

خون

فکالت‌دانشگاه‌های تحقیقی
دوره ۱۱ شماره ۲ تابستان ۹۳ (۱۴۰۶-۱۴۰۵)

مقاله پژوهشی

غنى‌سازی کتابخانه نمایش فاژی علیه سلول‌های سرطانی سینه به منظور جداسازی آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری شناسایی فاکتور رشد اپیدرمالی ۲

فاطمه رحیمی جمنانی^۱، فاطمه رهبری‌زاده^۲، محمد علی شکرگزار^۳، داوود احمدوند^۴، فریدون مهیودی^۵

چکیده سابقه و هدف

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

مواد و روش‌ها

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

پافته‌ها

بعد از انجام panning بر روی سلول و الیزا، چهار VHH با اتصال قابل ملاحظه به HER2 در مقایسه با کنترل منفی شناسایی شدند. VHH‌های با افینیتی $M^{-10^{12}-10^{13}}$ به آنتی‌زن HER2 نشان دادند. در اتصال به HER2 در سطح سلول، آنتی‌بادی‌های (VHH) RR₄ و RR₄ بالاترین میزان اتصال (به ترتیب $0/33 \pm 0/33$ و $2/5 \pm 0/15$) به سلول SKBR3 (بیان‌کننده HER2) را در مقایسه با سلول فاقد HER2 (به ترتیب $0/17 \pm 0/38$ و $0/12 \pm 0/4$) نشان دادند.

نتیجه‌گیری

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

کلمات کلیدی: زن‌ها، HER2، سرطان سینه

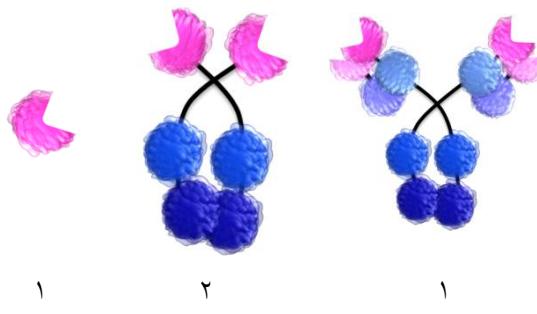
تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۸

۱- PhD بیوتکنولوژی دارویی - استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی استیتو 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 فرآورده‌های بیولوژیک - دانشیار بانک سلوالی استیتو پاستور ایران - تهران - ایران
۴- PhD بیوشیمی پزشکی - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
۵- PhD ایمونولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی استیتو پاستور ایران - تهران - ایران

مقدمه

(antibody) به علت اختصاصیت، افینیتی بالا و اندازه کوچک برای مورد هدف قرار دادن آنتیژن‌ها در مکان‌های مسدود نظری تومورها که نفوذ دارو به آن‌ها به علت وضعیت نامناسب عروقی مشکل می‌باشد، بسیار مناسب هستند.^(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) آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری بسیاری علیه انواع آنتیژن‌های سرطانی از جمله Epidermal Growth Factor (EGFR)، (MUCin1) MUC1 Vascular Endothelial Growth (VEGFR)، (Receptor 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 سینگنین (۲) و تک دومینی شتری (۳)

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

مواد و روش‌ها

تکثیر کتابخانه و تخلیص ذرات فاژی: در یک مطالعه تجربی کتابخانه فاژی pComb3X قطعه

خانواده گیرنده فاکتور رشد اپیدرمالی (Human HER = Human Epidermal growth factor Receptor family) یا 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) 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 تخدمان، 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 (پارتner) در هترو‌دایمیریزاسیون (به عنوان کورسپتور) برای سایر اعضای خانواده (HER3 یا EGFR)، عمل می‌کند. همو یا هترو‌دایمیریزاسیون اعضای خانواده باعث ترانس فسفولیاسیون دومین تیروزین کیناز و سیگنال ترانس داکشن می‌گردد.^(۵)

بعد از گذشت ربع قرن از ساخت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، امروزه آنتی‌بادی به عنوان یکی از پرکاربردترین عوامل درمانی علیه انواع بیماری‌های انسانی از جمله سرطان، محسوب می‌شود. آنتی‌بادی‌های نوترکیب بیش از ۳۰٪ داروهای بیولوژیک را در آزمون‌های بالینی تشکیل می‌دهند و پیش‌بینی شده است که فروش آنتی‌بادی‌ها به حدود ۳۰ بیلیون دلار در سال‌های اخیر برسد.^(۶، ۷) 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 VHH = Variable domain of camel heavy-chain شتری (

میکروگرم در میلی لیتر) و گلوتامین (۲ میلی مولار) 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 $1/4 \times 10^6$ سلول SKBR3 (در ۱ میلی لیتر MPBS (۰/۵٪)، به فالکون ۱۵ انتقال داده و بلاکینگ به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انجام شد. بعد از سانتریفوژ ۱۰۰۰ دور به مدت ۴ دقیقه، مایع رویی را دور ریخته و رسوب سلولی HepG2 با کتابخانه فائزی تکثیر یافت و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. انکوباسیون سلول‌های HepG2 با کتابخانه فائزی، جهت حذف فائزهای 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 میلی لیتر MPBS معلق و مجدداً سانتریفوژ (۱۰۰۰ دور به مدت ۴ دقیقه) گردید. این چرخه شستشو ۳ بار با MPBS و ۳ بار با PBS سرد تکرار شد. جداسازی فائزهای اختصاصی متصل به سلول‌های SKBR3 با ۱ میلی لیتر تری‌اتیل آمین (۱۰۰ میلی مولار) به مدت ۴ دقیقه در دمای اتاق صورت گرفت. محلول حاصل با ۱ میلی لیتر تریس - هیدروکلراید خشی، سانتریفوژ (۱۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) گردید. مایع رویی به ۵ میلی لیتر باکتری E. coli TG1 در فاز لگاریتمی اضافه شد. مراحل تکثیر با افزودن فائز کمکی و تخلیص با پلی‌اتیلن گلایکول صورت گرفت. panning برای دو دور دیگر ادامه یافت بدین ترتیب که در دور دوم تعداد شستشو به میزان ۶ بار با MPBS، ۶ بار با PBS سرد و ۸ بار در دور سوم افزایش یافت.

شناسایی فائزهای اختصاصی آنتی‌زن HER2:

بعد از انجام سه دور panning و تکثیر فائزهای اختصاصی آنتی‌زن HER2، نهایتاً سه Input و سه Output به دست آمد که وارد سنجش پلی‌کلونال فائز الیزا شدند. ابتدا چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه با آنتی‌بادی بزری علیه Fc

cDNA آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به دست آمده از شترهای ایمن شده با عصاره بافت‌های سرطانی سینه انسانی، علیه آنتی‌زن HER2 بر روی سلول‌های سرطانی سینه غنی گردید (۱۶، ۱۷). بدین ترتیب که ابتدا ۲۰ میکرولیتر از کتابخانه ژنی شتری به ۵ میلی لیتر محیط حاوی باکتری E. coli TG1 (استراتژن) در وضعیت رشد لگاریتمی (OD₆₀₀ = ۱) افزوده شد. ناقل فاژمیדי pComb3X دارای ژن مقاومت به آمپیسیلین می‌باشد به همین منظور ۸ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین (۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) در دو نوبت و به فاصله ۳۰ دقیقه اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر فائز کمکی M13KO7 (GE Healthcare) دارای ژن مقاومت به کانامایسین اضافه و انکوباسیون به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. محتويات لوله‌های حاوی باکتری‌های دارای فائز به ارلن ۱۰۰ میلی لیتری منتقل شد و حجم به ۲۵ میلی لیتر افزایش یافت. آنتی‌بیوتیک آمپیسیلین و کانامایسین برای حجم مورد نظر اضافه گردید و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت صورت گرفت. محتويات ارلن به لوله‌های سانتریفوژ انتقال یافت و سانتریفوژ (۲۸۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه) انجام شد. فائزهای موجود در مایع رویی با استفاده از پلی‌اتیلن گلایکول ۶۰۰۰، نمک کلرید سدیم ۲/۵ مولار در آب (روی یخ) و سانتریفوژ (۱۸۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه)، رسوب داده شدند. فائزهای تغليظ شده بر روی دیواره با ۱ میلی لیتر شیر خشک بدون چربی در فسفات بافر سالین (۰/۴٪) (Skim Milk in phosphate – buffered saline) شسته و جمع‌آوری شدند.

غذی‌سازی کتابخانه فائزی با انجام panning بر روی سلول روند panning سلولی با (cfu/mL) ۱۰۱۴ از فائز بر روی سلول‌های فاقد آنتی‌زن HER2 (HepG2) و سپس بیان‌کننده آنتی‌زن HER2 (SKBR3 = Human breast cancer cell) آغاز شد. سلول‌های HepG2 و SKBR3 (بانک line) سلولی انستیتو پاستور ایران در فلاسک‌های ۷۵ سانتی‌متر مربع دارای محیط DMEM (جیبکو)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰

سانتی گراد) شد. اختصاصیت آنتی بادی های تک دومین شتری (VHH) موجود در مایع رویی به آنتی ژن HER2 در مقایسه با کنترل های منفی (چاهک های دارای آلبومین سرم IgG و آنتی بادی بزری علیه ناچیه Fc آنتی بادی IgG انسانی) با استفاده از روش الیزا و آنتی بادی علیه هماگلولوپینین (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 روش (روش) بر روی کلون های حاوی فازمیدهای 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، فازمیدهای دارای VHH از کلون های منتخب تخلیص و برای تعیین توالی فرستاده شدند. روش های SDS-PAGE با استفاده از ژل آکریلامید ۱۲٪ و وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی علیه HA متصل به HRP اساس دستورالعمل استاندارد انجام گرفت. افینیتی VHH های اختصاصی آنتی ژن HER2، با روش Beatty محاسبه شد (۱۸). در این روش در رقت (۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم به ازای هر چاهک) از آنتی ژن HER2 و آلبومین سرم گاوی در چاهک های پلیت ۹۶ خانه استفاده شد و غلظت های فزاینده (۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار) از VHH به چاهک ها اضافه گردید. آنتی بادی علیه HA متصل به TMB را افزوده و فعالیت آنزیم پراکسیداز با سوبسترا سنجیده شد. ثابت افینیتی (Kaff) آنتی بادی به آنتی ژن HER2 بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید.

$$Kaff = \frac{n}{n-1/2} (n [Nb] - [Nb])$$

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 حداقل اتصال به آنتی ژن VHH؛ غلظت VHH در نصف حداقل اتصال به آنتی ژن VHH برای سنجش قدرت شناسایی آنتی ژن HER2 محلول

آنتی بادی IgG انسانی (سیگما) پوشش داده شدند و سپس (R&D systems) recombinant HER2-Fc chimera (۱۰۰ نانوگرم به ازای ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک) به آنها افزوده شد. بعد از انکوباسیون با ماده بلاکینگ (MPBS (۰.۵٪)) به مدت ۱ ساعت، Input های ۱ تا ۳ به چاهک های تعیین شده اضافه و به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از شستشو با توتین PBS (۰.۰۵٪)، آنتی بادی 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 ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه سنجش الیزا (ELISA Reader) (آمریکا، FAX ۲۱۰۰ STAT) خوانده شد. سنجش پلی کلونال فاز الیزا برای یافتن Input با بالاترین میزان تفاوت سیگنال با کنترل منفی (آلبومین سرم گاوی TGS)، صورت گرفت. Input مورد نظر در باکتری تکثیر و سپس به پلیت دارای آنتی بیوتیک آمپی سیلین متقل گردید. مونوکلونال فاز الیزا برای تک تک کلون ها انجام شد. بدین ترتیب که تک کلون برداشته شده با کمک فاز کمکی تکثیر یافت و مانند پلی کلونال فاز الیزا، اختصاصیت فازهای تخلیص شده از تک کلون ها به آنتی ژن HER2 مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی عملکرد آنتی بادی های تک دومینی شتری اختصاصی آنتی ژن HER2:

فازهای تخلیص شده از تک کلون ها با بیشترین میزان اختلاف با کنترل منفی (چاهک دارای آلبومین سرم گاوی E. coli Rosetta gami II) به درون باکتری غیر سرکوبگر (نوژن) انتقال یافت. بعد از تکثیر یافتن باکتری ها 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 گفت. برای جداسازی پروتئین های سیتوپلاسمی، رسوب باکتریایی سونیکه (۳ بار برای ۱ دقیقه و فاصله ۳۰ ثانیه در یخ) انجام و سوسپانسیون حاصله سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ دور برای ۲۰ دقیقه در ۴ درجه

فازهای حاصل از اولین دور panning را مجدداً در باکتری TG1 و با فاز کمکی 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 سانتریفرژ، میزان Output به ترتیب به 4×10^6 و 8×10^6 سانتریفرژ، 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 Input و Output سوم، برای انجام منوکلونال فاز الایزا استفاده شد. بعد از سنجش ۲۰ کلون از سه

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

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

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 ± 0.05 ، Mean $p < 0.05$).

Output	Input	دورها
0.278 ± 0.01	0.324 ± 0.05	۱
0.37 ± 0.08	0.4 ± 0.05	۲
0.49 ± 0.05	0.553 ± 0.01	۳

Output و ۳۰ کلون از سه Input، نهایتاً چهار کلون که بیشترین اختلاف را با کنترل نشان می‌دادند(آلبومن 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 اولین دور از panning، تقریباً 10^9 از فازهای غیر اختصاصی در اثر شستشو خارج شده و به 6×10^6 رسید.

توسط آنتی‌بادی‌های شتری، دو سری از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه از آنتی‌ژن HER2 (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) پوشیده شد. آنتی‌بادی شتری (۴۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) به همراه غلظت‌های افزایشی از آنتی‌ژن HER2 محلول و آنتی‌ژن MUC1 محلول (۰/۰۲، ۰/۰۲ و ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) به ترتیب به چاهک‌های سری اول و دوم افزوده شد. حداقل اتصال (٪ مهار) برای آنتی‌بادی‌هایی که به آنتی‌ژن کف چاهک متصل و حداقل اتصال (٪ 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 ثبیت شدند و سپس با MPBS ، بلاکینگ انجام گرفت. آنتی‌بادی‌های شتری (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از هر آنتی‌بادی) را افزوده و انکوباسیون به مدت ۱ ساعت انجام شد. ادامه سنجش با افزودن آنتی‌بادی علیه HA متصل به HRP صورت گرفت.

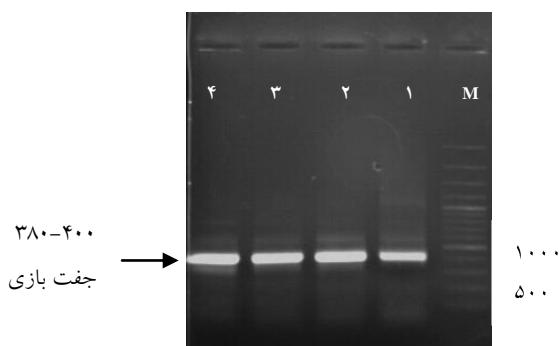
تحلیل آماری:

تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۶ صورت گرفت. گروه‌های مختلف آزمایش در مطالعه با استفاده از آزمون کروسکال - والیس مقایسه شدند. مقایسه بین گروهی بر اساس آزمون آماری من ویتنی انجام گرفت و $p < 0.05$ به عنوان معنادار در نظر گرفته شد. تمامی مراحل آزمایش‌ها و روش‌های مورد استفاده به صورت سه تایی(تریپلیکیت) انجام گرفتند.

یافته‌ها

کتابخانه نمایش فازی pComb3X در باکتری‌های TG1 با فاز کمکی M13KO7 تکثیر شد. تعداد 1×10^{14} از فازهای 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 6×10^6 رسید.

توانایی شناسایی آنتیژن HER2 محلول را نشان دادند. ضمن این که در حضور آنتیژن MUC1 محلول، آنتیبادی‌های مورد آزمایش حداقل اتصال را به آنتیژن HER2 در کف چاهک داشتند (نمودار ۲).



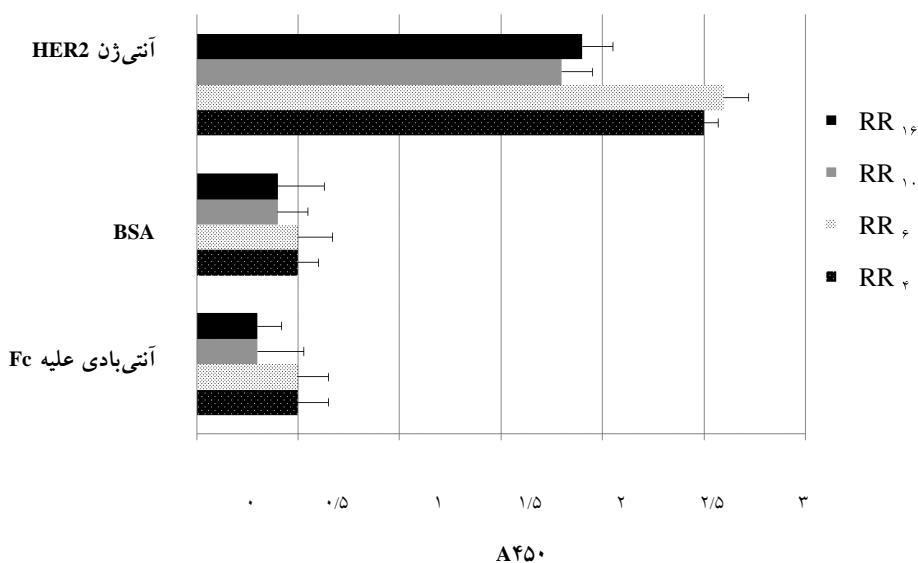
شکل ۲: نتایج الکتروفورز حاصل از کلونی-PCR آنتیبادی‌های تک دومینی شتری. به ترتیب از راست به چپ: مارکر (M)، (RR₄)، (RR₁₆)، (RR₁) و (RR₄) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای نواحی FR یک و چهار و ایجاد قطعات ۳۸۰-۴۰۰ جفت بازی.

شده در Genebank به ترتیب JX 576799، JX 576800 و JX 576801 (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).

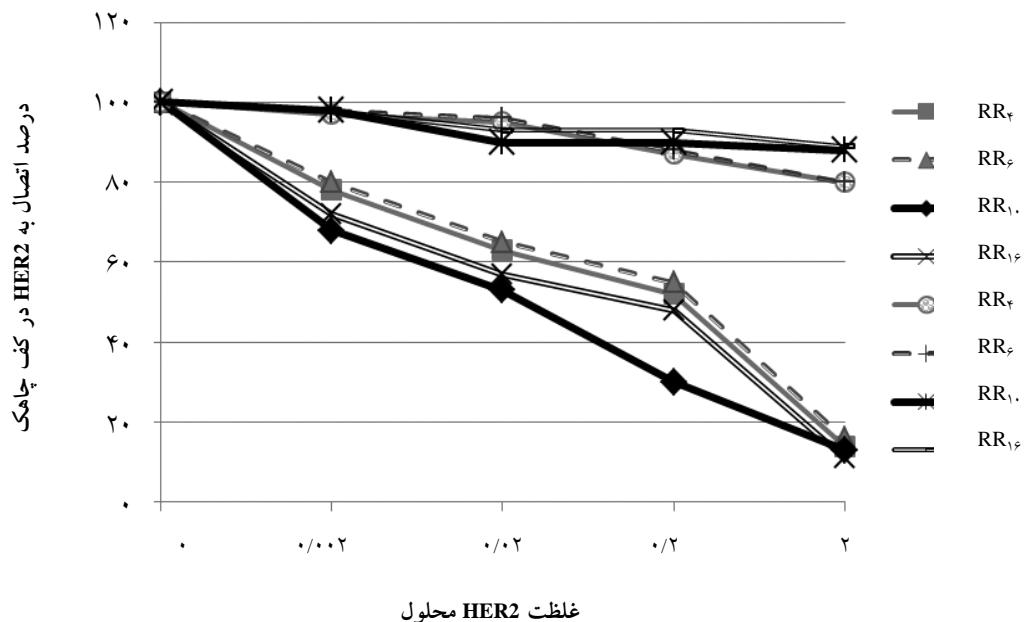
با انجام روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلات، آنتیبادی‌های تک دومینی شتری با وزن ۱۷ کیلو دالتون مورد تایید قرار گرفتند.

بر اساس روش Beatty، افینیتی آنتیبادی‌های RR₄ و RR₁₆ به آنتیژن HER2، M-۱، HER2، M-۱، M-۱، HER2، M-۱، HER2، M-۱، HER2 و افینیتی آنتیبادی‌های RR₁₆ و RR₁ به آنتیژن ۷/۵ × ۱۰^{۱۲} و ۱۰^{۱۲} M-۱/۴ × ۱۰^{۱۲} M-۱/۶ × ۱۰^{۱۲} به دست آمد. آنتیبادی‌های شتری با افینیتی بالا، RR₄ و RR₁₆ توanایی بیشتری در شناسایی آنتیژن محلول از خود نشان دادند به طوری که در غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتیژن محلول تقریباً ۱۰۰٪ مهار صورت گرفته و هیچ اتصالی بین آنتیبادی مورد نظر و آنتیژن HER2 در کف چاهک مشاهده نشد.

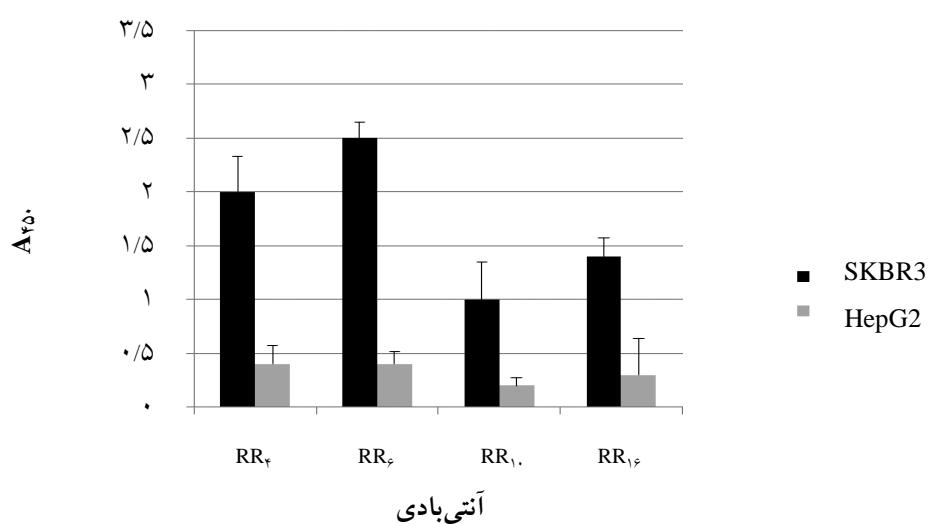
آنتیبادی‌های RR₁₆ و RR₁ با افینیتی متوسط هم



نمودار ۱: نتایج الیزا چهار آنتیبادی تک دومینی شتری بر روی آنتیژن نوترکیب HER2 و کنترل منفی BSA و آنتیبادی بزی علیه ناحیه Fc انسانی). بر اساس آزمون آماری Mann-Whitney، تفاوت معناداری در اتصال آنتیبادی‌ها به آنتیژن HER2 در مقایسه با کنترل منفی وجود دارد ($p < 0.05$ ، MEAN \pm SD).



نمودار ۲: میزان اتصال آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به آنتی‌زن HER2 در کف چاهک و آنتی‌زن HER2 محلول و محلول (p<0.05 ، MEAN ± SD)



نمودار ۳: نتایج حاصل از اتصال آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به آنتی‌زن 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 وجود دارد (HepG2) (p<0.05 ، MEAN ± SD)

(نمودار ۳).

در اتصال به سلول‌های سرطانی، آنتی‌بادی‌های RR₄ و

RR₅ بالاترین میزان اتصال به سلول SKBR3 را نشان دادند.

اما به سلول‌های منفی هم متصل شدند. اگرچه

آننتی‌بادی‌های RR₁ و RR₁₆ در اتصال به SKBR3، میزان

KMTRی نسبت به آنتی‌بادی‌های RR₄ و RR₅ نشان

دادند اما هیچ اتصالی با سلول‌های منفی نداشتند

بحث

آننتی‌بادی‌های تک دومینی شتری، کوچکترین قطعه آنتی‌بادی متصل شونده به آنتی‌زن هستند که از آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین قادر زنجیره سبک شتری

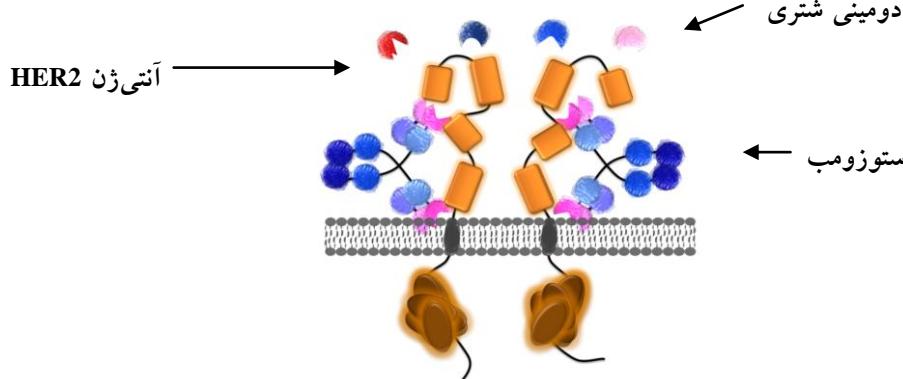
منحصر به فرد از سایر آنتی‌بادی‌های تک دومین شتری گزارش شده علیه HER2 توسط گروه تحقیقاتی ما به دست آمد. از جمله آزمایش‌های مهم قبل از شروع درمان سرطان سینه با تراستوزومب، بررسی میزان پاسخ‌دهی بیمار به درمان با این آنتی‌بادی می‌باشد(۱۴).

تراستوزومب از طریق اتصال به دومین نزدیک غشایی HER2، باعث از بین بردن سلول‌های سرطانی می‌شود(۲۶). در این راستا سلول‌های سرطانی برای رهایی از این آنتی‌بادی، شروع به ریزش قسمت خارج سلولی مولکول HER2 (Mحلول) 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 آنتی‌زن HER2 محلول در سرم بیماران با سرطان سینه را نیز دارا می‌باشند(وجود آنتی‌زن 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 می‌گردد(شکل ۲). قطعه کامل آن‌ها به طور تقریبی ۲/۵ نانومتر قطر و ۴ نانومتر طول و وزنی در حدود ۱۲-۱۵ 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 اپی‌توب‌های مخفی و نامعمول، توانایی اتصال به حفرات یا جایگاه فعال پروتئین‌ها، انعطاف‌پذیری مناسب برای تبدیل به اشکال دارویی، اینمی‌زایی 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(۹، ۲۰، ۲۱). در همین راستا، در این مطالعه آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری اختصاصی آنتی‌زن HER2 از کتابخانه فاژی جداسازی و تعیین خصوصیت گردید(۲۲-۲۳).

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



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

مهندسى شده با قدرت شناسایی و کشنگی 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 لنفوسيت واجد گیرنده‌های کامپریک اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های HER2، TMU-۸۸-۶۷-۹۰ MUC1 و TAG72» به شماره ثبت ۱: e49-57. می‌باشد که با حمایت مالی انسستیتو پاستور ایران و دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

نتیجه‌گیری

در انتهای اتصال آنتی‌بادی‌های تک دومینی شتری به آنتی‌ژن HER2، مانع از تشکیل دایمرهای HER2 با سایر مولکول‌های HER2 یا سایر اجزای خانواده 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

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, Ahmadvand D. Isolation of a Novel Nanobody Against HER-2/neu Using Phage Displays Technology. *Lab Medicine* 2010; 41(2): 69-76.
- 26- Zagozdzon R, Gallagher WM, Crown J. Truncated HER2: implications for HER2-targeted therapeutics. *Drug Discov Today* 2011; 16(17-18): 810-6.

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: Rahberizadeh 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