC) رنگ شدند. همانطور که در شکل ۹ (A) مشاهده می شود در رده ی سلولی SKBR3، نمونه ی کنترل منفی درصد اتصال نزدیک صفر را نشان داد، اما در نمونه ی تست با غلظت ۴ میکروگرم آنتی بادی این اتصال به ۳۴ درصد رسید. در رده ی سلولی MCF10A در شکل ۹ (B) که سلول کنترل منفی می باشد در نمونه ی تست با غلظت ۴ میکروگرم آنتی بادی ۴ درصد اتصال و در نمونه ی کنترل منفی اتصال در حد صفر مشاهده شد.



شکل ۹-مقایسه ی درصد اتصال آنتی بادی ضد MUC1-CD3 به مارکر سطحی MUC1 در رده ی سلولی SKBR3 (A) و نمونه ی کنترل منفی بدون آنتی بادی (B) نمونه ی تست با غلظت ۴ میکروگرم آنتی بادی ضد MUC1-CD3، که نشان دهنده ی درصد اتصال بیشتر در نمونه ی همراه با آنتی بادی می باشد.



شکل ۱۰- مقایسه ی درصد اتصال آنتی بادی MUC1-CD3 به مارکر سطحی MUC1 در رده ی سلولی (سلول سالم) (A. MCF10A) نمونه ی کنترل منفی بدون آنتی بادی. (B) نمونه ی تست با غلظت ۴ میکروگرم آنتی MUC1، که تفاوت معنی داری در درصد اتصال بین دو نمونه همراه با آنتی بادی و فاقد آنتی بادی نشان داده نشد.

Q4 سلول های متصل نشده، Q2 سلول های متصل شده به نانوبادی MUC1-CD3



تست	کنترل منفی	سلول
(4میکروگرم آنتی بادی ضد MUC1)		
٪۳۴/۷۰	٪۰/۲۲	SKBR3
٪۴/۰۵	٪۰/۲۷	MCF10A

مقایسه ی درصد اتصال آنتی MUC1 به مارکر سطحی MUC1 در رده های سلولی (MUC1+SKBR3), (سلول

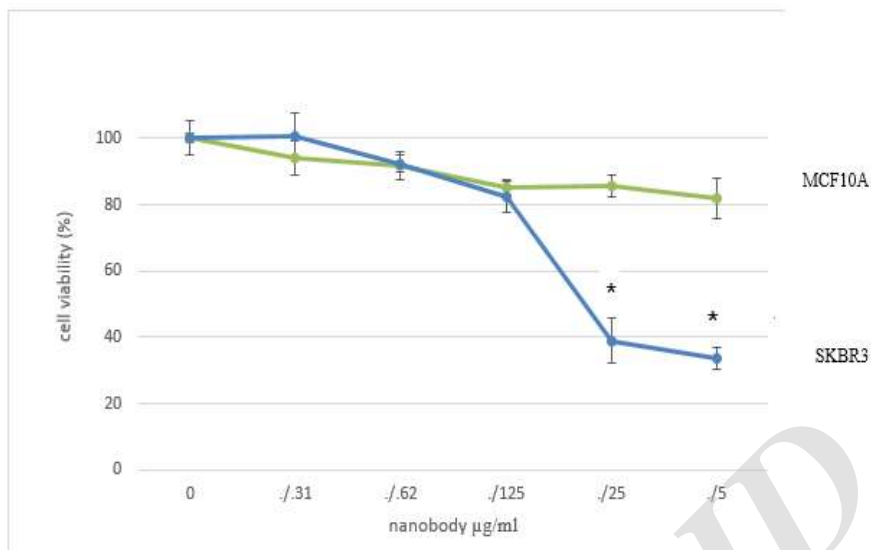
سالم) MCF10A. تفاوت درصد اتصال به آنتی بادی مورد نظر بین هر دو سلول به خوبی مشاهده شد.



بررسی درصد سلول های زنده ی تیمار شده با نانو بادی MUC1-CD3:

پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته سلولهای توموری با نانو بادی MUC1-CD3، بین درصد بقای سلولهای SKBR3 به عنوان گروه تست در مقایسه با سلولهای گروه کنترل منفی (MCF10A) تفاوت معنی داری مشاهده شد. در حالی که سلولهای MCF-10A در برابر تیمار با غلظتهای مختلف نانوبادی میزان مرگ بسیار پایینی داشتند، سلولهای SKBR3 زنده ی کمتری در تیمار با نانوبادی مورد نظر باقی ماندند. همانطور که نمودار ذیل نشان داده شد، کاهش در میزان سلولهای زنده SKBR3 با افزایش غلظت نانوبادی رابطه مستقیم دارد. میزان غلظت نانوبادی که دارای اثر کشندگی بر روی ۵۰٪ کل جمعیت سلولها است (IC50)، پس از ۴۸ ساعت تیمار، در حدود 0.3 ± 0.07 بود.

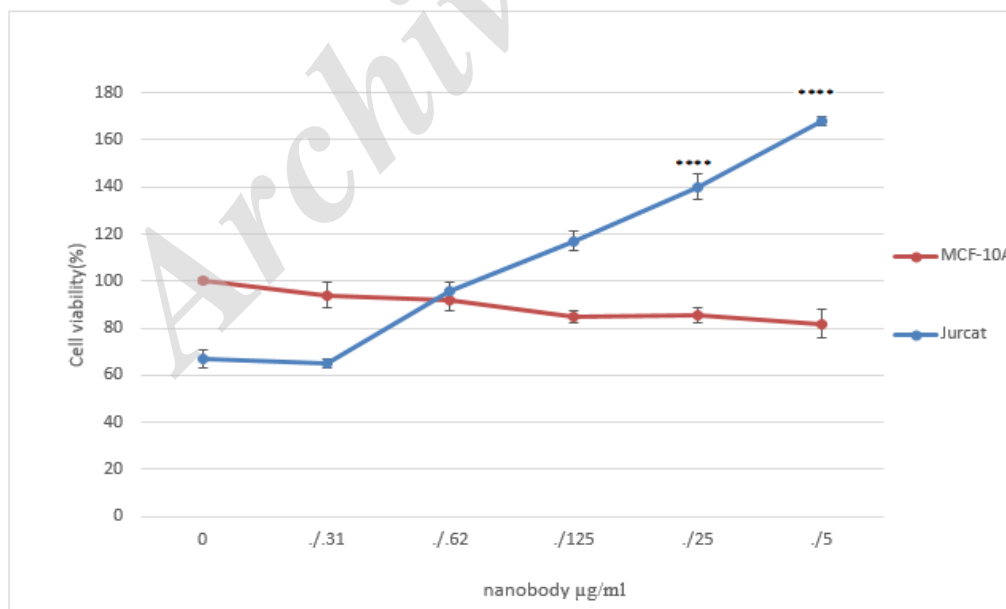
مقایسه ی بین سلول های Jurcat (CD3+) و سلولهای گروه کنترل منفی MCF-10A در تیمار ۴۸ ساعته بانانوبادی نشان داد که حضور نانوبادی در محیط کشت سلولهای Jurcat، موجب افزایش در تکثیر این سلولها نسبت به نمونه کنترل شد.



شکل ۱۰ مقایسه ی میزان جذب حاصل از نمونه های تست و کنترل منفی در رده های سلولی SKBR3 و MCF10A.

کاهش معنادار در میزان جذب در سطح $P\text{-Value} < 0.05$ در نمونه ی تست رده ی سلولی SKBR3 در مقایسه

با نمونه ی کنترل منفی این رده ی سلولی کاهش را در میزان بقا نشان داد.

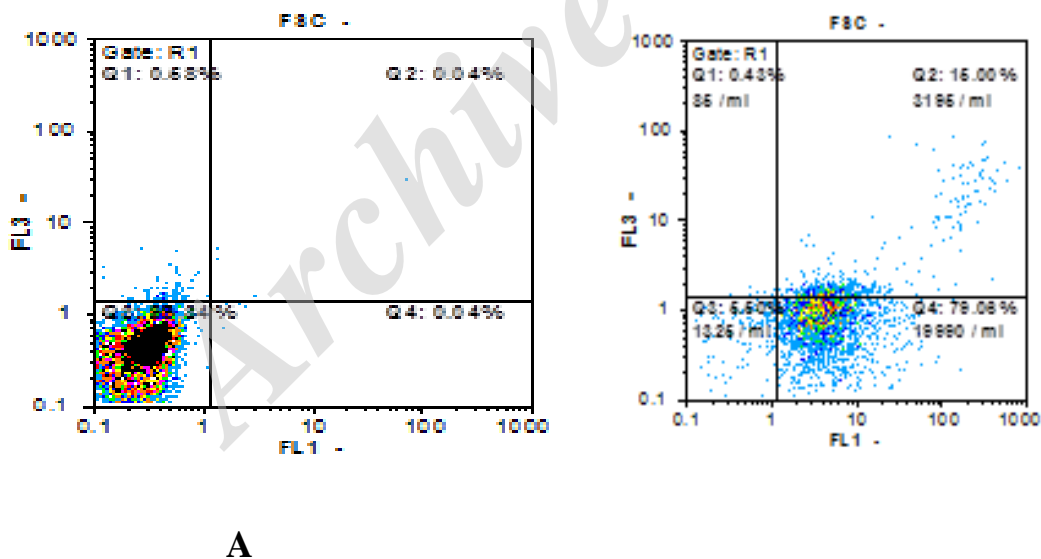


شکل ۱۱ مقایسه ی میزان جذب حاصل از نمونه های تست JURKAT و کنترل منفی MCF10A.

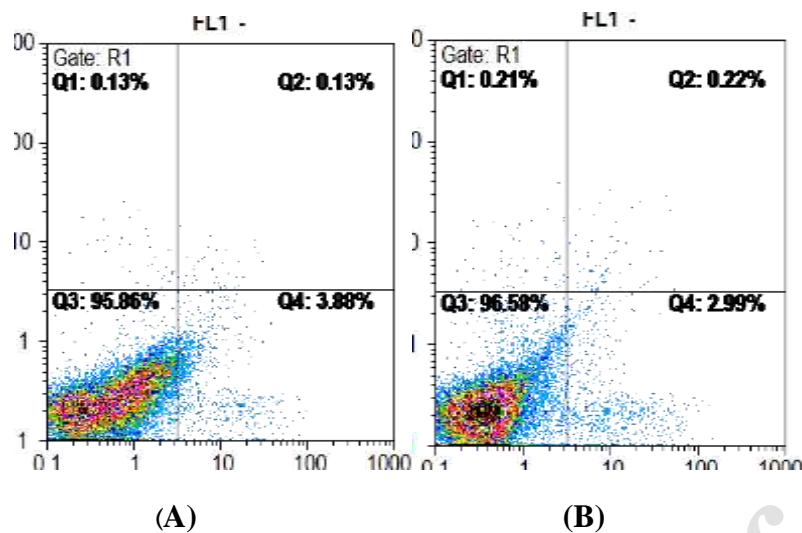
نمودار میزان جذب در نمونه ی سلولهای تست نسبت به نمونه ی کنترل منفی را نشان می دهد که در رده ی سلولی JURKAT افزایش جذب نمونه ی تست نسبت به کنترل منفی که نشان دهنده ی افزایش در میزان تکثیر سلولها می باشد، به طور معناداری قابل مشاهده است.

بررسی آپوپتوز سلولی:

نتایج به دست آمده از فلوسایتومتری در بررسی مرگ سلول های سرطانی با آنتی بادی ضد MUC1 در رده ی سلولی SKBR3 ۷۹% مرگ سلولی را در مقابل نمونه ی کنترل منفی MCF10A نشان داد، بیشترین مرگ سلولی در حضور آنتی بادی (MUC1-CD3) مربوط به آپوپتوز اولیه و ۰.۸ / ۷۹٪، آپوپتوز ثانویه و ۱۶٪ درصد می باشد و در صد نکروز پایین و در حدود ۴۳/۰٪ مشاهده شد (شکل ۱۲).



شکل ۱۲-مقایسه ی میزان آپوپتوز، نکروز و در نهایت مرگ سلولی بین نمونه های A (کنترل منفی، B) تست در حضور آنتی بادی در رده ی سلولی SKBR3(MUC1+). مرگ سلولی معنی داری تحت تاثیر آنتی بادی مشاهده می شود.



شکل ۱۲- مقایسه ی میزان آپوپتوز، نکروز و در نهایت مرگ سلولی بین نمونه های A (کنترل منفی، B) تست در حضور آنتی بادی در رده ی سلولی MCF10A (سلول سالم). تفاوت معنی داری مربوط به مرگ سلولی بین نمونه ها مشاهده نشد.

Q1 نکروز، Q2 آپاپتوز ثانویه، Q3 کنترل، Q4 آپاپتوز اولیه

Anexin محور FLX و 7add بر روی محور FL3 است.

فصل پنجم تجزیه و تحلیل

یافته های تحقیقی

Archive of SID

واقعیت این است که روشهای قدیمی درمان سرطان مانند شیمی درمانی و رادیو تراپی علاوه بر ناکارآمد بودن در بسیاری از انواع سرطان، با عوارض جانبی زیادی همراه بوده و هزینه بالایی را به بیماران تحمیل می کنند. دانشمندان به این نتیجه رسیده اند که به جای استفاده از روشهای معمول باید به دنبال هدف درمانی (Targeted therapy) سرطان بود که علاوه بر موثر بودن و عملکرد اختصاصی بر علیه گیرنده های سلولهای سرطانی عوارض جانبی کمتری داشته باشد [۳۰].

نتایج بررسیها نشان می دهد که در سالهای اخیر استفاده از هدف درمانی سرطان به طور گسترده ای افزایش یافته است و نتایج بسیار رضایت بخش و موفقیت آمیز بوده است، که از جمله آنها میتوان به استفاده از مونوکلونال آنتی بادیهای انسانی نو ترکیب اشاره کرد. با توجه به اثراتی که از آنتی بادیهای نو ترکیب مشاهده شده است، چه در زمینه تشخیص و چه در زمینه درمان بیماریها، این بخش از صنعت داروسازی به عنوان یکی از مهم ترین بخش های رو به رشد مطرح بوده و بازار مناسبی برای آن در آینده در نظر گرفته می شود. بر اساس گزارش شرکت ارتباطات تجاری بازار جهانی، درآمد حاصل از تولید آنتی بادی های درمانی و تشخیصی در سال ۲۰۰۵ حدود ۱۵ میلیارد دلار بوده است. همچنین با توجه به ارائه فرآورده های جدید از آنتی بادی های درمانی و گسترش کاربرد فرآورده های موجود در سال های پیش رو، به نظر می رسد که ارزش بازار این فرآورده ها با رشد متوسط سالانه ۱۱/۵ درصد در سال ۲۰۱۲ به ۳۱ میلیارد دلار برسد. لازم به ذکر است طراحی روش و فراهم آوری زیر ساختهای تولید قطعات مختلف آنتی بادی های نو ترکیب می تواند به عنوان زمینه ای در جهت تولید داروهای مختلف و متفاوت بر مبنای امکانات و روشهای طراحی شده مذکور به کار رود. این روشها امروزه جایگزین سنتزهای شیمیایی داروها با استفاده از تکنولوژی و امکانات تجدید ناپذیر گرانتیمت شده اند. با وجود کاربردهای زیاد این داروها، این ترکیبات در کشور تولید نمی شوند و در این صورت ملزم به وارد کردن این ترکیبات از کشورهای تولید کننده آنها هستیم. متأسفانه هزینه واردات این داروها بسیار بالاست و این یکی از مشکلاتی است که بیماران در مصرف این گروه داروها با آن مواجه اند. از آنجایی که نفوذپذیری قطعات آنتی بادی به بافت سرطانی بهتر از آنتی بادی کامل صورت می گیرد در صورتی که هدف دسترسی بهتر دارو به بافت سرطانی باشد پیشنهاد می شود از قطعات آنتی بادی به جای

آنتی بادی کامل استفاده شود. با گذشت تقریباً ۲۰ سال از کشف تصادفی آنتی بادی های زنجیره سنگین عجیب در شترها، نانوبادی ها از یک مورد تحت تکامل داروینی به ملکولی با محدوده وسیعی از کاربردهای بیوفناورانه و پزشکی تبدیل شدند. در مطالعات متعددی، خصوصیات توزیع زیستی مطلوب نانوبادی ها شامل نفوذ به بافت های متراکم و حذف سریع از طریق کلیه، مورد تأکید قرار گرفت. این مزایا باعث می شود تا از نانوبادی ها برای تشخیص تومور ها و انتقال مواد کشنده سلول استفاده گردد. همچنین ثابت شده است که نانوبادی ها برای خنثی سازی پروتئین های خارج سلولی نظیر سموم، سایتوکاین ها بسیار مفید هستند و در درمان بیماری های مختلفی شامل: بیماری های التهابی، اختلالات خونی، آنکولوژی و آلزایمر استفاده می شوند. قطعات آنتی بادی می توانند با حذف بخش Fc آنتی بادی به وسیله حذف آنزیمی [۷۶] و یا به وسیله بیان در میزبان دلخواه ایجاد شوند. [۷۷] یکی از مشکلات مهم در بیان آنتی بادی ها شکل گیری مناسب پروتئین ها بعد از بیان است [۷۸]. Jaenicke و همکارانش نشان دادند که باندهای دی سولفیدی به فرم های مختلفی در ساختار پروتئین ممکن است ایجاد شود که تعداد این اشکال متفاوت بستگی به تعداد سیستمین در ساختار پروتئین دارد که با افزایش تعداد باند دی سولفیدی احتمال افزایش فرم های هتروژن افزایش می یابد [۷۹].

تا به امروز نزدیک به ۵۰ ساختار نانوبادی های مختلف در پایگاه های اطلاعاتی وجود دارد که تقریباً همه این ساختارها فولدینگ بسیار مشابهی با دمین متغیر زنجیره سنگین آنتی بادی انسان دارند. استراتژی های مختلفی برای بیان پلی پپتیدها از جمله آنتی بادی ها وجود دارد. Flamez و همکارانش دو زنجیره ی سبک و سنگین آنتی بادی را در دو پلازمید جدا کلون کردند. در مطالعه ای دیگر Buchner و همکارانش زنجیره سبک و سنگین آنتی بادی را در یک ساختار Poly cistronic وارد کردند [۸۰]. همچنین Simmons و همکارانش از یک ساختار Seprate cistronic برای کلون کردن زنجیره های آنتی بادی استفاده کردند [۸۱]. درمان با آنتی بادی ها نیازمند تجویز دوزهای بالای آنتی بادی در یک دوره طولانی مدت است و علیرغم تلاش های زیاد برای تولید این آنتی بادی ها در سیستم های گیاهی و باکتریایی هنوز هم سلول های پستانداران میزبان اولیه آنهاست که مستلزم زمان و هزینه زیادی است، اما برخلاف آنتی بادی ها، نانوبادی ها به راحتی در سیستم های میکروبی تولید میشوند. سطوح بالای بیان آنها در میزبان های باکتریایی مثل *E. Coli*، *Pichia pastoris* و ساکارومیسیس سرویسیه اثبات شده است [۸۲، ۸۳].

۲-۳ برابر مقرون به صرفه تر بودن هزینه تولید نانوبادی در میزبان های میکروبی، مزیت کلیدی این سیستم در مقایسه با سیستم های بیانی پستانداران می باشد.

با توجه به مزایای این سیستم از جمله ساده تر بودن و کنترل بهتر پروموتور در این مطالعه از این روش استفاده شد. در این مطالعه نشان داده شده است که *E.coli* می تواند جایگزین مناسبی برای تولید نانو بادی نو ترکیب باشد.

نتیجه گیری:

با توجه به مزایای این سیستم از جمله ساده تر بودن و کنترل بهتر پروموتور در این مطالعه از این روش استفاده شد. در این مطالعه نشان داده شد که *E.coli* می تواند جایگزین مناسبی برای تولید نانو بادی نو ترکیب باشد.

در این پروژه دو نانوبادی در یک ساختار و به طور همزمان در سیستم LIC که یک روش ساده و کار آمد برای کلونینگ است و برخلاف بسیاری از روش های دیگر این روش به خالص سازی، آنزیم های محدود الاثر، هضم و اتصال نیاز ندارد کلون شد و در میزبان مقرون به صرفه تولید شد. این نانوبادی با فعالییت دو گانه دو گیرنده مهم در سرطان را مورد هدف قرار میدهد.

گیرنده MUC1 که با افزایش بیان آن در بسیاری از انواع سرطان به اثبات رسیده و گیرنده CD3 که جایگاه مهم و ویژه ای در سیستم ایمنی بر علیه سلول های توموری دارد. بررسی نتایج سلول های کنترل منفی نشان داد که این نانوبادی اثر سو بر روی سلول های سالم ندارد و تاثیر آن روی سلول های توموری و ایمنی حاکی از موثر بودن آن در از بین بردن سلول های سرطانی و تحریک سیستم ایمنی بود.

امید است که در آینده با انجام مطالعات تکمیلی از جمله مطالعات حیوانی بتوانیم قدمی موثر در راستای پژوهش های موثر در درمان سرطان برداریم.



پیشنهادات:

- ۱- بررسی عملکرد نانوبادی تولید شده MUC1-CD3 در مدل حیوانی
- ۲- بررسی اثر ارتباط نانو بادی MUC1-CD3 در میزان بیان گیرنده HER2 در پاسخ به درمان در نمونه ها
- ۳- بررسی اثر نانوبادی در از بین رفتن مقاومت به درمان با آنتی بادی های ضد گیرنده Her2 مثل هرسپتین
- ۴- بررسی آنتی ژنسیسته و ایمیونوژنسیسته نانو بادی MUC1-CD3 در انسان

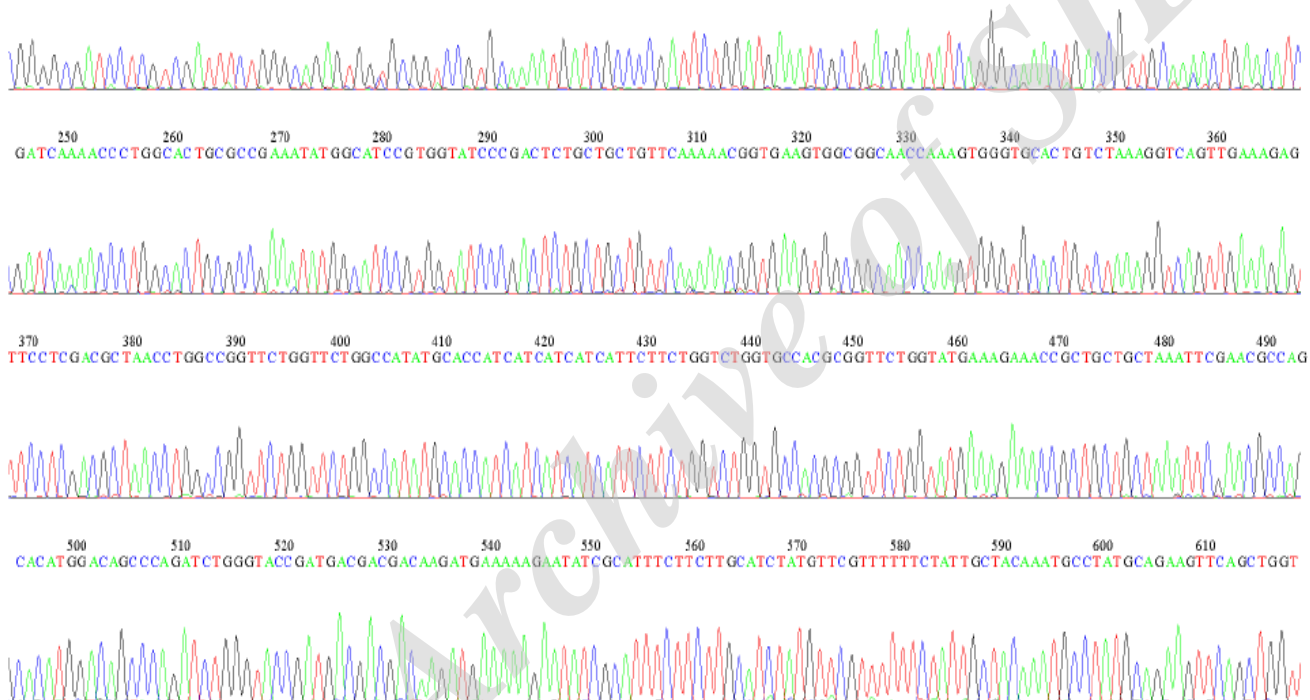
Archive of SID



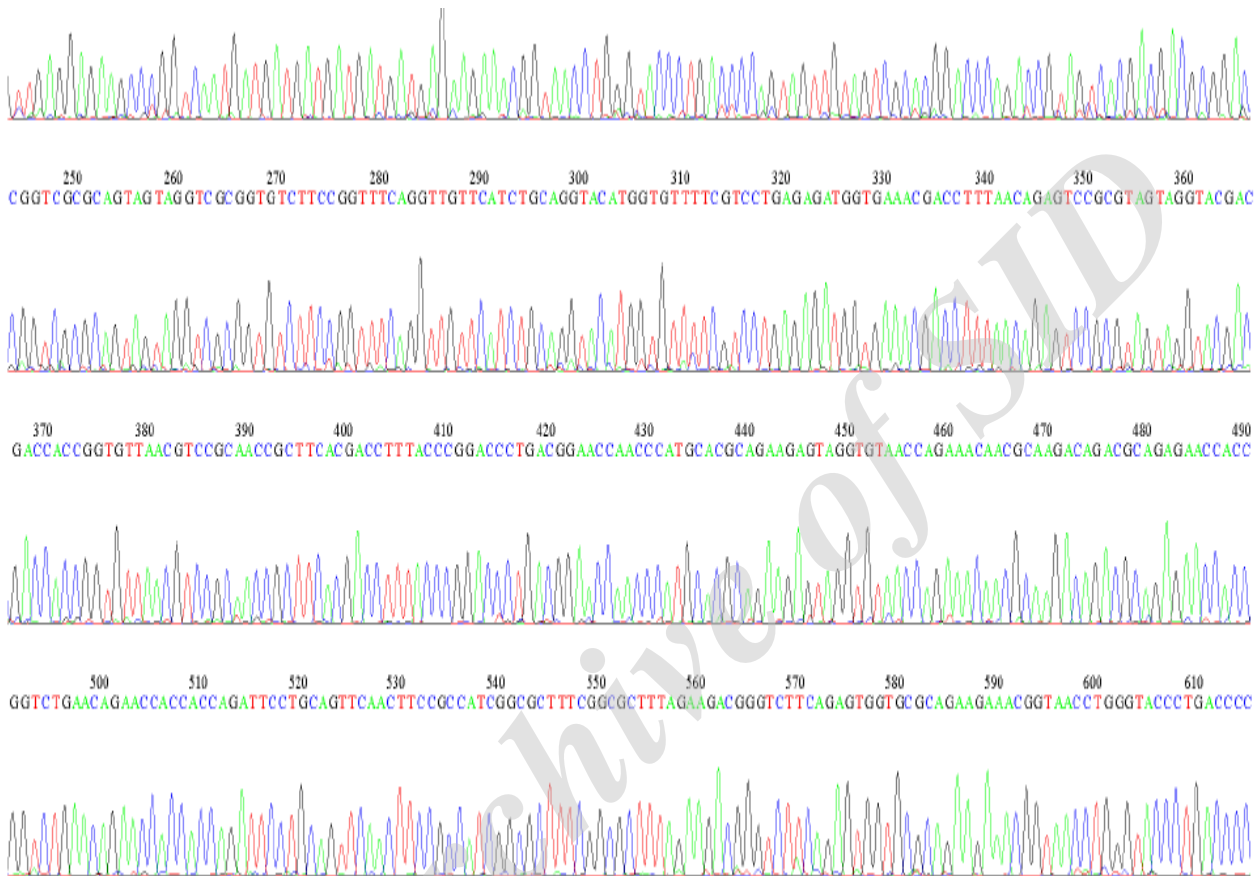
ضمایم:

ضمیمه ۱

MUC1 F:



MUC1 R:



منابع:

- ۱ Hughes, S.S., *Making dollars out of DNA. The first major patent in biotechnology and the commercialization of molecular biology, 1974-1980*. Isis, 2001. 92(3): p. 541-75.
- ۲ Walsh, G. and D.R. Headon, *Protein biotechnology*. 1994: John Wiley & Sons.
- ۳ Metcalf, D., *Control of granulocytes and macrophages: molecular, cellular, and clinical aspects*. Science, 1991. 254(5031): p. 529-533.
- ۴ Hagen, F.S. and K. Kaushansky, *Colony-stimulating factor derivatives*. 1996, Google Patents.
- ۵ Baneyx, F., *Recombinant protein expression in Escherichia coli*. Current opinion in biotechnology, 1999. 10(5): p. 411-421.
- ۶ Makrides, S.C., *Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli*. Microbiol Rev, 1996. 60(3): p. 512-38.
- ۷ Balbas, P. and F. Bolivar, *Design and construction of expression plasmid vectors in Escherichia coli*. Methods Enzymol, 1990. 185: p. 14-37.
- ۸ Venturini, C., et al., *Multiple antibiotic resistance gene recruitment onto the enterohemorrhagic Escherichia coli virulence plasmid*. The FASEB Journal, 2010. 24(4): p. 1160-1166.
- ۹ Cornelis, P., *Expressing genes in different Escherichia coli compartments*. Current opinion in biotechnology, 2000. 11(5): p. 450-454.
- ۱۰ Makrides, S.C., *Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli*. Microbiological reviews, 1996. 60(3): p. 512-538.
- ۱۱ Dalbøge, H., et al., *A Novel Enzymatic Method for Production of Authentic hGH from an Escherichia Coli produced hGH-Precursor*. Nature biotechnology, 1987. :p. 161-164.
- ۱۲ Talmadge, K. and W. Gilbert, *Cellular location affects protein stability in Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982. 79(6): p. 1830-1833.
- ۱۳ Gray, G.L., et al., *Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in Escherichia coli: natural and bacterial signal sequences are interchangeable*. Gene, 1985. 39(2): p. 247-254.
- ۱۴ Sandkvist, M. and M. Bagdasarian, *Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria*. Current opinion in biotechnology, 1996. 7(5): p. 505-511.
- ۱۵ Blight, M.A., C. Chervaux, and I.B. Holland, *Protein secretion pathways in Escherichia coli*. Current opinion in biotechnology, 1994. 5(5): p. 468-474.
- ۱۶ Borrero, J., et al., *Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria*. Journal of biotechnology, 2011. 156(1): p. 76-86.
- ۱۷ Guo, X., et al., *Recognition of signal peptide by protein translocation machinery in middle silk gland of silkworm Bombyx mori*. Acta biochimica et biophysica Sinica, 2008. 40(1): p. 38-46.
- ۱۸ Inouye, S., et al., *Role of positive charge on the amino-terminal region of the signal peptide in protein secretion across the membrane*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982. 79(11): p. 3438-3441.
- ۱۹ Hannig, G. and S.C. Makrides, *Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli*. Trends in Biotechnology. 16(2) :p. 54-60.

- ۲۰ Nilsson, B., et al., *Secretion incompetence of bovine pancreatic trypsin inhibitor expressed in Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 1991. 266(5): p. 2970-2977.
- ۲۱ Auclair, S.M., M.K. Bhanu, and D.A. Kendall, *Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins*. Protein Sci, 2012. 21(1): p. 13-25.
- ۲۲ Karamyshev, A.L., et al., *Processing of Escherichia coli alkaline phosphatase: role of the primary structure of the signal peptide cleavage region*. Journal of molecular biology, 1998. 277(4): p. 859-870.
- ۲۳ Pratap, J. and K. Dikshit, *Effect of signal peptide changes on the extracellular processing of streptokinase from Escherichia coli: requirement for secondary structure at the cleavage junction*. Molecular and General Genetics MGG, 1998. 258(4): p. 326-333.
- ۲۴ Fikes, J.D., et al., *Maturation of Escherichia coli maltose-binding protein by signal peptidase I in vivo. Sequence requirements for efficient processing and demonstration of an alternate cleavage site*. Journal of Biological Chemistry, 1990. 265(6): p. 3417-23.
- ۲۵ van de Vijver, M.J., *Biological variables and prognosis of DCIS*. The Breast, 2005. 14(6): p. 509-519.
- ۲۶ Sampson, J., J. Granady, and A. Chubb, *A Clinical Review of Four Types of Breast Tumors: Observed in the Surgical Wards of Freedmen's Hospital, Washington, DC*. Journal of the National Medical Association, 1920. 12(3): p. 12.
- ۲۷ Fang, L., et al., *Targeted therapy in breast cancer: what's new*. Swiss Med Wkly, 2011. 141: p. w13231.
- ۲۸ Uehara, T., et al., *Prognostic impact of the history of breast cancer and of hormone therapy in uterine carcinosarcoma*. International Journal of Gynecological Cancer, 2012. 22(2): p. 280-285.
- ۲۹ Syvak, L., et al., *[Modern principles of chemotherapy of metastatic breast cancer]*. Likars' ka sprava/Ministerstvo okhorony zdorov'ia Ukrainy, 2010(1-2): p. 70-75.
- ۳۰ Zagar, T.M. and L.B. Marks, *Breast cancer radiotherapy and coronary artery stenosis: Location, location, location*. Journal of Clinical Oncology, 2012. 30(4): p. 350-352.
- ۳۱ Matsushita, T., *Engineered therapeutic antibodies with enhanced effector functions: Clinical application of the Potelligent(R) Technology*. Korean J Hematol, 2011. 46(3): p. 148-50.
- ۳۲ Tsurushita, N., P.R. Hinton, and S. Kumar, *Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax*. Methods, 2005. 36(1): p. 69-83.
- ۳۳ Arafat, W.O., et al., *Effective single chain antibody (scFv) concentrations in vivo via adenoviral vector mediated expression of secretory scFv*. Gene Ther, 2002. 9(4): p. ۲۵۶-۲۶۲.
- ۳۴ Chowdhury, P.S. and H. Wu, *Tailor-made antibody therapeutics*. Methods, 2005. 36(1): p. 11-24.
- ۳۵ Raag, R. and M. Whitlow, *Single-chain Fvs*. FASEB J, 1995. 9(1): p. 73-80.
- ۳۶ Hudson, P.J. and C. Souriau, *Engineered antibodies*. Nat Med, 2003. 9(1): p. 129-34.
- ۳۷ Fenton, C. and C.M. Perry, *Spotlight on gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukaemia*. BioDrugs, 2006. 20(2): p. 137-9.



- ۳۸ Segal, D.M., G.J. Weiner, and L.M. Weiner, *Bispecific antibodies in cancer therapy*. *Curr Opin Immunol*, 19 (۵) ۱۱ . ۹۹p. 558-62.
- ۳۹ Chames, P. and D. Baty, *Bispecific antibodies for cancer therapy*. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2009. 12(2): p. 276-283.
- ۴۰ Holt, L.J., et al., *Domain antibodies: proteins for therapy*. *Trends in biotechnology*, 2003. 21(11): p. 48۴۹۰,-۴
- ۴۱ Reff, M.E. and C. Heard, *A review of modifications to recombinant antibodies: attempt to increase efficacy in oncology applications*. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2001. 40(1): p. 25-35.
- ۴۲ Riechmann, L. and S. Muyldermans, *Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains*. *Journal of immunological methods*, 1999. 231(1): p. 25-38.
- ۴۳ Holliger, P. and P.J. Hudson, *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*. *Nature biotechnology*, 2005. 2 (۹) ۳p. 1126-1136.
- ۴۴ Vincke, C. and S. Muyldermans, *Introduction to heavy chain antibodies and derived Nanobodies*, in *Single Domain Antibodies*. 2012, Springer. p. 15-26.
- ۴۵ Muyldermans, S., *Single domain camel antibodies: current status*. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 2001. 74(4): p. 277-302.
- ۴۶ Coppieters, K., et al., *Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(6): p. 1856-66.
- ۴۷ Harmsen, M.M., et al., *Passive immunization of guinea pigs with llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease*. *Vet Microbiol*, 2007. 120(3-4): p. 193-206.
- ۴۸ Arbabi Ghahroudi, M., et al., *Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies*. *FEBS letters*, 1997. 414(3): p. 521-526.
- ۴۹ Van der Linden, R., et al., *Comparison of physical chemical properties of llama V_H antibody fragments and mouse monoclonal antibodies*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1999. 1431(1): p. 37-46.
- ۵۰ Vu, K.B., et al., *Comparison of llama V_H sequences from conventional and heavy chain antibodies*. *Molecular immunology*, 1997. 34(16): p. 1121-1131.
- ۵۱ Lauwereys, M., et al., *Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies*. *The EMBO journal*, 1998. 17(13): p. 3512-3520.
- ۵۲ Padlan, E.A., *A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties*. *Molecular immunology*, 1991. 28(4-5): p. 489-498.
- ۵۳ Cattaneo, A. and S. Biocca, *The selection of intracellular antibodies*. *Trends in biotechnology*, 1999. 17 (۳)p. 115-121.
- ۵۴ Arafat, W., et al., *Effective single chain antibody (scFv) concentrations in vivo via adenoviral vector mediated expression of secretory scFv*. *Gene therapy*, 2002. 9(4): p. 256-262.
- ۵۵ Dekker, S., et al., *Intracellularly expressed single-domain antibody against p15*

- matrix protein prevents the production of porcine retroviruses.* Journal of virology, 2003. 77(22): p. 12132-12139.
- ۵۶ Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter, " *Diabodies*": *small bivalent and bispecific antibody fragments*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. 90(14): p. 6444-6448.
- ۵۷ Conrath, K.E., et al., *Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs.* Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(1): p. 7346-7350.
- ۵۸ Zhang, J., et al., *A pentavalent single-domain antibody approach to tumor antigen discovery and the development of novel proteomics reagents.* Journal of molecular biology, 2004. 341(1): p. 161-169.
- ۵۹ Cheung, K., C. Graves, and J. Robertson, *Tumour marker measurements in the diagnosis and monitoring of breast cancer.* Cancer treatment reviews, 2000. 26(2): p. 91-102.
- ۶۰ Taylor-Papadimitriou, J., et al., *MUC1 and cancer.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease: (۲) ۱۹۹۹, p. 301-313.
- ۶۱ Taylor-Papadimitriou, J., et al., *MUC1 and the immunobiology of cancer.* Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2002. 7(2): p. 209-221.
- ۶۲ Norum, L.F., et al., *New immunoassays for MUC1 in breast cancer.* Tumor biology, 2001. 22(4): p. 216-222.
- ۶۳ Bjerner, J., et al., *MUC1 serum assays in breast cancer: tumor specificities and reference levels.* Tumor biology, 2003. 23(6): p. 315-323.
- ۶۴ Patton, S., S.J. Gendler, and A.P. Spicer, *The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes, 1995. 1241(3): p. 407-423.
- ۶۵ Elston, C. and I. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.* Histopathology, 1991. 19(5): p. 403-410.
- ۶۶ Hanisch, F.-G. and S. Müller, *MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin.* Glycobiology, 2000. 10(5): p. 439-449.
- ۶۷ Mukhopadhyay, P., et al., *Mucins in the pathogenesis of breast cancer: implications in diagnosis, prognosis and therapy.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2011. 1815(2): p. 224-240.
- ۶۸ Bjerner, J., et al., *MUC1 serum assays in breast cancer: tumor specificities and reference levels.* Tumor biology, 2002. 23(6): p. 315-323.
- ۶۹ Pugsley, T., F. Berruti, and A. Chakma, *Computer simulation of a novel circulating fluidized bed pressure-temperature swing adsorber for recovering carbon dioxide from flue gases.* Chemical engineering science, 1994. 49(24): p. 4465-4481.
- ۷۰ Molina, R., et al., *c-erbB-2 oncoprotein, CEA, and CA 15.3 in patients with breast cancer: prognostic value.* Breast cancer research and treatment, 1998. 51(2): p. 109-119.
- ۷۱ Shering, S.G., et al., *Preoperative CA 15-3 concentrations predict outcome of patients with breast carcinoma.* Cancer, 1998. 83(12): p. 2521-2527.
- ۷۲ Goodrich, J.M., et al., *Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation.* New England Journal of Medicine, 1991. 325(23): p. 1601-1607.

- ۷۳ Kumpulainen, E.J., R.J. Kesikuru, and R.T. Johansson, *Serum tumor marker CA 15.3 and stage are the two most powerful predictors of survival in primary breast cancer*. Breast cancer research and treatment, 2002. 76(2): p. 95-102.
- ۷۴ Lipton, A., et al., *Elevated serum Her-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2002. 20(6): p. 1467-1472.
- ۷۵ Dijk, D.-J., J.F. Duffy, and C.A. Czeisler, *Contribution of circadian physiology and sleep homeostasis to age-related changes in human sleep*. Chronobiology international, 2000. 17(3): p. 285-311.
- ۷۶ Glennie, M.J., et al., *Preparation and performance of bispecific F(ab'gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab'gamma fragments*. The Journal of Immunology, 1987. 139(7): p. 2367-2375.
- ۷۷ Andersen, D.C. and D.E. Reilly, *Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments*. Current Opinion in Biotechnology, 2004. 15(5): p. 456-462.
- ۷۸ Knappik, A., C. Krebber, and A. Plückthun, *The effect of folding catalysts on the in vivo folding process of different antibody fragments expressed in Escherichia coli*. Bio/technology, 1993. 11(1): p. 77-83.
- ۷۹ Schmid, F. and T. Creighton, *Protein structure: a practical approach*. Protein Structure: A Practical Approach, 1989: p. 251-85.
- ۸۰ Buchner, J. and R. Rudolph, *Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in Escherichia coli*. Nature Biotechnology, 1991. 9(2): p. 157-162.
- ۸۱ Simmons, L.C., et al., *Expression of full-length immunoglobulins in Escherichia coli: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies*. Journal of immunological methods, 2002. 263(1): (p. 133-147.
- ۸۲ Frenken, L.G., et al., *Isolation of antigen specific Llama V_H antibody fragments and their high level secretion by Saccharomyces cerevisiae*. Journal of biotechnology, 2000. 78(1): p. 11-21.
- ۸۳ Harmsen, M. and H. De Haard, *Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments*. Applied microbiology and biotechnology, 2007. 77(1): p. 13-22.



Abstract:

Introduction: Cancer therapy based on antibodies and their different classes were caused to appear outstanding clinical results in improvement of patients suffering. Nanobodies are the variable single domain of camel antibodies. These smallest antigen binding fragments have unique advantages compared to the conventional therapeutic antibodies. MUC1 is overexpressed in more than 90% of breast cancers and correlates with metastasis and recurrence. Bi-specific Nanobodies, not only bind to antigen of cancer cell but also can stimulate cytotoxic T cells. In addition, it will have a synergistic effect on tumor cell eradication and deals with tumor escape.

Materials and Methods: In order to expression of nanobody in bacterial host, a gene cassette was designed that include the nanobody sequences of anti-CD3 and anti-MUC1. Two nanobodies were conjuncted by a IgG2 Lama hinge linker together. The aim of additional signal sequence at the beginning of construct was producing secreted proteins and histidine sequence due to purification was added at the end of construct. After cloning, construct was transformed into the bacterial host. Nanobody expression was done in bacteria and it was purified by chromatography. The ability of bispecific anti MUC1 nanobody produced by the bacterial host to inhibit the proliferation of human breast adenocarcinoma cell line SKBR3, which overexpresses MUC1, performed by MTT Cell Proliferation Assay. Also, immunomodulatory effect of anti-CD3 was assayed using Jurkat T cells, which overexpresses CD3 as well as performed for anti muc1 nanobody. Binding of anti MUC1× CD3 to the immunomodulatory effect cells SKBR3 and Jurkat T cells were determined by flow-cytometry. The abilities of anti MUC1 nanobody to induce apoptosis was measured via apoptosis detection kit.

Results: Bi-specific anti MUC1×CD3 nanobody was designed successfully. All stages of cloning and expression of nanobody were done appropriately in *E.coli*. Evaluation of protein concentration after purification indicated high level expression of nanobody in the bacterial host. The binding of bispecific anti MUC1× CD3 nanobody to the MUC1 and CD3 receptor was tested by measuring the dose-dependent effects on the proliferation of SKBR3 and Jurkat T cells respectively. It has been shown that anti MUC1 nanobody produced in *E.coli* can induce the apoptosis of SKBR3 cells.

Discussion: As compared to the other methods of producing antibody which are more expensive and time-consuming, bi-specific nanobody against MUC1 & CD3 may be more functional and effective in some host with economic cost. According to the individual



characteristics of nanobodies, after passing more developmental steps, it can be used in diagnosis and targeted therapy of cancer patients.

Key words: Bi-specific nanobody , MUC1, CD3 و targeted therapy

Archive of SID



جمهوری اسلامی ایران

Breast Cancer Research Center (BCRC)

Title:

Cloning and expression of anti MUC1& CD3 bispecific nanobody in bacterial host

Code:2327

Ref. No. of Research Ethics Committee :
IR.ACECR.IBCRC.REC.1394.26

Principal Investigator:

Rezvan Esmaeili, Leila Farahmand

Research group: Recombinant Protein

Date: May, 2016