

جداسازی و بررسی خصوصیات مولکول های scFv ضد HER2 با استفاده از تکنولوژی نمایش فاژی جهت تشخیص سرطان پستان

شاهرخ قوتی^۱، دکتر مجتبی طهمورث پور^۲، دکتر محمد رضا نصیری^۳،
دکتر احمد رضا بهرامی^۴، دکتر حسام دهقانی^۵، دکتر حسین برقائی^۶، دکتر
گرگوری آدامز^۹

۱. دانشجوی دکترای تخصصی ژنتیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲. محقق، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳. محقق، گروه آنکولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات سرطان فاکس چیس، فیلادلفیا، پنسیلوانیا، ایالات متحده آمریکا.
۴. استاد گروه ژنتیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۵. دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۶. دانشیار گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۷. دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۸. دانشیار گروه آنکولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات سرطان فاکس چیس، فیلادلفیا، پنسیلوانیا، ایالات متحده آمریکا.
۹. استاد گروه آنکولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات سرطان فاکس چیس، فیلادلفیا، پنسیلوانیا، ایالات متحده آمریکا.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۰

خلاصه

مقدمه: scFv ها، فرم هایی از آنتی بادی های نوترکیب می باشند که با استفاده از روش های پیشرفته بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک ساخته می شوند. همچنین آنتی ژن HER2 هدف مناسبی برای طیف گسترده ای از سرطان ها می باشد. مطالعه حاضر با هدف جداسازی scFv آنتی بادی های اختصاصی انجام شد.

روش کار: به منظور جداسازی قطعات scFv های اختصاصی علیه قسمت خارج سلولی HER2 کوت شده در ایمونوتیوب، تکنولوژی نمایش فاژی با استفاده از کتابخانه فاژی صورت گرفت. scFv آنتی بادی های به دست آمده در سویه TG1 از باکتری اشرشیاکلی بیان شدند. محصولات نوترکیب با استفاده از ستون های کروماتوگرافی تمایلی بر علیه His-tag خالص سازی شدند. خصوصیات اتصال قطعات scFv به دست آمده علیه آنتی ژن HER2 با استفاده از آزمون های وسترن بلات، بیوسنسوری و فلوسایتومتری بررسی شدند.

یافته ها: پس از سه مرحله گزینش علیه آنتی ژن HER2، سه کلون scFv به دست آمد که نتایج توالی یابی DNA اختصاصیت آنها را تأیید نمود. نتایج بررسی کنتیکی بیوسنسور نشان داد که همه scFv آنتی بادی های جدا شده علیه قسمت خارج سلولی آنتی ژن HER2 تمایل اتصال با اپی توپ های شناخته شده بر روی سطح آنتی ژن را در دامنه مایکرومولار تا نانومولار دارند. نتایج وسترن بلات و فلوسایتومتری نیز اختصاصیت میل اتصال scFv ها با آنتی ژن HER2 را اثبات کردند.

* نویسنده مسئول مکاتبات: شاهرخ قوتی؛ دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. تلفن: ۰۵۱۱-۸۷۹۶۸۴۵؛ پست الکترونیک:

Ghovvati@stu-mail.um.ac.ir

نتیجه‌گیری: تکنیک نمایش فازی یک ابزار قدرتمند برای جداسازی scFv آنتی بادی های متصل شونده اختصاصی با گیرنده HER2 است که به عنوان آنتی ژن سطحی سرطان پستان شناخته می شود.

کلمات کلیدی: بیوسنسور، فلوسایتومتری، گیرنده HER2، مهندسی آنتی بادی، نمایش فازی

مقدمه

پروتئین های دارویی، یکی از گران ترین و مهمترین محصولات هستند که بشر توانسته است آنها را از راه هایی به جز روش طبیعی، سنتز و تولید کند. طی سال های اخیر آنتی بادی ها همواره یک نقش محوری در تحقیقات مرتبط با شناسایی و درمان سرطان در بدن به عنوان یک داروی هدفمند داشته اند (۱، ۲)

یک عامل بسیار مؤثر که در تشخیص و درمان سرطان پستان متاستاتیک اهمیت دارد، فاکتور HER-2^۱ می باشد. HER-2 یک پروتئین انکوژن است و گلیکوپروتئینی به وزن مولکولی ۱۸۵ کیلودالتون را کد می کند. همچنین یکی از ۴ عضو بزرگ خانواده گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال از گیرنده تیروزین کیناز محسوب می شود که ژن آن بر روی کروموزوم ۱۷ قرار دارد (۳، ۴). فاکتور HER2 در سلول های سرطانی پستان، رحم، معده و پروستات برخی مبتلایان به سرطان یافت می شود و یکی از عوامل مهاجم شناخته شده در گسترش سرطان متاستاتیک به سایر بافت های بدن به شمار می آید که عموماً بیش بیان آن در ۲۰ تا ۳۰ درصد افراد مبتلا به سرطان پستان افزایش می یابد (۵، ۶). همچنین این فاکتور در تنظیم فعالیت هایی نظیر رشد سلول، تمایز، آپوپتوز^۲، مهاجرت و تهاجم نیز نقش دارد (۷). لذا جداسازی آنتی بادی های منوکلونال بر ضد اپی توپ هایی که توانایی ایجاد پاسخ ایمنی علیه آنتی ژن HER2 را داشته باشند سودمند می باشد. آنتی بادی ها توانایی عملکرد در برابر طیف وسیعی از پروتئین های آنتی ژنیک و غیر آنتی ژنیک از قبیل پپتیدهای کوتاه زنجیر، محصولات DNA و RNA ها را دارا می باشند (۸-۱۰). امروزه هدف گیری آنتی ژن های سطحی توسط آنتی بادی ها، نقش بسیار مهمی در تشخیص و درمان سرطان ها دارد (۱، ۱۱). اما یکی از مهمترین داروهای سودمند مورد استفاده در درمان سرطان پستان (سرطان متاستاتیک)، هرسپتین^۳ می باشد که نام ژنریک آن تراستوزوماب^۴ است. هرسپتین

یک آنتی بادی منوکلونال است که پروتئین افزایش دهنده رشد به نام HER2/neu را بلوک می کند. این دارو در تمام موارد ابتلاء به سرطان پستان استفاده نمی شود و غالباً تنها در حالتی تجویز می شود که نتایج حاصل از بررسی های دقیق بافت سلول های سرطانی، نشان دهنده مثبت بودن عامل HER2 در بافت مورد نظر باشد. از این رو تجویز و استفاده هرسپتین علاوه بر جلوگیری از ارسال سیگنال های پایین دستی توسط گیرنده HER2، قادر است سیستم ایمنی را برای تنظیم حمله به سلول های سرطانی با رشد غیر معمولی نیز تحریک کند (۲، ۵).

نسل اخیر از آنتی بادی های منوکلونال که در فاز بالینی می باشند عموماً از موش های ترانس ژنیک یا سیستم نمایش فاژی مشتق شده اند که به اشکال Fab^۵ یا scFv^۶ عرضه می شوند (۱۲، ۱۳). قطعات کوچک scFv اشکال محبوبي از آنتی بادی های نو ترکیب می باشند که به خوبی در قسمت ریشه ای فاژ نمایان می شوند؛ به گونه ای که فرم ایده آل برای مهندسی آنتی بادی بوده و قابلیت شناسایی آنتی ژن ها را دارند (۱۴). در طی سال های اخیر ابزارهای ژنتیک و بیولوژی مولکولی از قبیل وکتورها و کتابخانه های فاژی برای ساخت آنتی بادی های نو ترکیب بر علیه دامنه وسیعی از آنتی ژن ها در کنار فن آوری هایی نظیر هیبریدوما توسعه داده شده اند (۱۵، ۱۶). این اشکال از آنتی بادی های نو ترکیب با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز از روی کلون سلول های B تکثیر شده و با کلون نمودن نواحی متغیر آنتی بادی های مذکور در وکتورهای فاژمیدی می توان کتابخانه های نمایش فاژی ساخت (۱۷).

همانطور که هر فاژ، حاوی ژن رمزگذاری برای scFv و یا Fab بر روی سطح خود می باشد، تکنیک گزینش با استفاده از آنتی ژن های کوت شده در پلت های پلاستیکی برای جداسازی کلون های اختصاصی با

^۵single-chain fragment variable

^۶Fragment antigen binding

^۱Human epidermal growth factor receptor

^۲Apoptosis

^۳Herceptin

^۴Trastuzumab

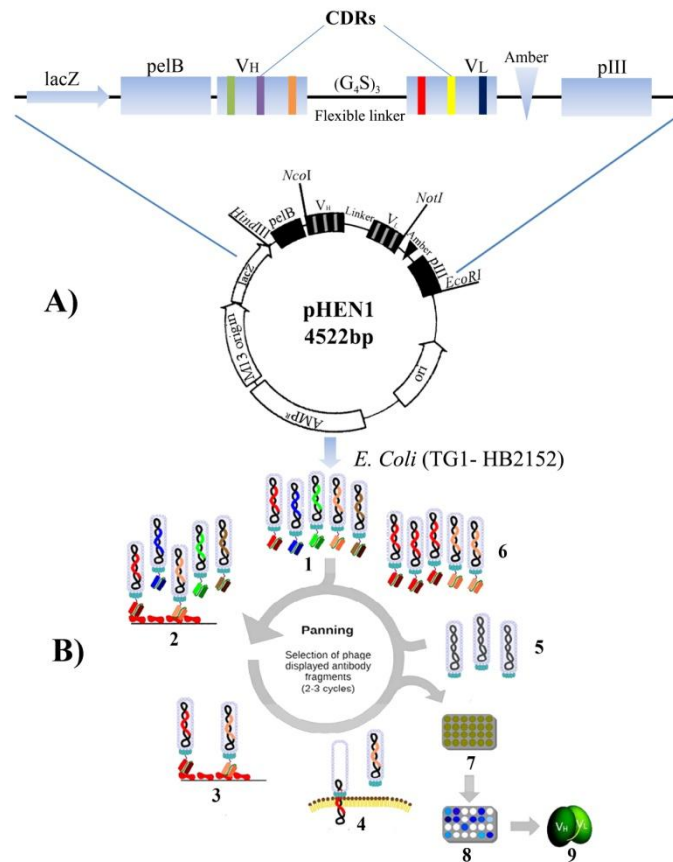
افینیتی و کنتیکی یک سری آنتی بادی های نو ترکیب به دست آمده بود که توانایی اتصال اختصاصی به آنتی ژن سطحی HER2 را داشتند.

روش کار

در این مطالعه از کتابخانه فازی استفاده شد (۲۲). تیترا فازی این کتابخانه در زمان استفاده 1.7×10^{17} و تنوع فازی کتابخانه در حدود 10^8 کلون بود. برای ساخت کتابخانه فازی از فاژمید (4522 bp) pHEN1 استفاده شد که ژن مقاوم به آمپی سیلین برای غربالگری در آن جاگذاری شده بود (شکل-۱). جداسازی و استحصال، بیان و آزمون الایزا scFv آنتی بادی ها با استفاده از پروتکل های استاندارد با کمی تغییرات انجام شد (۲۳-۲۵). جهت بیان scFv آنتی بادی های گزینش شده در باکتری اشرشیاکلی سوبه TG1 از وکتور بیانی pSYN1 که در آزمایشگاه مرکز تحقیقات سرطان Fox Chase ایالات متحده آمریکا مهندسی شده بود استفاده گردید.

کیفیت مطلوب بر علیه آنتی ژن می تواند استفاده شود. این تکنیک سریع و کارآمد بوده و به طور معمول با استفاده از آنتی ژن های هدف که بر روی یک پوشش پلاستیکی سوار شده، به راحتی و در مدت زمان کمتری می توان آنتی بادی اختصاصی را استحصال کرد (۱۸). از این رو غربالگری از کتابخانه های نمایش فازی یک تکنیک قدرتمند است که در مطالعات نقشه برداری علیه اپی توپ فضایی و لیگاندها می تواند منجر به معرفی آنتی بادی هایی شود که مسبب ایجاد توانایی مسدود کردن سیستم سیگنال دهی پایین دستی و همچنین پاسخ ایمنی مستقیم در سلول های توموری می باشند (۱۹-۲۱).

در این مطالعه یک دستورالعمل بهینه شده برای تولید scFv آنتی بادی های اختصاصی بر ضد آنتی ژن سطحی HER2 که در طیف گسترده ای از سلول های سرطانی پستان، تخمدان، پروستات و معده بیش بیان می شود، به عنوان آنتی ژن هدف استفاده شد. هدف نهایی این مطالعه جداسازی، تولید و بررسی خصوصیات



شکل ۱- A) تصویر شماتیک فازمید (B, pHEN1) تصویر شماتیک گزینش و غربالگری با استفاده از فن آوری نمایش فازی: به طور خلاصه کلون های اختصاصی با استفاده از خصوصیت افینیتی بین آنتی بادی و آنتی ژن، به آنتی ژن های مربوطه متصل شده و کلون های غیر اختصاصی در طی مراحل شستشو تحت شرایط کنترل شده از چرخه تکثیر و انتخاب حذف می شوند. در نتیجه کلون های اختصاصی دوباره خالص سازی شده و به باکتری اشرشیاکلی TG1 یا (HB2152) انتقال داده می شوند، مجدداً تکثیر شده و برای گزینش و غربالگری در دوره های بعدی تا حصول scFv آنتی بادی های اختصاصی استفاده می شوند (دو یا سه دور گزینش). (۱) تصویر شماتیک کتابخانه فازی، (۲) آنتی ژن های ایموبلاز شده بر روی سطوح پلاستیکی به scFv آنتی بادی های اختصاصی روی قسمت ریشه ای فاژها متصل می شوند، (۳) فاژهای متصل نشده و متصل شونده های غیر اختصاصی طی شرایط کنترل شده از محیط واکنش شسته شده و حذف می شوند، (۴) فاژهای گزینش شده و خالص سازی شده دوباره به باکتری منتقل شده و باکتری را آلوده می کنند، (۵) به منظور محلول سازی scFv آنتی بادی های بیان شده در باکتری، سلول های باکتری حاوی فازمید با فاژ کمکی (helper phage) آلوده می شوند، (۶) دور اول تکثیر فاژ scFv+های گزینش شده به پایان می رسد. عموماً مرحله گزینش (Panning) دو یا سه دور ادامه می یابد، (۷) تک کلون های scFv آنتی بادی به دست آمده برای شروع غربالگری و انتخاب منوکلونال آنتی بادی در پلیت های ۹۶ خانه کشت داده می شوند، (۸) شناسایی و جداسازی منوکلونال آنتی بادی های متصل شونده به آنتی ژن مورد نظر با استفاده از آزمون الایزا صورت می گیرد، (۹) scFv آنتی بادی های به دست آمده (28 ~ KDa) می توانند برای انجام مهندسی آنتی بادی و تولید شکل های مختلف آنتی بادی مورد استفاده قرار گیرند.

کوت نمودن آنتی ژن HER2 و گزینش scFv آنتی بادی

به منظور ایمونوبلات نمودن قسمت خارج سلولی آنتی ژن HER2 در ایمونوتیوب (Nunc, Denmark, Cat# 770319) ابتدا ۱۰۰ میکروگرم از قسمت خارج سلولی پروتئین HER2 در ۲ میلی لیتر بافر-Carbonate pH (Biocarbonate (Thermo, Prod#28382) با 8.5 حل شد. سپس محلول حاصل به ایمونوتیوب منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. پس از بلاک نمودن با شیر بدون چربی ۴ درصد، کتابخانه فازی Nissim که در شیر بدون چربی ۴ درصد با تیترا نهایی 10^{11} cfu کلون آماده سازی شده بود، به ایمونوتیوب اضافه شد و دور اول تا سوم انتخاب و گزینش scFv فاژها مطابق پروتکل ارائه شده توسط کریبر و همکاران (۱۹۹۷) صورت گرفت (۲۵). به طور خلاصه یک پرگنه از باکتری TG1 در ۵۰ میلی لیتر از محیط مایع 2xYT (۱۶ گرم تریپتون، ۱۰ گرم عصاره مخمر و ۵ گرم سدیم کلراید در یک لیتر) داخل انکوباتور شیکردار قرار گرفت؛ به گونه ای که OD600 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با سرعت ۲۵۰ دور بر دقیقه در حدود ۰/۴-۰/۶ شود. سپس باکتری های کشت داده شده با ۷۵۰ میکرولیتر از فاژهای شستشو شده از مرحله اول آلوده شد و پس از ۳۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه به میزان ۲۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت ها ۱۵ سانتی متری آمپی سیلینه کشت شد.

از باکتری های کشت شده که حاوی فازمیدها بودند، ویال های گلیسروله ۱۰ درصد تهیه و تا زمان استفاده داخل فریز ۸۰- ذخیره شدند .
۲۶۰ میکرولیتر از باکتری های حاوی فازمیدها که گلیسروله شده بودند، به ۲۵ میلی لیتر از محلول 2xYT حاوی ۱۰۰ میکروگرم آمپی سیلین و ۲ درصد گلوکز اضافه شد و داخل انکوباتور شیکردار قرار گرفت؛ به طوری که OD600 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با چرخش ۲۵۰ دور بر دقیقه در حدود ۰/۴-۰/۶ شود. ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع مذکور برای بازیابی فاژها با ۴۰ میلی لیتر از xYT2 حاوی ۰/۱ درصد گلوکز، ۲۵ میکروگرم آمپی سیلین 10^{11} cfu، فاژ کمکی VCSM13 (NEB, Cat#N0315S) و ۵ میکرولیتر IPTG¹ (sigma, Cat# 16758) مخلوط شد. سپس به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد داخل انکوباتور شیکردار با چرخش ۲۵۰ دور بر دقیقه انکوبه و سلول های باکتریایی با سرعت ۴۰۰۰ دور به مدت ۱ ساعت سانتریفیوژ شدند. به مایع رویی به نسبت یک به پنج، پلی اتیلن گلیکول ۲۰ درصد سرد اضافه شد. scFv فاژهای حاصله نیز در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مجدداً فاژهای رسوب داده شده در ۱ میلی لیتر PBS سرد به صوت سوسپانسیون درآمد و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه

¹ Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

سانتریفیوژ شد تا باقی مانده بقایای باکتریایی رسوب داده شود. فاز آنتی بادی حاصله که در محلول رویی بود، بلافاصله برای دور بعدی گزینش استفاده و یا به صورت ویال های گلیسروله ۱۰ درصد تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- ذخیره شد. در تمامی مراحل پس از هر دور گزینش تیترو و تنوع فازهای به دست آمده محاسبه شد.

غربالگری و گزینش کلون های مثبت با روش مونوفازالایزا

مونوفازالایزا مطابق با روش ارائه شده توسط یوان و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد (۲۶). به طور خلاصه ۱۰۰ میکروگرم از قسمت خارج سلولی آنتی ژن HER2 در ۱۰ میلی لیتر بافر Carbonate-Biocarbonate با pH 8.5 حل و محلول حاصل در الایزا ایمونوپلیت ۹۶ خانه Nunc کوت شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. سپس پلیت کوت شده با شیر بدون چربی ۴ درصد بلوکه شد. ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی محیط کشت حاوی تک کلون فازهای حاصل از مرحله گزینش به هر چاهک که حاوی ۵۰ میکرولیتر شیر بدون چربی ۴ درصد بود اضافه شد. پس از ۲ ساعت انکوبه شدن در دمای محیط و سه بار شستشوی چاهک ها به ترتیب با ^۱PBST و ^۲PBS آنتی بادی ثانویه α -M13 pVIII-HRP (GE Healthcare, Cat# 27-9421-01) به نسبت ۱ به ۵۰۰۰ اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای محیط انکوبه شد. پس از ۲ ساعت انکوبه شدن در دمای محیط، شستشوی چاهک ها با ^۱PBST و ^۲PBS به ترتیب به تعداد ۳ دفعه صورت گرفت. سپس سوبسترای الایزا (Sure Blue Reserve, Lot# 110291) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و پس از ۵ تا ۳۰ دقیقه مجدداً ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰۰ میلی مولار HCL برای متوقف کردن واکنش به هر چاهک اضافه شد. در پایان میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش طیف سنجی الایزا صورت گرفت. طول موج خوانده شده نسبت به میانگین

کنترل منفی تصحیح شد و با میانگین جذب کنترل مثبت نیز مقایسه شد.

بررسی تنوع کلون های مثبت با روش PCR fingerprinting

قطعه scFv آنتی بادی موجود در کلون های مثبت با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) بر اساس روش استاندارد تکثیر شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از جفت آغازگر pelB (5'-CAG GAA ACA GCA TGA C-3') و pVIII (5'-GAA TTT TCT GTA TGA GG-3') توسط دستگاه ترموسایکلر (ABI 9700, Applied Biosystems, USA) انجام شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و غلظت نهایی مواد به صورت زیر بود: Deep ۱ U، ۱۰۰ mM Tris-HCl (pH 8.8)، ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر BSA (Bovine serum albumin)، ۰/۲ mM از هر (Invitrogen, NY, USA) dNTP، ۱/۵ mM از $MgCl_2$ و ۱۰ نانوگرم از فازمید هدف که با استفاده از برنامه دمایی زیر و در ۳۵ سیکل تکثیر شدند: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. به منظور انجام آزمون PCR fingerprinting عمل هضم آنزیمی ^۳(RFLP) برای به دست آوردن الگوی هضمی مناسب با آنزیم BstNI به مدت ۳ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد انجام شد. به منظور بررسی میزان تنوع در کلون های scFv مثبت به دست آمده و تکثیر شده الگوی باندهای حاصل از هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۳ درصد، مورد بررسی قرار گرفت.

خالص سازی فازمیدی و توالی یابی کلون های scFv مثبت

خالص سازی و استحصال فازمیدهای حاوی قطعات scFv با استفاده از کیت QIAprep Spin

¹ Phosphate Buffered Saline with Tween 20

² Phosphate buffered saline

³ Restriction fragments length polymorphism

ارزیابی و بررسی خصوصیات scFv ها با آزمون های SDS-PAGE و وسترن بلات

برای بررسی خلوص و اندازه قطعات scFv های بیان شده، محصولات شستشو شده ستون کروماتوگرافی بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. سپس برای بررسی اختصاصیت اتصال scFv های جدا شده با پروتئین HER2 آزمون ساندویچ وسترن بلات کلاسیک طراحی شد. آزمون وسترن بلات بر اساس روش ارائه شده توسط سام بروک و همکاران (2001) انجام شد (۲۴). به طور خلاصه، ابتدا پروتئین HER2 بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شد. سپس قطعه پروتئینی حاصله به غشای کاغذی PVDF با استفاده از سیستم وسترن بلات نیمه خشک با ولتاژ ثابت ۲۲ ولت به مدت ۴۰ دقیقه منتقل شد. پس از بلوکه نمودن غشای کاغذی PVDF با شیر خشک بدون چربی ۴ درصد، آنتی بادی اولیه (scFv) های اختصاصی تخلیص شده به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ به محیط اضافه شد. بعد از شستشوی غشای کاغذی PVDF با محلول PBST ۰٫۱ درصد، آنتی بادی ثانویه (Rabbit 6X His tag) کونژوگه شده به HRP^۴ به نسبت ۱ به ۱۰۰۰۰ به محیط اضافه شد (Abcam, USA, Cat# ab1187). بعد از شستشوی دوباره غشای کاغذی PVDF با محلول PBST ۰٫۱ درصد، سوپسترای ECL^۵ طبق دستورالعمل شرکت سازنده به غشای کاغذی PVDF اضافه شد (Thermo scientific, USA). غشای کاغذی PVDF در مقابل صفحات فیلم نگاتیو عکاسی قرار گرفت و در اثر تابش اشعه X به صورت مرئی ظاهر و مستند شد. ظهور فیلم نگاتیو عکاسی با استفاده از دستگاه تمام اتوماتیک-Kodak X-OMAT 2000A صورت گرفت.

ارزیابی و بررسی خصوصیات کنتیکی scFv ها با استفاده از بیوسنسور

برای بررسی خصوصیات کنتیکی scFv آنتی بادی های استحصالی و ارزیابی افینیتی یا میل اتصال scFv ها با

Miniprep (Qiagen, Germany) طبق دستورالعمل شرکت سازنده با کمی تغییرات صورت گرفت.

مقدار ۵ میکرولیتر از محصولات خالص سازی و به همراه ۵۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت مورد استفاده با غلظت ۱۰ پیکامول به منظور تعیین توالی به شرکت Genewiz ایالات متحده ارسال شد. نمونه‌ها با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی شد. سپس با استفاده از نرم افزار Sequencher نسخه ۵٫۱ و ابزار قدرتمند BLAST و رویه blastn در پایگاه NCBI^۱ و همچنین پایگاه داده Kabat^۲ میزان همولوژی نوکلئوتیدی و هم‌ردیفی پروتئینی توالی‌های به دست آمده سنجیده شد (۲۷، ۲۸).

بیان scFv آنتی بادی در سامانه بیانی باکتری

به منظور بیان scFv های مثبت انتخاب شده، هضم آنزیمی دوگانه با استفاده از آنزیم های NcoI و NotI با هدف ساب کلون کردن قطعه scFv از فائزید pHEN1 به وکتور بیانی pSYN1 صورت گرفت. محصولات هضم شده با استفاده از کیت QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Germany) از روی ژل آگارز خالص سازی شد. قطعه scFv خالص سازی شده با استفاده از کیت Quick LigationTM (NEB, UK) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده داخل وکتور بیانی در بالادست His-tag و در پایین دست پروموتور T7 و pelB leader قرار گرفتند. سپس پلاسمیدهای بیانی حاصل شده به روش شیمیایی به صورت مجزا به باکتری اشرشیاکلی سویه TG1 انتقال داده شدند. خالص سازی و جداسازی scFv های بیان شده در فضای پری پلاسمیک با استفاده از ستون های کروماتوگرافی تمایلی بر علیه His-tag صورت پذیرفت. غلظت scFv آنتی بادی تخلیص شده با استفاده از روش طیف سنجی برآدفورد^۳ با استفاده از محلول برآدفورد (Bio-rad, USA) محاسبه شد (۲۹).

⁴ Horseradish peroxidase

⁵ HRP-Enhanced Chemiluminescence

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

² <http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html>

³ Bradford protein assay

سوسپانسیون شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰ g سانتریفیوژ شدند. سلول ها در ۱۰۰ میکرولیتر از محلول FACS که حاوی ۶۰ نانوگرم/ میکرولیتر از scFv آنتی بادی های استحصالی بود به صورت مجزا به حالت سوسپانسیون درآمدند و به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ در اتاق تاریک انکوبه شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰ g سانتریفیوژ شدند و با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول FACS که حاوی آنتی بادی ثانویه (FITC conjugated goat anti his-tag) بود به حالت سوسپانسیون درآمد و به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ در اتاق تاریک انکوبه شد. بررسی روند اتصال scFv آنتی بادی های استحصالی به لاین های مثبت و منفی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Becton Dickinson, USA) انجام شد و داده های خام حاصله با استفاده از نرم افزار FlowJo نسخه 8.7.3 تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها

گزینش آنتی بادی scFv

روند گزینش scFv فازهای متصل شونده به قسمت خارج سلولی پروتئین HER2 به تعداد ۳ دفعه تکرار شد. در طول هر دوره تیتراژ و تنوع فازی محاسبه شد. شکل ۲ روند تغییرات تیتراژ فازی را در طی سه مرحله گزینش نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود در ابتدای مرحله دوم گزینش، کاهش در تنوع فازی مشاهده شد که این کاهش با توجه به اختصاصیت آنتی ژن برای گزینش فاز امری طبیعی محسوب می شود. همچنین روند افزایشی مشاهده شده در دور سوم، نشانه ای مطلوب برای اثبات تکثیر و افزایش تعداد کلون های اختصاصی مثبت متصل شونده به آنتی ژن محسوب می شود.

قسمت خارج سلولی پروتئین HER2، آزمون بیوسنسوری با استفاده از دستگاه Red 96 Octet (ForteBio, USA) انجام گرفت. بدین منظور از بیوسنسورهای آمینی نسل دوم^۱ برای اتصال قسمت خارج سلولی آنتی ژن HER2 به سنسور استفاده شد. لذا ابتدا بیوسنسور با آب خالص miliQ فعال شد و سپس گروه های آمینی بیوسنسور با استفاده از مخلوط تازه ۲۰ میلی مولار^۲ EDC و ۵ میلی مولار Sulfo-NHS آماده سازی شد. سپس ۲۰ میکروگرم/میلی لیتر از آنتی ژن (قسمت خارج سلولی پروتئین HER2) که داخل بافر سدیم استات pH 5 بود به بیوسنسور متصل شد. گروه های آمین آزاد با استفاده از محلول یک مولار اتانول آمین pH 8.5 بلوکه شدند. سپس scFv آنتی بادی های استحصالی به صورت مجزا در هشت سری رقت از سری رقت صفر نانومولار تا ۲۰۰۰ نانومولار به آنتی ژن HER2 متصل شدند و خصوصیات کنتیکی اتصال^۳ (K_{on}) و رهاسازی^۴ (K_{off}) آنتی بادی ها از آنتی ژن HER2 بررسی شد. بررسی تجزیه و تحلیل داده های خام حاصله با استفاده از مدل ۱:۱ لانگمویر به صورت گلوبالی و با استفاده از نرم افزار DataAnalysis نسخه ۷ شرکت ForteBio صورت گرفت.

ارزیابی و بررسی خصوصیات scFv ها با استفاده از فلوسایتومتری

به منظور بررسی اختصاصیت میل اتصال scFv آنتی بادی های استحصالی با قسمت خارج سلولی پروتئین HER2، آزمون فلوسایتومتری با استفاده از لاین سلولی HER2 مثبت (Sk-Br3) و لاین سلولی HER2 منفی (MDA-MB-468) پی ریزی شد. سلول ها پس از رشد در فلاسک T-175 تریپسینه شدند و با تراکم یک میلیون بر میلی لیتر به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰ g سانتریفیوژ شدند. سپس سلول ها در ۲ میلی لیتر بافر (1% bovine serum albumin in PBS, 0.02% NaN₃)

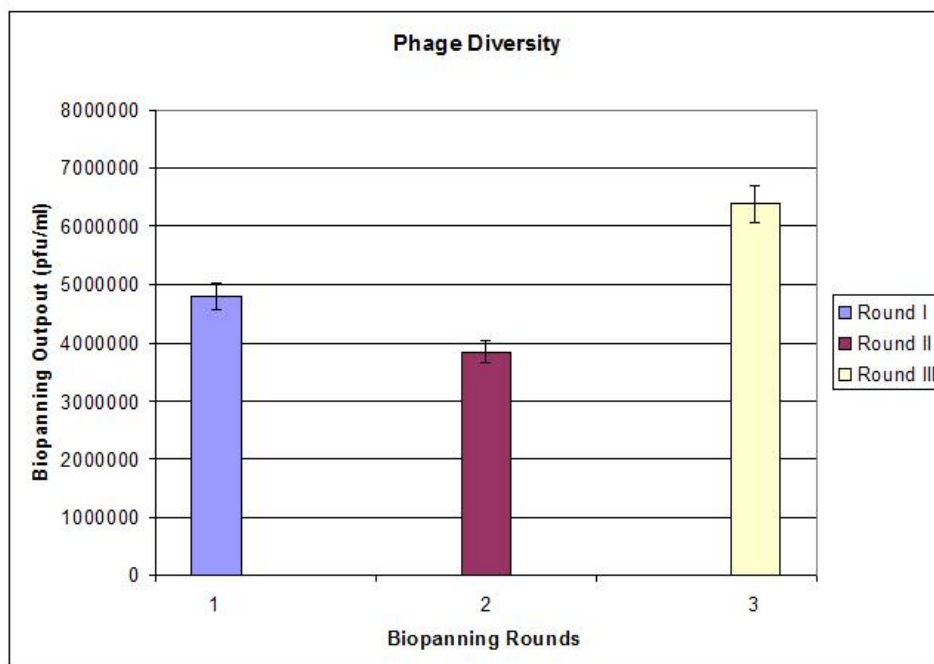
¹ Amine Reactive 2G biosensor

² N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide

³ Association rate constant

⁴ Dissociation rate constant

⁵ Fluorescence Activated Cell Sorter



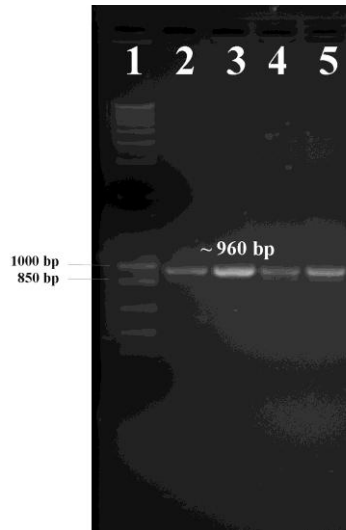
شکل ۲- نمودار تنوع فازی به دست آمده در طی سه مرحله گزینش بر ضد آنتی ژن HER2.

نمودار حاضر غنی سازی و تکثیر اختصاصی کتابخانه فازی پس از سه مرحله گزینش را به نمایش می گذارد. اعداد ستون سمت چپ تنوع فازی حاصل از مراحل Biopanning را نمایش می دهد.

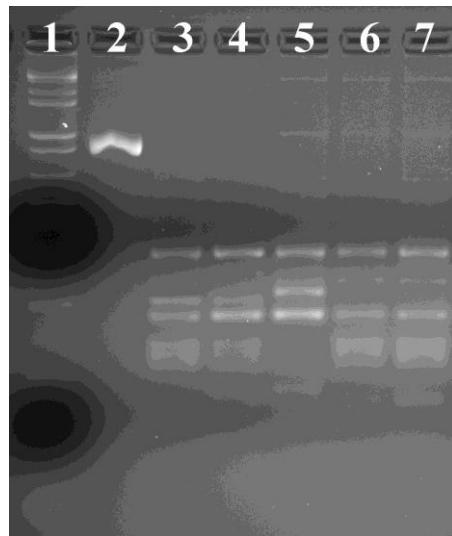
تنوع موجود در این کلون ها با استفاده از روش PCR بر اساس روش استاندارد به خوبی تکثیر شدند (شکل ۳). بررسی منحصر به فرد بودن کلون های scFv به دست آمده با استفاده از آزمون PCR fingerprinting و با بکارگیری روش هضم آنزیمی قطعات (RFLP) در حضور آنزیم BstNI صورت پذیرفت. نتایج این آزمون نشان دادند که کلون های مثبت scFv استحصالی بر اساس الگوی هضمی به دست آمده به طور کلی در ۳ گروه منحصر به فرد قرار گرفتند (شکل ۴). در این سه گروه به ترتیب تعداد ۱۴، ۳ و ۴ کلون الگوی هضمی یکسانی از خود نشان دادند که در نهایت ۳ کلون منحصر به فرد برای خالص سازی و توالی یابی انتخاب و ارسال شد.

غربالگری مونوفاژالایزا و بررسی کلون های مثبت با روش PCR fingerprinting

برای ارزیابی کلون های استحصالی شده و شناسایی و انتخاب کلون های scFv مثبت آزمون مونوفاژالایزا طراحی شد. در پایان دور سوم گزینش ۴۶۵ تک کلونی برای آزمون مونوفاژالایزا انتخاب و علیه قسمت خارج سلولی آنتی ژن HER2 که در پلیت الایزا کوت شده بود استفاده شد. نتایج خوانش جذب نوری به دست آمده در طول موج ۴۵۰ نانومتر نسبت به میانگین جذب نوری مثبت و منفی سنجیده شد و تعداد ۲۱ کلون مثبت از خوانش ۴۶۵ چاهک به دست آمد. تک کلون های مثبت به دست آمده برای بررسی منحصر به فرد بودن، بررسی حضور قطعات scFv و همچنین



شکل ۳- الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از جفت آغازگر *pelB* و *pVIII* شماره ۱: نشانگر وزنی مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولات PCR. اندازه باندهای نشانگر وزنی 1 Kb^+ از بالا به پایین برحسب bp به قرار زیر می باشد (۱۰۰۰۰-۱۱۰۰۰-۱۲۰۰۰-۹۰۰۰-۸۰۰۰-۷۰۰۰-۶۰۰۰-۵۰۰۰-۴۰۰۰-۳۰۰۰-۲۰۰۰-۱۶۵۰-۱۰۰۰-۸۵۰-۶۵۰-۵۰۰-۴۰۰-۳۰۰-۲۰۰-۱۰۰). شماره ۲: قطعه ۹۷۰ ~ جفت بازی از *scFv#1* ، شماره ۳: قطعه ۹۷۰ ~ جفت بازی از *scFv#2* ، شماره ۴: قطعه ۹۷۰ ~ جفت بازی از *scFv#3* و شماره ۵: قطعه ۹۷۰ ~ جفت بازی از *scFv#4*.



شکل ۴- الکتروفورز محصولات *fingerprinting PCR* با استفاده از روش هضم آنزیمی *RFLP* با استفاده از آنزیم *BstNI*. نتایج این آزمون حضور سه الگوی هضمی منحصر به فرد از مجموع *scFv* های مثبت استحصالی با استفاده از کتابخانه فازی بر ضد آنتی ژن *HER2* را اثبات نمود. همانگونه که مشاهده می شود به ترتیب: شماره های ۳ و ۴، شماره ۵، شماره ۶ و ۷ در مجموع سه الگوی هضمی منحصر به فرد ارائه نموده اند. شماره ۱: نشانگر وزنی مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولات PCR. اندازه باندهای نشانگر وزنی 1 Kb^+ از بالا به پایین برحسب bp به قرار زیر می باشد (۱۰۰۰۰-۱۱۰۰۰-۱۲۰۰۰-۹۰۰۰-۸۰۰۰-۷۰۰۰-۶۰۰۰-۵۰۰۰-۴۰۰۰-۳۰۰۰-۲۰۰۰-۱۶۵۰-۱۰۰۰-۸۵۰-۶۵۰-۵۰۰-۴۰۰-۳۰۰-۲۰۰-۱۰۰). شماره ۲: محصول PCR هضم نشده *scFv#1* ، شماره ۳: محصول PCR هضم شده *scFv#1* ، شماره ۴: محصول PCR هضم شده *scFv#12* ، شماره ۵: محصول PCR هضم شده *scFv#2* ، شماره ۶: محصول PCR هضم شده *scFv#3* و شماره ۷: محصول PCR هضم شده *scFv#21*.

scFv از باکتری بود. همچنین این نتایج اثبات نمودند که scFv های خالص سازی شده در محدوده وزنی مورد نظر (~28 KDa) بر روی ژل حرکت می نمایند. همچنین نتایج آزمون ساندویچ وسترن بلات کلاسیک به منظور بررسی اتصال scFv آنتی بادی های استحصال با آنتی ژن HER2 نشان داد که همه scFv آنتی بادی ها به آنتی ژن HER2 به خوبی متصل شده و پس از اضافه شدن بادی ثانویه به هر یک از واکنش دهنده ها، بر روی فیلم نگاتیو عکاسی تحت تأثیر اشعه X تک بانندی نوک تیز و عاری از هرگونه ناخالصی و باندهای غیر اختصاصی از خود به جای گذاردند. این نتایج همچنین اثبات می کند که scFv آنتی بادی های به دست آمده، تمایل زیادی به اتصال با آنتی ژن HER2 به صورت اختصاصی دارند (شکل ۶). همچنین به منظور بررسی اختصاصیت اتصال scFv آنتی بادی های استحصال آزمون ساندویچ وسترن بلات کلاسیک با استفاده از آنتی ژن HER1 انجام شد. نتایج این آزمون نیز نشان داد که هیچ یک از scFv آنتی بادی های به دست آمده با آنتی ژن HER1 واکنش نداده و به طور غیر اختصاصی و تصادفی به آن متصل نمی شوند. به منظور ارائه کنترل مثبت در این آزمون از scFv آنتی بادی 4D5 که ریشه پدري آنتی بادی تراستوزوماب¹ (هرسپتین)² می باشد جهت اتصال به آنتی ژن HER2 استفاده شد.

خالص سازی فازمیدی و توالی یابی کلون های scFv مثبت

نتایج طیف سنجی با نانو دراپ نشان داد که پلاسمیدهای استخراج و خالص شده از کیفیت مناسبی برای توالی یابی و ساب کلونینگ در وکتور بیانی برخوردار بودند. نتایج توالی یابی و بررسی همردیفی توالی اسید آمینه ای scFv آنتی بادی های مثبت که بر اساس تفاوت الگوی هضمی با روش PCR fingerprinting برای توالی یابی فرستاده شده بودند نشان داد که ۲ تا از scFv ها، دارای لوپ H3 یکسانی هستند. همچنین در تک scFv مثبت باقی مانده نیز علاوه بر تفاوت ردیفی اسید آمینه ای در لوپ H3، در لوپ های H1، L1 و L3 نیز تغییرات اسید آمینه ای مشاهده شد (نتایج همردیفی نوکلئیدی و اسید آمینه ای نشان داده نشده است).

بیان scFv آنتی بادی در سامانه بیانی باکتری

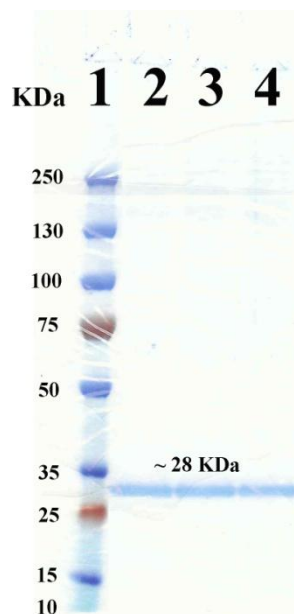
برای بررسی و تجزیه تحلیل میزان بیان و خصوصیات scFv آنتی بادی های انتخاب شده، تعداد ۳ کلون که برای اتصال با آنتی ژن HER2، مثبت شناخته شده بودند در باکتری اشرشیاکلی سویه TG1 بیان شدند. عصاره پری پلاسمیک بعد از ۵ ساعت القاء با IPTG استخراج و خالص سازی شد. همچنین غلظت scFv آنتی بادی های خالص شده با ستون کروماتوگرافی تمایلی بر ضد His-tag با استفاده از روش طیف سنجی برادفورد ۲،۴، ۲،۱ و ۲،۹ گرم/لیتر به ترتیب برای scFv#1، scFv#2 و scFv#3 برآورد گردید.

ارزیابی و بررسی خصوصیات scFv ها با آزمون های SDS-PAGE و وسترن بلات

محصولات scFv حاصل از تخلیص با ستون کروماتوگرافی تمایلی ضد His-tag برای بررسی اندازه و وزن مولکولی بر روی ژل SDS-Page الکتروفورز شدند و با استفاده از تکنیک رنگ آمیزی کوماسی بلوباند های پروتئینی مرئی شدند (شکل ۵). نتایج الکتروفورز نشان داد که محصولات تخلیص شده تمیز و عاری از هرگونه ناخالصی پروتئینی و برش های آنزیمی نامطلوب غیر منتظره بودند که دلیل آن، استفاده از مهار کننده های پروتئازی در زمان استخراج پروتئین

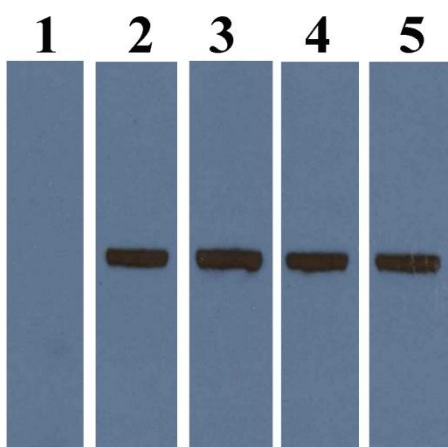
¹ Trastuzumab

² Herceptin



شکل ۵- الکتروفورز SDS-PAGE از scFv آنتی بادی های خالص شده با ستون کروماتوگرافی.

شماره ۱: نشانگر پروتئینی مورد استفاده برای تعیین وزن محصولات بیان شده. اندازه باندهای نشانگر پروتئینی از بالا به پایین برحسب کیلو دالتون (KDa) به قرار زیر می باشد (۲۵۰-۱۳۰-۱۰۰-۷۵-۵۰-۳۵-۲۵-۱۵-۱۰). شماره ۲: محصول بیان و خالص شده scFv#1، شماره ۳: محصول بیان و خالص شده scFv#2، شماره ۴: محصول بیان و خالص شده scFv#3.



شکل ۶- نتایج آزمون ساندویچ وسترن بلات کلاسیک با استفاده از scFv آنتی بادی های خالص شده با ستون کروماتوگرافی در حضور آنتی ژن HER2.

شماره ۱: کنترل منفی (scFv#1 آنتی بادی در حضور آنتی ژن HER1)، شماره ۲: کنترل مثبت (آزمون scFv 4D5 که ریشه پدری تراستوزوماب می باشد در حضور آنتی ژن HER2)، شماره ۳: ساندویچ وسترن بلات با استفاده از محصول بیان و خالص شده scFv#1 در حضور آنتی ژن HER2، شماره ۴: ساندویچ وسترن بلات با استفاده از محصول بیان و خالص شده scFv#2 در حضور آنتی ژن HER2، شماره ۵: ساندویچ وسترن بلات با استفاده از محصول بیان و خالص شده scFv#3 در حضور آنتی ژن HER2.

شرکت ForteBio بررسی شد و ثابت میل اتصال (KD) نیز با استفاده از این نتایج محاسبه شد (جدول ۱). این نتایج نشان دادند که دامنه میل اتصال scFv آنتی بادی های بدست آمده در محدوده مایکرو مولار برای scFv شماره ۲ تا نانو مولار برای scFv های شماره ۱ و ۳ بود.

ارزیابی و بررسی خصوصیات کنتیکی scFv ها با استفاده از بیوسنسور

نتایج تجزیه تحلیل نرخ میل اتصال (Kon) و رهاسازی scFv (Koff) آنتی بادی های به دست آمده نسبت به آنتی ژن HER2 با استفاده از بیوسنسور آمینی نسل دوم و نرم افزار مرتبط به دستگاه Octet از

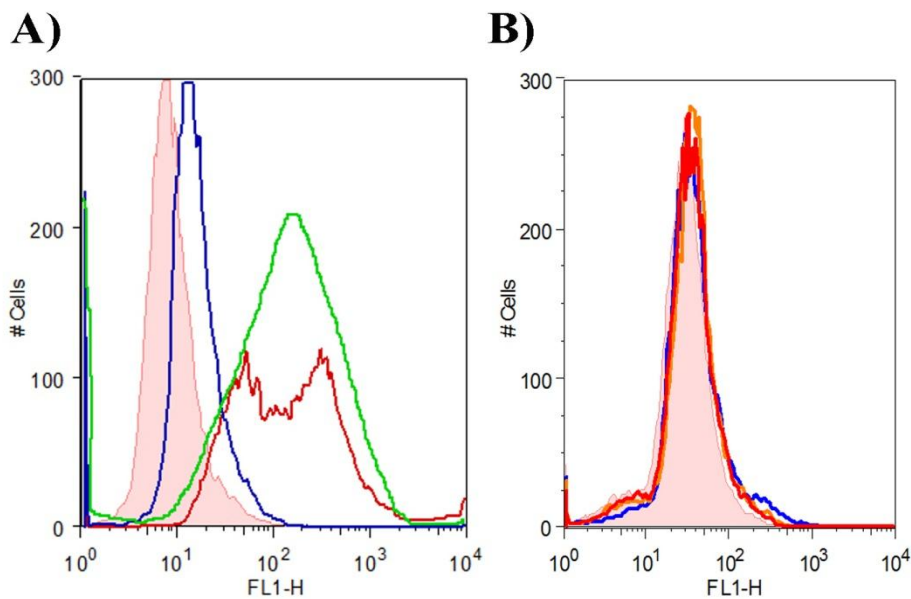
جدول ۱- بررسی و اندازه گیری خصوصیت کنتیکی و میل اتصال scFv آنتی بادی های استحصالی با آنتی ژن HER2.

نام و شماره	ثابت میل اتصال [K _D (M)]	خصوصیت کنتیکی رها سازی [K _{off} (1/s)]	خصوصیت کنتیکی اتصال [K _{on} (1/Ms)]	χ ²
scFv#۱	۲/۰۰ E-۰۷	۶/۷۸ E-۰۳	۳/۳۹ E+۰۴	۰/۰۰۰۴۵۱
scFv#۲	۱/۱۸ E-۰۶	۶/۲۳ E-۰۲	۵/۳۲ E+۰۴	۰/۰۰۰۳۹۸
scFv#۳	۹۶/۰۰ E-۰۹	۲/۲ E-۰۲	۲/۳ E+۰۵	۰/۰۰۰۹۳۹

شده و سیگنال های قوی پس از اتصال از خود ساطع کردند؛ به طوری که درصد میل به اتصال برای scFv ها شماره ۱، ۲ و ۳ با لاین سلولی HER2 مثبت به ترتیب برابر ۶۷، ۲۷ و ۷۳ درصد بود (شکل ۷ بخش A). همچنین به منظور بررسی اختصاصیت اتصال scFv های بدست آمده با آنتی ژن های سطح سلول از لاین سلولی HER2 منفی نیز در این آزمون استفاده گردید که نتایج آزمون فلوسایتومتری نشان دادند که هیچکدام از scFv های بدست آمده با لاین سلولی HER2 منفی واکنش نشان نداده و به سطح آن به صورت غیر اختصاصی متصل نمی گردند (شکل ۷ بخش B). در سال ۲۰۰۵ در تحقیقی بیان شد که استفاده از فن آوری فلوسایتومتری روشی قدرتمند و با دقت بسیار بالا برای بررسی میل اتصال آنتی بادی ها به آنتی ژن ها می باشد (۳۵).

ارزیابی و بررسی خصوصیات scFv ها با استفاده از فلوسایتومتری

برای اثبات اتصال و همچنین بررسی اختصاصیت اتصال scFv های استحصالی به اپی توپ های قسمت خارج سلولی آنتی ژن HER2 در حالت طبیعی و بر روی سطح سلول، آزمون فلوسایتومتری با استفاده از لاین های سلولی HER2 مثبت (Sk-Br3) و منفی (MDA-MB-468) طراحی شد. در این آزمون از scFv آنتی بادی 4D5 که ریشه پدری آنتی بادی تراستوزوماب است به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. با در نظر گرفتن این نکته که ممکن است اپی توپ های آنتی ژن ها در حالت طبیعی بر روی سطح سلول طوری قرار بگیرند که از دسترس scFv ها خارج شوند، اما نتایج این آزمون نشان داد که scFv آنتی بادی های به دست آمده از فن آوری نمایش فازي همگی به صورت اختصاصی به آنتی ژن HER2 متصل



شکل ۷- نتایج آزمون فلوسایتومتری با استفاده از scFv آنتی بادی های خالص شده با ستون کروماتوگرافی در حضور لاین سلولی HER2 مثبت (Sk-Br3) و منفی (MDA-MB468). (A) آزمون فلوسایتومتری در حضور لاین سلولی HER2 مثبت: پس زمینه صورتی) کنترل منفی سلول Sk-Br3، خط قرمز) scFv آنتی بادی شماره ۱، خط آبی) scFv آنتی بادی شماره ۲، خط سبز) scFv آنتی بادی شماره ۳. (B) آزمون فلوسایتومتری در حضور لاین سلولی HER2 منفی: زمینه صورتی) کنترل منفی سلول MDA-MB-468، خط قرمز) scFv آنتی بادی شماره ۱، خط آبی) scFv آنتی بادی شماره ۲، خط نارنجی) scFv آنتی بادی شماره ۳. همچنین آنتی بادی ثانویه استفاده شده در این آزمون هیچگونه اتصالی با هر دو لاین سلولی از خود نشان نداد و scFv آنتی بادی 4D5 به درستی به لاین سلولی HER2 مثبت متصل شد (داده ها نمایش داده نشده است).

بحث

گرفته است؛ به طوری که scFv های گلچین شده اختصاصی از دور دوم به خوبی در دور سوم تکثیر شده و تعداد آنها افزایش پیدا کرده است. تکنولوژی نمایش فازی یکی از تکنیک های مهم توسعه یافته برای جداسازی و تولید آنتی بادی های منوکلونال می باشد که به طور چشمگیری برای پاسخگویی به نیازهای جوامع انسانی فراگیر شده است، به طوری که تعدادی از آنتی بادی های تولید شده با این تکنولوژی موفق به دریافت مجوز از سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) شده و یا در مراحل مختلف آزمون های بالینی انسانی می باشند (۲۱، ۳۶، ۳۷). از طرفی تهیه و تولید آنتی بادی های منوکلونال با استفاده از سیستم هیبریدوما در مقایسه با فن آوری نمایش فازی زمان بر، مشکل و پر هزینه می باشد. لذا این مسئله باعث شده که شرکت های دارویی به سمت فن آوری های مقرون به صرفه متمایل شوند، زیرا با استفاده از این روش به طور مستقیم می توان آنتی بادی های انسانی را انتخاب

یکی از راهکارهای مقابله با آثار مخرب بسیاری از سرطان ها، استفاده از آنتی بادی های منوکلونال می باشد؛ به طوری که در طی ۱۵ سال گذشته تشخیص و درمان سرطان های پستان، پروستات، معده و تخمدان با هدف گیری آنتی ژن HER2 بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱). در مطالعه حاضر با استفاده از تکنولوژی نمایش فازی سه کلون scFv آنتی بادی منوکلونال جدید، علیه آنتی ژن سطحی HER2 جداسازی شد. همچنین مشخص شد که ۲ کلون از تعداد سه scFv آنتی بادی های به دست آمده از تکنولوژی نمایش فازی اختصاصیت مناسبی برای اتصال با آنتی ژن سطحی HER2 داشتند. در مرحله گزینش فازها، روند افزایشی مشاهده شده در دور سوم بیانگر این مطلب است که گزینش با استفاده از فاز برای به دست آوردن scFv های اختصاصی با موفقیت صورت

کرد. همچنین آنتی بادی های استحصال شده با استفاده از تکنولوژی نمایش فازی از کتابخانه های انسانی در مقایسه با آنتی بادی های حاصل از سیستم هیبریدوما نیاز به دستکاری های بعدی برای تولید انواع انسانی شده یا کایمیریک ندارند (۲۱، ۳۸). از طرفی استفاده از پروتئین pIII فاز M13 باعث شده که scFv آنتی بادی ها در قسمت ریشه ای فاز نمایش داده شوند و با استفاده از خصوصیت تمایل به اتصال یا آفینیتی آنتی بادی ها بیان شده در قسمت ریشه ای فاز، به سادگی و هزینه کمتر می توان نسبت به انتخاب آنها با استفاده از تکنولوژی نمایش فازی اقدام کرد (۲۱).

در این مطالعه از کتابخانه فازی Nissim استفاده شد که پژوهشگران دیگری نیز از این کتابخانه برای جداسازی آنتی بادی منوکلونال علیه آنتی ژن های متفاوتی نیز استفاده کرده اند (۳۹-۴۱). پیش از این پژوهش نیز از تکنولوژی مشابه برای جداسازی آنتی بادی علیه آنتی ژن HER2 استفاده شده است (۴۲، ۴۳). همچنین در برخی مطالعات از روش های دیگری مانند هیبریدوما برای جداسازی آنتی بادی علیه آنتی ژن HER2 استفاده شده است (۴۴). اما در تکنولوژی نمایش فازی، مزایا و معایبی نسبت به فن آوری هیبریدوما وجود دارد؛ به گونه ای که طول دوره تولید آنتی بادی و هزینه آن کمتر بوده و نیاز به انسانی سازی نیز ندارد. اما عموماً آفینیتی یا میل به اتصال آنتی بادی های به دست از هیبریدوما بیشتر می باشد. در این مطالعه غربالگری گسترده ای برای تعداد ۴۶۵ کلون به دست آمده انجام شد تا انتخاب آنتی بادی هایی که توانایی شناسایی آنتی ژن HER2 را داشتند با استفاده از آزمون الایزا صورت گرفت. نتایج fingerprinting با استفاده از کلون های مثبت، تعداد ۳ الگوی هضمی متفاوت را نشان داد. این امر بیانگر این مسئله بود که احتمالاً کلون های تکثیر شده و انتخاب شده بعد از ۳ دور گزینش با اختصاصیت و میل بالایی علیه آنتی ژن HER2 انتخاب شده اند. این نتیجه بسیار امیدوار کننده بود که تعداد ۳ کلون اختصاصی از ۴۶۵ کلون اولیه به دست آمد. تشابه در

همردیفی لوپ H3 دو تا از ۳ کلون scFv مثبت به دست آمده را اینگونه می توان تفسیر نمود که این دو scFv به احتمال زیاد، اپی توپ مشابه ای از آنتی ژن HER2 را شناسایی می کنند. البته اثبات این نظریه نیاز به بررسی بیشتر و مدل سازی برای بررسی نحوه اتصال آنتی بادی به اپی توپ های آنتی ژن HER2 دارد.

میزان بیان scFv آنتی بادی های کلون شده در وکتور بیانی که در سامانه باکتریای بهینه شده بود، از راندمان مناسبی با توجه به اندازه پروتئین نوترکیب برخوردار بود. دلیل این راندمان مناسب تولید پروتئین نوترکیب را می توان با انتخاب leader مناسب برای حمل سریع پروتئین به فضای پری پلاسمیک جهت جلوگیری از ایجاد سمیت داخل سلولی scFv ها برای باکتری و همچنین روش صحیح و بهینه شده استخراج پروتئین نوترکیب از فضای پری پلاسمیک مرتبط دانست. زیرا جایگزینی یا لوکالیزه نمودن پروتئین های بیان شده در فضای پری پلاسمیک، یکی از روش های متداول برای بیان پروتئین های نوترکیب محلول محسوب می شود و دارای چندین مزیت می باشد (۴۸). اکسیده شدن در این فضا به پروتئین اجازه تشکیل باند دی سولفیدی صحیح، تاخوردگی درست و پایداری بیشتر می دهد. همچنین استفاده از دستورالعمل شوک اسمزی می تواند میزان استحصال پروتئین نوترکیب از باکتری را نیز افزایش دهد (۲۶، ۴۹). تحقیقات بی شماری نشان داده اند که باکتری ها، مخمرها و سلول های پستانداران و حشرات میزبان های رایج برای تولید آنتی بادی های نوترکیب هستند (۴۵، ۴۶). همچنین آنتی بادی های بیان شده روی سطح فاز را می توان با انتقال ژن تولید کننده آنها به پلاسمیدهای بیانی در سلول های باکتری به صورت محلول تولید کرد (۴۷). از طرفی نیز نتایج الکتروفورز ژل SDS-Page نیز تأیید کردند که محصولات تخلیص شده تمیز و عاری از هرگونه ناخالصی پروتئینی و برش های آنزیمی نامطلوب بودند. لذا با توجه به نتایج این آزمون اینگونه می توان نتیجه گیری کرد که scFv آنتی بادی های استحصال شده به خوبی در سیستم باکتریایی بیان

شده، تاخوردگی صحیح داشته، پروتئازهای داخل سلولی آنها را برش نداده و به درستی خالص سازی شده اند.

با توجه به طراحی نمونه های کنترل مثبت و منفی برای آزمون ساندویچ وسترن بلات، نتایج حاصل از انجام این آزمون را اینگونه می توان تفسیر کرد که به احتمال زیاد scFv آنتی بادی های به دست آمده، واکنش متقاطع^۱ با سایر آنتی ژن های سطح سلول ندارند. البته برای اطمینان و اثبات عدم میل به اتصال scFv آنتی بادی های مثبت به سایر آنتی ژن ها، نیاز به طراحی کنترل منفی های بیشتر با استفاده از آنتی ژن های شناخته شده سطح سلولی به جز HER1 می باشد. ارزیابی نتایج کنتیک و افینیتی بیوسنسوری بیانگر این موضوع است که دو تا از کلون های مثبت از کیفیت مناسبی برای اتصال به آنتی ژن HER2 برخوردار بوده و در صورت نیاز نیز می توان با بکارگیری دانش بیوتکنولوژی و مهندسی پروتئین کیفیت آنتی بادی های را نیز در راستای اهداف مورد نظر بهبود بخشید. امروزه بیوسنسورها، ابزار های تجزیه و تحلیلی قدرتمندی هستند که به صورت اختصاصی با اندازه گیری سیگنال های حاصله نسبت به ثبت و اندازه گیری فعالیت های بیولوژیکی اقدام می کنند. از این رو دارای مزایای بی شماری از قبیل: حساسیت تشخیصی بالا، حداقل نمونه برای آماده سازی، مقرون به صرفه بودن، قابل رویت بودن نتایج و کاهش کلی زمان مورد نیاز برای تشخیص می باشند (۳۰-۳۲). در طی سال های اخیر مطالعات متعددی جهت بررسی راندمان استفاده از بیوسنسورها برای بررسی میل اتصال آنتی بادی به آنتی ژن صورت گرفته است. همچنین پژوهشگران بر این باورند که در مبحث بررسی کنتیک و میل اتصال آنتی بادی با آنتی ژن، بیوسنسورهای Octet راندمان مشابه ای نسبت به Biocore دارند با این تفاوت که در زمان استفاده از بیوسنسور Octet، به میزان بسیار کمتری از آنتی ژن و آنتی بادی مربوطه برای انجام آزمون نیاز می باشد (۳۳، ۳۴)

از طرفی نتایج آزمون فلوسایتومتری نیز اثبات نمود که scFv#2 یک متصل شونده قوی به آنتی ژن HER2 محسوب نمی شود که دلیل آن می تواند کوتاه بودن ناحیه اتصال لوپ H3 به اپی توپ آنتی ژن HER2 باشد. ضمن اینکه احتمال پنهان شدن اپی توپ شناسایی شده توسط آنتی بادی در حالت طبیعی بر روی سطح سلول به دلیل شکل فضایی اپی توپ موجود بر روی سطح سلول می تواند دلیل دیگری باشد که اثبات این فرضیه ها نیز نیاز به مدل سازی و مطالعه بیشتر دارد. همچنین نتایج این آزمون نشان که تعداد ۲ کلون دیگر از scFv های به دست آمده متصل شونده های قوی و اختصاصی علیه آنتی ژن HER2 می باشند که دلیل آن را نیز می توان در تشابه توالی اسید آمینه ای لوپ H3 تعریف کرد. به علاوه، بر اساس نتایج فلوسایتومتری و بیوسنسور با توجه به کنترل های مثبت و منفی طراحی شده می توان اینگونه جمع بندی کرد که برای اتصال اختصاصی scFv آنتی بادی های مثبت استحصال شده به سلول ها، بیش بیان شدن آنتی ژن HER2 بر روی سطح سلول ضروری می باشد که این نتایج تأیید کننده نظریه های بیان شده در مطالعات پیشین نیز می باشد (۵۰). بنابراین می توان اینگونه جمع بندی نمود که تکنولوژی نمایش فازی روشی ایده آل، مقرون به صرفه و قدرتمند برای جداسازی و استحصال آنتی بادی های جدید برای استفاده در بخش های تحقیقاتی، تشخیصی و با اندکی مهندسی و دستکاری ژنتیکی در بخش بالینی و درمانی می باشد.

نتیجه گیری

در این پژوهش ما با موفقیت توانستیم یک سری از scFv های اختصاصی که توانایی شناسایی و اتصال اختصاصی به قسمت خارج سلولی آنتی ژن HER2 را داشتند غربالگری و شناسایی کنیم. نتایج تحقیقات این پژوهش اثبات نمودند که از تعداد سه کلون scFv استحصال شده، همگی توانایی اتصال به آنتی ژن HER2 را هم در وضعیت نمایش فازی و هم در وضعیتی که اپی توپ های آنتی ژن در شرایط طبیعی

¹ Cross reactivity

نیاز های اساسی کشور در مبحث تشخیص و درمان سرطان های با عامل HER2 مثبت می باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی همکاران مرکز تحقیقات سرطان FOX Chase ایالات متحده آمریکا، معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد که از پروژه پیش رو حمایت مادی کرده و امکانات و تجهیزات پژوهشی لازم برای پیشبرد هرچه بهتر پروژه را مهیا نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

بر روی سطح سلول قرار دارند را دارا می باشند. اما این نتایج همچنین اثبات نمودند که scFv های شماره ۱ و ۳ از قابلیت و توانایی بهتری نسبت به scFv شماره ۲ برای ایجاد اتصال قوی به آنتی ژن HER2 برخوردار هستند. همچنین بررسی کنتیک و افینیتی آنتی بادی های استحصالی، آزمون های ساندویچ وسترن بلات کلاسیک و الیزا نشان دادند که از scFv های استحصالی می توان در سطح گسترده برای انجام آزمون های تشخیصی نیز استفاده نمود. لذا پژوهش حاضر یک مطالعه کاربردی برای پاسخگویی به یکی از

منابع:

1. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 2005 Sep;23(9):1147-57.
2. Souriau C, Hudson PJ. Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert Opin on Biolog Ther* 2003 Apr;3(2):305-18.
3. Arteaga CL. ERBB receptors in cancer: signaling from the inside. *Breast Cancer Res* 2011 Mar;13(2):304.
4. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Feb;2(2):127-37.
5. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 2008 Sep;19(9):1523-9.
6. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000 Jul;19(13):3159-67.
7. Sevcikova K, Vertakova-Krakovska B, Spanik S. Neoadjuvant Treatment in Patients with HER2-Positive Breast Cancer. *ISRN Oncol* 2013 May 23;2013:362467.
8. Chang HW, Nguyen DD, Washington E, Walker ID, Holloway SA. Phage display antibodies to allelic determinants of canine blood cells. *J Immunol Methods* 2006 Apr 20;311(1-2):1-11.
9. Marcus WD, Wang H, Lohr D, Sierks MR, Lindsay SM. Isolation of an scFv targeting BRG1 using phage display with characterization by AFM. *Biochem Bioph Res Commun* 2006 Apr 21;342(4):1123-9.
10. Rodriguez-Diaz J, Monedero V, Perez-Martinez G, Buesa J. Single-chain variable fragment (scFv) antibodies against rotavirus NSP4 enterotoxin generated by phage display. *J Virol Methods* 2004 Nov;121(2):231-8.
11. Carter P, Smith L, Ryan M. Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004 Dec;11(4):659-87.
12. Davis CG, Jia XC, Feng X, Haak-Frendscho M. Production of human antibodies from transgenic mice. *Methods Mol Biol* 2004;248:191-200.
13. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Ann R Immunol* 1994;12:433-55.
14. Brockmann EC, Vehniainen M, Pettersson K. Use of high-capacity surface with oriented recombinant antibody fragments in a 5-min immunoassay for thyroid-stimulating hormone. *Anal Biochem* 2010 Jan 15;396(2):242-9.
15. Hock B, Seifert M, Kramer K. Engineering receptors and antibodies for biosensors. *Biosens Bioelectron* 2002 Mar;17(3):239-49.
16. Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellnhofer G, et al. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 2000 Feb 11;296(1):57-86.
17. Maynard J, Georgiou G. Antibody engineering. *Ann Rev Biomed Eng* 2000;2:339-76.
18. Coomber DW. Panning of antibody phage-display libraries. Standard protocols. *Methods Mol Biol* 2002;178:133-45.
19. Romanov VI. Phage display selection and evaluation of cancer drug targets. *Curr Cancer Drug Targets* 2003 Apr;3(2):119-29.
20. Aina OH, Sroka TC, Chen ML, Lam KS. Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers* 2002;66(3):184-99.

21. Schirrmann T, Meyer T, Schutte M, Frenzel A, Hust M. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. *Molecules* 2011 Jan 10;16(1):412-26.
22. Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, et al. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J* 1994 Feb 1;13(3):692-8.
23. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991 Dec 5;222(3):581-97.
24. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press;2001:1-2344.
25. Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, et al. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods* 1997 Feb 14;201(1):35-55.
26. Yuan QA, Simmons HH, Robinson MK, Russeva M, Marasco WA, Adams GP. Development of engineered antibodies specific for the Mullerian inhibiting substance type II receptor: a promising candidate for targeted therapy of ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2006 Aug;5(8):2096-105.
27. Martin AC. Accessing the Kabat antibody sequence database by computer. *Proteins* 1996 May;25(1):130-3.
28. Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol* 1991 Sep 1;147(5):1709-19.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 May 7;72:248-54.
30. Singh A, Poshtiban S, Evoy S. Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. *Sensors (Basel)* 2013 Jan 30;13(2):1763-86.
31. Abdiche YN, Lindquist KC, Stone DM, Rajpal A, Pons J. Label-free epitope binning assays of monoclonal antibodies enable the identification of antigen heterogeneity. *J Immunol Methods* 2012 Aug 31;382(1-2):101-16.
32. Bee C, Abdiche YN, Stone DM, Collier S, Lindquist KC, Pinkerton AC, et al. Exploring the dynamic range of the kinetic exclusion assay in characterizing antigen-antibody interactions. *Plos One* 2012;7(4):e36261.
33. Abdiche Y, Malashock D, Pinkerton A, Pons J. Determining kinetics and affinities of protein interactions using a parallel real-time label-free biosensor, the Octet. *Anal Biochem* 2008 Jun 15;377(2):209-17.
34. Bee C, Abdiche YN, Pons J, Rajpal A. Determining the binding affinity of therapeutic monoclonal antibodies towards their native unpurified antigens in human serum. *Plos One* 2013 Nov 6;8(11):e80501.
35. Geuijen CA, Clijsters-van der Horst M, Cox F, Rood PM, Throsby M, Jongeneelen MA, et al. Affinity ranking of antibodies using flow cytometry: application in antibody phage display-based target discovery. *J Immunol Methods* 2005 Jul;302(1-2):68-77.
36. Ladner RC, Sato AK, Gorzelany J, de Souza M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today* 2004 Jun 15;9(12):525-9.
37. Thie H, Meyer T, Schirrmann T, Hust M, Dubel S. Phage display derived therapeutic antibodies. *Curr Pharm Biotechnol* 2008 Dec;9(6):439-46.
38. Nelson AL, Reichert JM. Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat Biotechnol* 2009 Apr;27(4):331-7.
39. Hirose M, Hayano T, Shirai H, Nakamura H, Kikuchi M. Isolation of anti-glutathione antibodies from a phage display library. *Protein Eng* 1998 Mar;11(3):243-8.
40. Khan NA, Greenman J, Topping KP, Hough VC, Temple GS, Paget TA. Isolation of Acanthamoeba-specific antibodies from a bacteriophage display library. *J Clin Microbiol* 2000 Jun;38(6):2374-7.
41. Vitaliti A, Wittmer M, Steiner R, Wyder L, Neri D, Klemenz R. Inhibition of tumor angiogenesis by a single-chain antibody directed against vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000 Aug 15;60(16):4311-4.
42. Ayat H, Burrone OR, Sadghizadeh M, Jahanzad E, Rastgou N, Moghadasi S, et al. Isolation of scFv antibody fragments against HER2 and CEA tumor antigens from combinatorial antibody libraries derived from cancer patients. *Biologicals* 2013 Nov;41(6):345-54.
43. Adams GP, Schier R. Developing Anti-HER2/neu Single-Chain Fv Fragments from Phage Display Libraries. *Methods Mol Med* 2001;39:729-47.
44. Drebin JA, Link VC, Weinberg RA, Greene MI. Inhibition of tumor growth by a monoclonal antibody reactive with an oncogene-encoded tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U SA* 1986 Dec;83(23):9129-33.
45. Schirrmann T, Al-Halabi L, Dubel S, Hust M. Production systems for recombinant antibodies. *Front Biosci* 2008 May 1;13:4576-94.
46. de Graaf M, van der Meulen-Muileman IH, Pinedo HM, Haisma HJ. Expression of scFvs and scFv fusion proteins in eukaryotic cells. *Methods Mol Biol* 2002;178:379-87.
47. O'Brien PM, Aitken R. Broadening the impact of antibody phage display technology. Amplification of immunoglobulin sequences from species other than humans or mice. *Methods Mol Biol* 2002;178:73-86. Review.
48. Mergulhao FJ, Monteiro GA. Periplasmic targeting of recombinant proteins in Escherichia coli. *Methods Mol Biol* 2007;390:47-61.

49. Kipriyanov SM. High-level periplasmic expression and purification of scFvs. *Methods Mol Biol* 2002;178:333-41.
50. Ceran C, Cokol M, Cingoz S, Tasan I, Ozturk M, Yagci T. Novel anti-HER2 monoclonal antibodies: synergy and antagonism with tumor necrosis factor-alpha. *BMC Cancer* 2012 Oct 4;12:450.