

غنی سازی کتابخانه نمایش فاژی علیه سلول های سرطانی سینه به منظور جداسازی آنتی بادی های تک دومینی شتری شناساگر فاکتور رشد اپیدرمالی ۲

فاطمه رحیمی جمنانی^۱، فاطمه رهبری زاده^۲، محمد علی شکرگزار^۳، داوود احمدوند^۴، فریدون مهبودی^۵

چکیده

سابقه و هدف

ریزش مارکرهای سرطانی مانند HER2 از سطح سلول های سرطانی سینه، باعث مخفی ماندن آن ها از دید سلول های ایمنی می گردد. افزایش غلظت HER2 محلول (sHER2)، در نتیجه درمان سرطان سینه HER2⁺ و پاسخ به تراستوزومب، تاثیرگذار است. در همین راستا، آنتی بادی های تک دومینی شتری (VHH) به علت خصوصیات منحصر به فرد و توانایی بالا در شناسایی آنتی ژن، مواد هدفمند بسیار مؤثری در شناسایی sHER2 محسوب می گردند.

مواد و روش ها

در یک مطالعه تجربی، کتابخانه فاژی به دست آمده از دو شتر ایمن با انجام panning بر روی سلول های سرطانی فاقد HER2 و بیان کننده HER2، علیه آنتی ژن HER2 غنی گردید. میزان افینیتی چهار VHH به دست آمده به HER2، شناسایی sHER2 و اتصال به HER2 بر روی سلول های سرطانی سینه توسط VHH ها با الایزا مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

بعد از انجام panning بر روی سلول و الایزا، چهار VHH با اتصال قابل ملاحظه به HER2 در مقایسه با کنترل منفی شناسایی شدند. VHH های با افینیتی 10^{13} - 10^{12} ، توانایی بالایی نیز در شناسایی sHER2 (۲) میکروگرم در میلی لیتر) نشان دادند. در اتصال به HER2 در سطح سلول، آنتی بادی های (VHH) RR_۶ و RR_۴ بالاترین میزان اتصال (به ترتیب 0.33 ± 2 و $0.15 \pm 2/5$) به سلول SKBR3 (بیان کننده HER2) را در مقایسه با سلول فاقد HER2 (به ترتیب 0.17 ± 0.38 و 0.12 ± 0.4) نشان دادند.

نتیجه گیری

استفاده از VHH های اختصاصی HER2 برای سنجش sHER2 به عنوان بیومارکر، ارزیابی مناسبی از وضعیت HER2 در تومور اولیه و متعاقباً پاسخ به درمان می دهد.

کلمات کلیدی: ژن ها، HER2، سرطان سینه

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۸

۱- PhD بیوتکنولوژی دارویی - استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران

۲- مؤلف مسئول: PhD بیوشیمی بالینی - دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی - دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱

۳- PhD فرآورده های بیولوژیک - دانشیار بانک سلولی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران

۴- PhD بیوشیمی پزشکی - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران

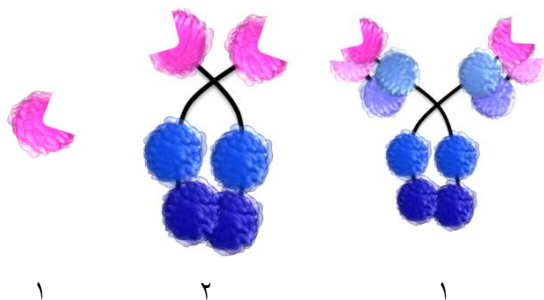
۵- PhD ایمونولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران

مقدمه

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

بعد از گذشت ربع قرن از ساخت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، امروزه آنتی‌بادی به عنوان یکی از پرکاربردترین عوامل درمانی علیه انواع بیماری‌های انسانی از جمله سرطان، محسوب می‌شود. آنتی‌بادی‌های نو ترکیب بیش از ۳۰٪ داروهای بیولوژیک را در آزمون‌های بالینی تشکیل می‌دهند و پیش‌بینی شده است که فروش آنتی‌بادی‌ها به حدود ۳۰ بیلیون دلار در سال‌های اخیر برسد (۷)، (۶). در سال ۱۹۹۳ نوع منحصر به فردی از آنتی‌بادی‌های فاقد زنجیره سبک در سرم انواع شترهای یک کوهانه و لاما شناسایی شد (شکل ۱) (۸). آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری (VHH = Variable domain of camel heavy-chain)

(antibody) به علت اختصاصیت، افینیتی بالا و اندازه کوچک برای مورد هدف قرار دادن آنتی‌ژن‌ها در مکان‌های مسدود نظیر تومورها که نفوذ دارو به آن‌ها به علت وضعیت نامناسب عروقی مشکل می‌باشد، بسیار مناسب هستند (۹، ۸). VHH‌ها از لحاظ ایمنی‌زایی بسیار ضعیف می‌باشند به طوری که در مطالعه‌های بالینی، تجویز مکرر آن‌ها منجر به هیچ پاسخ ایمنی سلولی یا همورالی قابل توجهی نشده است (۱۰، ۸). آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری بسیاری علیه انواع آنتی‌ژن‌های سرطانی از جمله MUC1 (MUCin1)، EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)، VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) و اندوگلین تولید شده‌اند که با نتایج امید بخشی در مهار سلول‌های سرطانی همراه بوده‌اند (۱۰-۱۲).



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

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

مواد و روش‌ها

تکثیر کتابخانه و تخلیص ذرات فازای:

در یک مطالعه تجربی کتابخانه فازای pComb3X قطعه

cDNA آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به دست آمده از شترهای ایمن شده با عصاره بافت‌های سرطانی سینه انسانی، علیه آنتی‌ژن HER2 بر روی سلول‌های سرطانی سینه غنی گردید (۱۶، ۱۷). بدین ترتیب که ابتدا ۲۰ میکرولیتر از کتابخانه ژنی شتری به ۵ میلی‌لیتر محیط حاوی باکتری *E. coli* TG1 (استراتاژن) در وضعیت رشد لگاریتمی ($OD_{600}=1$) افزوده شد. ناقل فازمیدی pComb3X دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد به همین منظور ۸ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در دو نوبت و به فاصله ۳۰ دقیقه اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر فاژ کمکی M13KO7 (GE Healthcare) دارای ژن مقاومت به کانامایسین اضافه و انکوباسیون به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محتویات لوله‌های حاوی باکتری‌های دارای فاژ به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد و حجم به ۲۵ میلی‌لیتر افزایش یافت. آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کانامایسین برای حجم مورد نظر اضافه گردید و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت صورت گرفت. محتویات ارلن به لوله‌های سانتریفوژ انتقال یافت و سانتریفوژ (۳۸۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه) انجام شد. فازهای موجود در مایع‌رویی با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰، نمک کلرید سدیم ۲/۵ مولار در آب (روی یخ) و سانتریفوژ (۱۸۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه)، رسوب داده شدند. فازهای تغلیظ شده بر روی دیواره با ۱ میلی‌لیتر شیر خشک بدون چربی در فسفات بافر سالین (۴٪) (MPBS = Skim Milk in phosphate - buffered saline) شسته و جمع‌آوری شدند.

غنی‌سازی کتابخانه فاژی با انجام *panning* بر روی سلول:

روند *panning* سلولی با (cfu/mL) ۱۰۱۴ از فاژ بر روی سلول‌های فاقد آنتی‌ژن HER2 (HepG2) و سپس بیان‌کننده آنتی‌ژن HER2 (SKBR3 = Human breast cancer cell) آغاز شد. سلول‌های HepG2 و SKBR3 (بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) در فلاسک‌های ۷۵ سانتی‌متر مربع دارای محیط DMEM (جی‌بی‌کو)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰

میکروگرم در میلی‌لیتر) و گلوتامین (۲ میلی‌مولار) کشت داده و بعد از رسیدن به تراکم ۹۰٪، تریپسینه (۰/۰۲۵٪ تریپسین در EDTA وزنی/حجمی) شدند. بعد از شمارش سلول‌ها با لام نئوبار و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو، $10^6 \times 2/6$ سلول HepG2 و $10^6 \times 1/4$ سلول SKBR3 (در ۱ میلی‌لیتر MPBS (۵٪))، به فالكون ۱۵ انتقال داده و بلاکینگ به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انجام شد. بعد از سانتریفوژ (۱۰۰۰ دور به مدت ۴ دقیقه)، مایع رویی را دور ریخته و رسوب سلولی HepG2 با کتابخانه فاژی تکثیر یافت و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. انکوباسیون سلول‌های HepG2 با کتابخانه فاژی، جهت حذف فازهای غیراختصاصی می‌باشد. سلول‌های HepG2 (منفی) و SKBR3 (مثبت) سانتریفوژ شدند، مایع رویی سلول منفی به رسوب سلول مثبت انتقال یافت و انکوباسیون به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انجام شد. لوله حاوی سلول‌های مثبت سانتریفوژ (۱۰۰۰ دور به مدت ۴ دقیقه) شد. رسوب سلولی در ۲ میلی‌لیتر MPBS معلق و مجدداً سانتریفوژ (۱۰۰۰ دور به مدت ۴ دقیقه) گردید. این چرخه شستشو ۳ بار با MPBS و ۳ بار با PBS سرد تکرار شد. جداسازی فازهای اختصاصی متصل به سلول‌های SKBR3 با ۱ میلی‌لیتر تری اتیل آمین (۱۰۰ میلی‌مولار) به مدت ۴ دقیقه در دمای اتاق صورت گرفت. محلول حاصل با ۱ میلی‌لیتر تریس - هیدروکلراید خنثی، سانتریفوژ (۱۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) گردید. مایع رویی به ۵ میلی‌لیتر باکتری *E. coli* TG1 در فاز لگاریتمی اضافه شد. مراحل تکثیر با افزودن فاژ کمکی و تخلیص با پلی‌اتیلن گلیکول صورت گرفت. *panning* برای دو دور دیگر ادامه یافت بدین ترتیب که در دور دوم تعداد شستشو به میزان ۶ بار با MPBS، ۶ بار با PBS سرد و ۸ بار در دور سوم افزایش یافت.

شناسایی فازهای اختصاصی آنتی‌ژن HER2:

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

سنتی گراد) شد. اختصاصیت آنتی-بادی‌های تک دومین شتری (VHH) موجود در مایع رویی به آنتی ژن HER2 در مقایسه با کنترل های منفی (چاهک‌های دارای آلبومین سرم گاوی و آنتی-بادی بزی علیه ناحیه Fc آنتی بادی IgG انسانی) با استفاده از روش الایزا و آنتی-بادی علیه هم‌گلوتینین (HA) متصل به HRP (روش) مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای نواحی FR (Frame work) یک و چهار، کلونی - PCR بر روی کلون‌های حاوی فائیدهای دارای VHH با اختصاصیت بالا به آنتی ژن HER2 صورت گرفت:

آغازگر:

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

آغازگر:

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

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

$$n = \frac{Ag}{Ag + Kaff}$$

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

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

Ag؛ میزان آنتی ژن مورد استفاده در چاهک (۱۰ نانوگرم)

VHH؛ غلظت VHH در حداکثر اتصال به آنتی ژن

VHH'؛ غلظت VHH در نصف حداکثر اتصال به آنتی ژن

برای سنجش قدرت شناسایی آنتی ژن HER2 محلول

آنتی‌بادی IgG انسانی (سیگما) پوشش داده شدند و سپس آنتی ژن recombinant HER2-Fc chimera (R&D systems) (۱۰۰ نانوگرم به ازای ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک) به آن‌ها افزوده شد. بعد از انکوباسیون با ماده بلاکینگ ((۵٪ MPBS)) به مدت ۱ ساعت، Input های ۱ تا ۳ به چاهک‌های تعیین شده اضافه و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از شستشو با تویین ۲۰ در PBS (۰.۵٪)، آنتی‌بادی علیه M13 متصل به آنزیم HRP (روش) افزوده شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، پلیت را شسته و ماده TMB اضافه گردید. توقف واکنش با هیدروکلریک اسید صورت گرفت و میزان جذب نوری (OD = ۱) در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه سنجش الایزا (ELISA-Reader) (آمریکا، ۲۱۰۰ FAX STAT) خوانده شد. سنجش پلی کلونال فائ الایزا برای یافتن Input با بالاترین میزان تفاوت سیگنال با کنترل منفی (آلبومین سرم گاوی (BSA)، صورت گرفت. Input مورد نظر در باکتری TG1 تکثیر و سپس به پلیت دارای آنتی بیوتیک آمپی سیلین منتقل گردید. مونوکلونال فائ الایزا برای تک تک کلون‌ها انجام شد. بدین ترتیب که تک کلون برداشته شده با کمک فائ کمکی تکثیر یافت و مانند پلی کلونال فائ الایزا، اختصاصیت فائ‌های تخلیص شده از تک کلون‌ها به آنتی ژن HER2 مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی عملکرد آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری اختصاصی آنتی ژن HER2:

فائ‌های تخلیص شده از تک کلون‌ها با بیشترین میزان اختلاف با کنترل منفی (چاهک دارای آلبومین سرم گاوی) به درون باکتری غیر سرکوبگر E. coli Rosetta gami II (نواژن) انتقال یافت. بعد از تکثیر یافتن باکتری‌ها و رسیدن جذب نوری به ۰/۹ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، القا با IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalacto pyranoside) یک میلی مولار صورت گرفت. برای جداسازی پروتئین‌های سیتوپلاسمی، رسوب باکتریایی سونیکه (۳ بار برای ۱ دقیقه و فاصله ۳۰ ثانیه در یخ) انجام و سوسپانسیون حاصله سانتریفوژ (۱۵۰۰۰ دور برای ۲۰ دقیقه در ۴ درجه

فازهای حاصل از اولین دور panning را مجدداً در باکتری TG1 و با فاز کمی تکثیر داده و این بار با 5×10^{13} فاز (Input^۲)، مرحله دوم panning آغاز گردید. در دورهای دوم و سوم با افزایش تعداد دور شستشو و متعاقباً سانتریفوژ، میزان Output به ترتیب به 4×10^6 و 8×10^6 رسید (جدول ۱). سه Input و Output در پلی‌کلونال فاز الایزا مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲). دور سوم دارای OD مشخص، در مقایسه با کنترل منفی آلبومین سرم گاوی بود. از Output و Input سوم، برای انجام منوکلونال فاز الایزا استفاده شد. بعد از سنجش ۲۰ کلون از سه

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

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

Panning بر روی سلول	دور اول	دور دوم	دور سوم
Input	1×10^{14}	5×10^{13}	6×10^{13}
Output	6×10^5	4×10^6	8×10^6

جدول ۲: نتایج پلی‌کلونال فاز الایزا دورهای اول تا سوم panning بر روی آنتی‌ژن نوترکیب HER2 و کنترل منفی BSA. نتایج به صورت اختلاف OD بین آنتی‌ژن و کنترل نشان داده شد (SD ± Mean، $p < 0/05$).

دورها	Input	Output
۱	$0/324 \pm 0/15$	$0/278 \pm 0/1$
۲	$0/4 \pm 0/05$	$0/37 \pm 0/08$
۳	$0/553 \pm 0/1$	$0/49 \pm 0/05$

Output و ۳۰ کلون از سه Input، نهایتاً چهار کلون که بیشترین اختلاف را با کنترل نشان می‌دادند (آلبومین سرم گاوی) به Rosetta gami II برای تولید آنتی‌بادی تک دومینی شتری محلول انتقال یافتند (نمودار ۱). بعد از تایید مجدد فرم‌های محلول با الایزا و تعیین توالی، چهار کلون RR_۴، RR_۶، RR_{۱۰} و RR_{۱۶} که توالی‌های منحصر به فردی نشان دادند، مورد ارزیابی بیشتر قرار گرفتند (ثبت

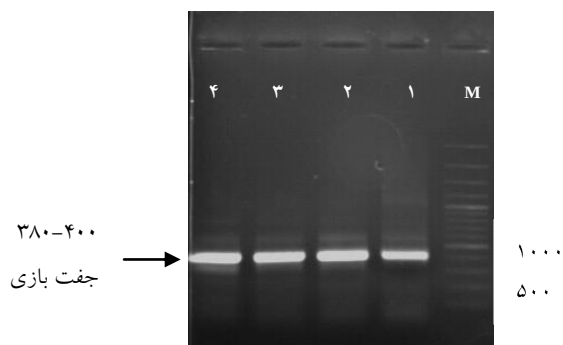
تحلیل آماری:

تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۶ صورت گرفت. گروه‌های مختلف آزمایش در مطالعه با استفاده از آزمون کروسکال - والیس مقایسه شدند. مقایسه بین گروهی بر اساس آزمون آماری من‌ویتنی انجام گرفت و $p < 0/05$ به عنوان معنادار در نظر گرفته شد. تمامی مراحل آزمایش‌ها و روش‌های مورد استفاده به صورت سه تایی (تربلیکیت) انجام گرفتند.

یافته‌ها

کتابخانه نمایش فاژی pComb3X در باکتری‌های TG1 با فاز کمی M13KO7 تکثیر شد. تعداد 1×10^{14} از فازهای تکثیر شده برای شروع panning بر روی سلول‌های سرطانی سینه بیان‌کننده آنتی‌ژن HER2 به کار رفت. طی اولین دور از panning، تقریباً 10^9 از فازهای غیر اختصاصی در اثر شستشو خارج شده و به 6×10^5 رسید.

توانایی شناسایی آنتی ژن HER2 محلول را نشان دادند. ضمن این که در حضور آنتی ژن MUC1 محلول، آنتی بادی های مورد آزمایش حداکثر اتصال را به آنتی ژن HER2 در کف چاهک داشتند (نمودار ۲).



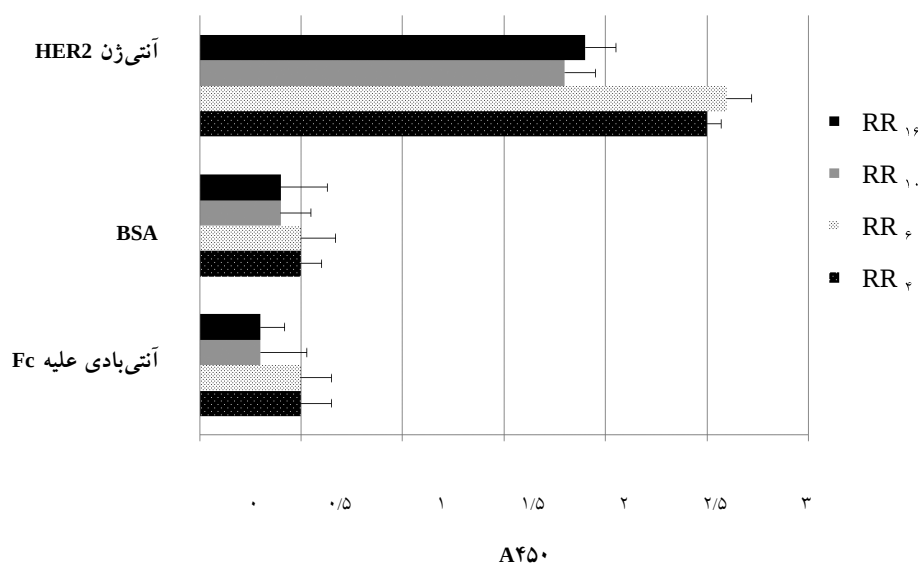
شکل ۲: نتایج الکتروفورز حاصل از کلونی - PCR آنتی بادی های تک دومینی شتری. به ترتیب از راست به چپ: مارکر (M)، RR_۴، (۱) RR_۶، (۲) RR_{۱۰}، (۳) RR_{۱۶} (۴) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای نواحی FR یک و چهار و ایجاد قطعات ۳۸۰-۴۰۰ جفت بازی.

شده در Genebank به ترتیب JX 576799، JX 576800، JX 576801 و JX 576803). با انجام کلونی-PCR بر روی چهار کلون حاصله (با آغازگرهای طراحی شده برای FR یک و چهار)، قطعات تقریباً ۴۰۰ - ۳۸۰ جفت بازی بر روی ژل آگارز مشاهده گردید (شکل ۲).

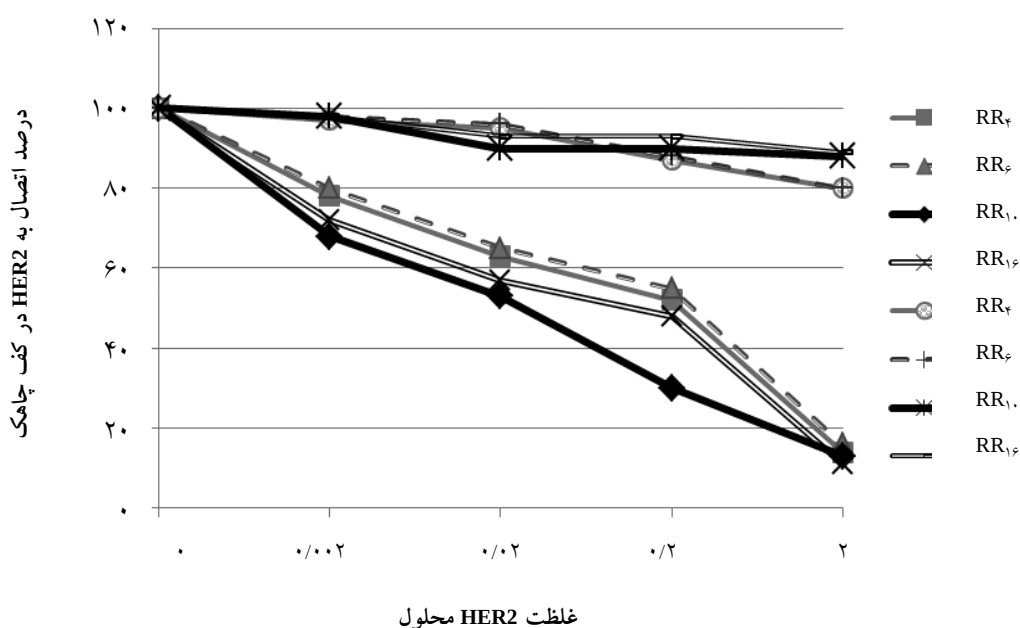
با انجام روش های SDS-PAGE و وسترن بلات، آنتی بادی های تک دومینی شتری با وزن ۱۷ کیلو دالتون مورد تایید قرار گرفتند.

بر اساس روش Beatty، افینیتی آنتی بادی های RR_۴ و RR_۶ به آنتی ژن HER2، $10^{-12} \times 5/4$ و $10^{-12} \times 10^{-12}$ M- 10^{-12} و $10^{-12} \times 7/5$ و افینیتی آنتی بادی های RR_{۱۰} و RR_{۱۶} به آنتی ژن HER2، $10^{-12} \times 0/2$ و $10^{-12} \times 0/6$ به دست آمد. آنتی بادی های شتری با افینیتی بالا RR_۴ و RR_۶، توانایی بیشتری در شناسایی آنتی ژن محلول از خود نشان دادند به طوری که در غلظت ۲ میکروگرم در میلی لیتر از آنتی ژن محلول تقریباً ۱۰۰٪ مهار صورت گرفته و هیچ اتصالی بین آنتی بادی مورد نظر و آنتی ژن HER2 در کف چاهک مشاهده نشد.

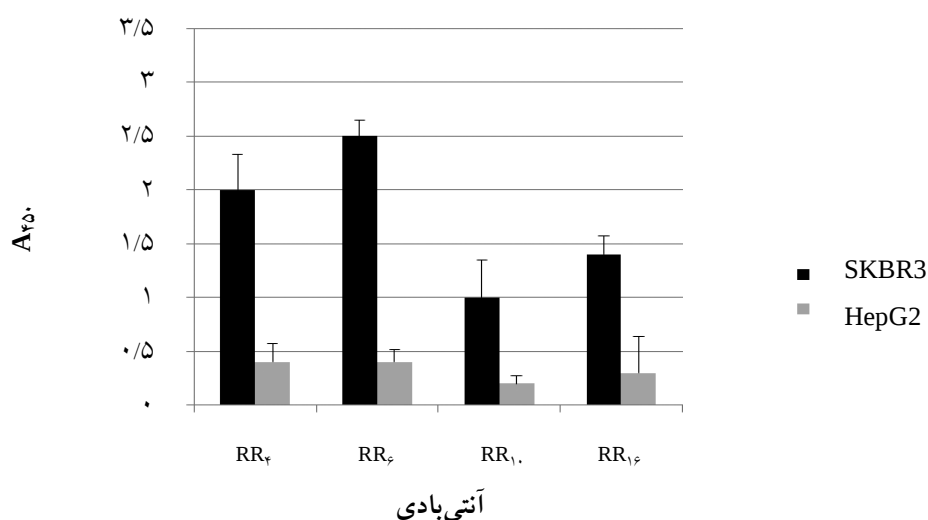
آنتی بادی های RR_{۱۰} و RR_{۱۶} با افینیتی متوسط هم



نمودار ۱: نتایج الایزا چهار آنتی بادی تک دومینی شتری بر روی آنتی ژن نو ترکیب HER2 و کنترل منفی (BSA و آنتی بادی بزی علیه ناحیه Fc انسانی). بر اساس آزمون آماری Mann-Whitney، تفاوت معناداری در اتصال آنتی بادی ها به آنتی ژن HER2 در مقایسه با کنترل منفی وجود دارد (MEAN $\pm$ SD، $p < 0/05$).



نمودار ۲: میزان اتصال آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به آنتی‌ژن HER2 در کف چاهک و آنتی‌ژن HER2 محلول و MUCI محلول ($p < 0.05$, $MEAN \pm SD$)



نمودار ۳: نتایج حاصل از اتصال آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به آنتی‌ژن HER2 بر روی سلول $HER2^+$ (SKBR3) و سلول $HER2^-$ (HepG2). بر اساس آزمون آماری من‌ویتنی، تفاوت معناداری در اتصال آنتی‌بادی‌ها به سلول مثبت (SKBR3) در مقایسه با سلول کنترل (HepG2) وجود دارد ($p < 0.05$, $MEAN \pm SD$).

(نمودار ۳).

بحث

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

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

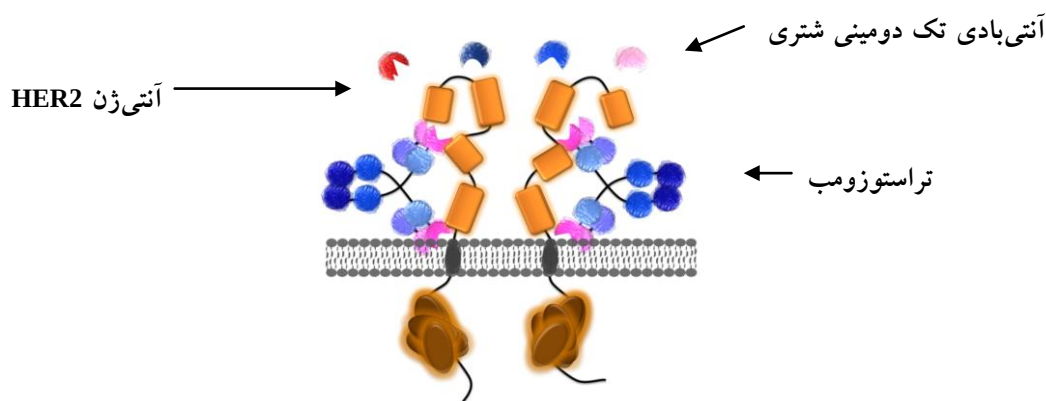
منحصر به فرد از سایر آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری گزارش شده علیه HER2 توسط گروه تحقیقاتی ما به دست آمد. از جمله آزمایش‌های مهم قبل از شروع درمان سرطان سینه با تراستوزومب، بررسی میزان پاسخدهی بیمار به درمان با این آنتی‌بادی می‌باشد (۱۴).

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

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

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

طی دو مطالعه در کشورهای ایران و بلژیک، آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری متفاوتی علیه آنتی ژن HER2 به دست آمد (۲۵، ۲۴). آنتی ژن HER2 دارای ناحیه خارج سلولی بزرگ (۶۳۰ اسید آمینه) و متعاقباً اپی‌توپ‌های متنوعی می‌باشد. به طوری که می‌توان تعداد زیادی آنتی‌بادی با خصوصیات متنوع علیه قسمت‌های مختلف آنتی ژن HER2 به دست آورد. به همین منظور، پنلی از آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری دارای افینیتی و اختصاصیت بالا به آنتی ژن HER2 با توالی‌های متفاوت و



شکل ۳: نمای شماتیکی از آنتی ژن HER2، آنتی‌بادی تراستوزومب و آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری

نتیجه‌گیری

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

مهندسی شده با قدرت شناسایی و کشندگی بالا علیه سلول‌های سرطانی سینه. ۲- استفاده از آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری علیه آنتی‌ژن HER2 در شناسایی آنتی‌ژن محلول موجود در سرم بیماران با سرطان سینه برای آگاهی از شروع درمان با تراستوزومب و ارزیابی روند درمان.

تشکر و قدردانی

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

References :

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

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

Original Article

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

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

¹Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

²Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

⁴School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

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

Materials and Methods

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

Results

After cell panning and ELISA, four VHHs that recognized HER2 antigen better than negative control were identified. High affinity HER2 specific VHHs (1012-1013 M-1) were able to detect sHER2 (2 µg/ml). When the mixture of VHH and sMUC1 was added to HER2 coated-well, the VHH bound to HER2. RR₄ and RR₆ VHHs showed the highest binding to SKBR3 (HER2 expressing cell) (2±0.33 and 2.5±0.15, respectively) compared to HER2 negative cell (0.38 ± 0.17 and 0.4±0.12, respectively).

Conclusions

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

Key words: Genes, HER-2, Breast Cancer

Received: 20 May 2013

Accepted: 9 Dec 2013

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