بسم الله الرحمن الرحيم
الحمد لله رب العالمين الرحمن الرحيم مالك يوم الدين
إياك نعبد وإياك نستعين اهدنا الصراط المستقيم
صراط الذين أنعمت عليهم غير المغضوب عليهم
ولا الضالين

١١١٤٧١

دانشکده دامپزشکی

شماره پایان نامه ۱۹۰

ساخت cDNA Library از مخزن آنتی بادی های شتر علیه آنتی ژن های توموری انسان

پایان نامه دکترای حرفه ای دامپزشکی

الهام بهوندی

۱۳۸۸ /۳/ ۱۲

استاد راهنما

دکتر محمد رضا محزونیه-دکتر هدی آیت

۱۳۸۷

۱۱۱۴۷۱

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری عمومی دامپزشکی خانم الهام بهوندی

تحت عنوان

ساخت cDNA library از مخزن آنتی بادی های شتر علیه آنتی ژن های توموری انسان

درتاریخ ۱۳۸۷/۱۱/۱ توسط کمیته تخصصی زیر بررسی و با رتبه ممتاز مورد تصویب نهایی قرارگرفت .

۱-استاد راهنمای پایان نامه	دکتر محمد رضا مخزونیه
۲- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر هدی آیت
۳-استاد مشاور	دکتر خداداد پیر علی خیر آبادی
۴-استاد مشاور	دکتر محمد علی موذنی
۵- استاد داور	دکتر عزیز ا... ابراهیمی
۶- استاد داور	دکتر حسین نورانی
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر پژمان میر شکرایی

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که دراین پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ گونه مسئولیتی را دراین زمینه تقبل نمی نماید .

دکترعبدالکریم زمانی مقدم

رئیس دانشکده دامپزشکی

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق
موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است

با تشکر و قدردانی از:

استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمد رضا محزونیه و سرکار خانم دکتر آیت که با راهنمائی‌ها و دلسوزی‌های خالصانه و بی‌دریغ خود مرا در انجام این پروژه یاری رساندند که به راستی شاگردی در محضر ایشان برایم افتخاری بس بزرگ است.

استاد محترم جناب آقای دکتر خداداد پیر علی که در تمام طول مدت اجرای این پروژه راهنما و مشوق من بودند و نیز دکتر محمد علی موذنی که به عنوان استاد مشاور زحمت این پایان نامه را تقبل فرمودند

جناب آقای دکتر علی محمد احدی که در به انجام رساندن این پایان نامه من را یاری نمودند.

اساتید گرامی جناب آقای دکتر حسین نورانی و جناب آقای دکتر عزیز ا... ابراهیمی که زحمت داوری این پایان‌نامه را تقبل نمودند.

خواهران عزیزم، فاطمه حسین پور، سارا برجیان، سمیه سجادی، شهلا مشایخی، قدسیه تاجری و همه همکلاسی‌های عزیزم به خاطر تمام دلسوزی‌ها و مهربانی هایشان.

تقدیم به بیکران مهر وعطوفت

مهدی موعود

یگانه شاهراه عشق و عرفان

جز امتداد نگاه او نیست

مرا هزار امید است

و هر هزار تویی...

هر هزار تویی...

علم پیچکی است که از داربست زمان بالا می رود و در پیچ و تاب روزگار متغیر می شود، من برگی از آن را چیدم و بر صفحه ای انگاشتم. این تحفه را اول به وجود نازنین مادرم که عطر حضور و گرمای نفسش همیشه آرامش بخشم بود میکنم و بعد تقدیم به پدرم سرو پایداری که در دریای طوفان زده ی عمرم لحظه ای رهایم نکرد. تقدیم به برادر و خواهرانم که بی گمان تمام احساس وجودم غلیان در عشق نسبت به آن هاست.

فهرست

عنوان **صفحه**

چکیده ۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱-پیشگفتار ۲

۱-۲-هدف ۵

فصل دوم

کلیات

۲-۱-تاریخچه ۶

۲-۲-انواع آنتی ژن ۱۰

۲-۲-۱-انواع آنتی ژن ها از نظر ماهیت ۱۰

۲-۲-۲-آنتی ژن های توموری ۱۱

۲-۳-عوامل کنترل کننده سیستم وپاسخ های ایمنی ۱۴

۲-۳-۱-آنتی ژن ۱۴

۲-۳-۲- ژنتیک وشرایط فیزیولوژیک میزبان ۱۵

۲-۴- ایمونوگلوبولین ها ۱۵

۲-۴-۱-ساختمان ایمونوگلوبولین ها ۱۵

۲-۴-۲- اجزاء ومتعلقات ایمونوگلوبولین ها ۱۷

۲-۴-۳-باز آرایی ژن های ایمونوگلوبولینی ۱۸

۲-۴-۴-سازمان ژنتیکی ۱۸

۲-۴-۵-ترتیب باز آرایی ژنی ۱۹

۲-۴-۶- میزبان‌ها ۲۰

۲-۵-تفاوت VH و VHH ۲۱

۲-۵-۱-تفاوت توالی ژنومی ۲۱

۲-۵-۲-تفاوت های ساختاری ۲۴

۲-۶-ویژگی های آنتی بادی های تک دومنی ۲۶
۲-۷-تولید HCAb در شتر ها ۳۱
۲-۸-کاربرد های درمانی دومن های VHH ۳۳
۲-۹-کتابخانه ژنی آنتی بادی ۳۷
۲-۱۰-لاین سلولی SK-BR-3 ..... ۳۸
۲-۱۱-آزمایش ایمونوفلئورسانس ۴۰
۲-۱۱-۱-انواع روش های ایمونوفلئورسانس ۴۱
فصل سوم
مواد و روش کار
۳-۱-مواد و وسایل مورد استفاده ۴۴
۳-۱-۱-مواد مورد نیاز ۴۴
۳-۱-۲-وسایل مورد استفاده ۴۷
۳-۲-کشت سلول ۴۷
۳-۲-۱-پاساژ به فلاسک های دیگر ۴۸
۳-۲-۲-فریز کردن سلول ها ۴۸
۳-۲-۳-جمع آوری سلول ها ۴۹
۳-۳-ایمن سازی شتر ۴۹
۳-۴-خونگیری و نمونه برداری از شتر ۵۰
۳-۴-۱-جدا کردن لنفوسیت ها ۵۰
۳-۵-استخراج mRNA از طحال ۵۰
۳-۶-سنتز cDNA ۵۱
۳-۷-PCR ۵۲
۳-۸-الکتروفورز محصول PCR ۵۳
۳-۹- ایمونوفلئورسنت ۵۴
فصل چهارم
نتایج
۴-۱-اثبات ایمن سازی شتر ۵۵

۴-۲-الکتروفورز محصول PCR.....۵۵
فصل پنجم
بحث.....۵۷
فهرست منابع.....۶۴
چکیده لاتین.....۷۱

چکیده

برای استفاده از آنتی بادی ها به عنوان عوامل تصویر برداری و درمانی باید اندازه مولکول ها به حدی کوچک باشد که بتوانند به آنتی ژن های موجود در تومور متصل شوند . از طرفی در مورد آنتی بادی های در مانی باید ابعاد آنتی بادی ها به قدری بزرگ باشد که دوره های زمانی مناسب بتوانند در گردش خون باقی بمانند. در طبیعت واحد های متصل شونده به آنتی ژن به طور طبیعی در شتر ها و لاماها تولید می شوند. این واحد ها جزئی از آنتی بادی های زنجیره سنگین می باشند که به طور طبیعی در شتر ها و لاما ها تولید می شوند. دومن های VHH شتر مولکول های غیر ایمونولوژیک هستند که حذف خونی فارماکوکاینتیک سریع دارند و می توانند به طور اختصاصی تومورها را هدف قرار دهند. در این مطالعه پس از سه هفته کشت لاین سلولی Sk-BR-3 و سپس جمع آوری سلول ها، این سلول ها توسط نیتروژن مایع لیز شدند و ۳بار به فاصله دوهفته به یک نفر شتر تزریق شدند. قبل از کشتار از شتر خونگیری به عمل آمد و لنفوسیت های آن جدا شده و در c°۷۰- ذخیره شدند. پس از کشتار شتر طحال آن جدا گردید و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه حدود mg ۳۰ از طحال بریده و پس از لیز، mRNA موجود در آن توسط کیت استخراج mRNA استخراج گردید. RT-PCR توسط کیت cDNA Syntetesis انجام و cDNA از روی mRNA الگو ساخته شد. سرانجام PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی VHH که یکی به توالی رهبر و دیگری به دومن CH2 متصل می شد، توسط آنزیم های Pfu و Taq polymerase صورت گرفت. مقداری از محصول PCR مورد الکتروفورز قرار گرفت و باند های ۶۰۰ و ۹۰۰ کیلو بازی که به ترتیب کدکننده دومن های VHH و VH بودند مشاهده شدند. در ضمن ایمونوفلورسنت بر روی سرم شتر صورت گرفت و نقاط سبز رنگ در زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند که حاکی از ایمن شدن حیوان با ایمونوژن مورد استفاده بود.

فصل اول

مقدمه

۱-۱-پیشگفتار

سرطان سینه یکی از سرطان‌های شایع است. طبق محاسبات انستیتو ملی سرطان ایالات متحده آمریکا، از هر هشت زن یک نفر در زندگی خود مبتلا به سرطان پستان می‌شود. این سرطان در صورتی که به موقع تشخیص داده‌شود به راحتی قابل درمان است.در صورت متمرکز بودن بافت سرطانی معمولاً از ترکیبی از عمل جراحی.(لامپکتومی)، شیمی درمانی، و رادیوتراپی استفاده می گردد. ماموگرافی نیز در تشخیص این بیماری نقش محوری دارد.سرطان سینه یک بیماری هتروژن می‌باشد که یک علت مشخص برای آن در نظر گرفته نمی‌شود

مولکول HER2/neu که با نام ErbB-2 نیز شناخته شد ه است همان رسپتور فاکتور رشد اپیدرمی شماره ۲- انسان[1] می باشد و پروتئینی است که باعث افزایش حالت تهاجمی سرطان های پستان می شود. این پروتئین که جزئی از خانواده پروتئینی ErbB می باشد به عنوان CD340 نیزشناخته شده است.

به دلیل نقش این پروتئین در پاتوژنز سرطان سینه به عنوان مولکول هدف در درمان این سرطان مورد توجه قرار گرفته است.

[1] Human Epidermal growth factor Receptor 2

این پروتئین رسپتور تیروزین کیناز متصل به سطح غشای سلول می باشد و معمولاً در مسیر های انتقال پیام[1] که منجر به رشد وتمایز سلول می شود ، نقش ایفا می کند (Olayioye، ۲۰۰۱). تقریباً در ۲۰-۱۵ درصد از سرطان های سینه تکثیر در ژن و بیان بالای محصول پروتئینی آن را مشاهد ه می کنیم. بیا ن بالای این رسپتور موجب بروز نوع بدخیم سرطان سینه و پیشگویی[2] ضعیف این بیماری می گردد. با این اوصاف این بیان بالا در بافت های توموری ، HER2 را یک هدف مناسب برای درمان تومور می کند.

در بین داروهایی که به منظور درمان سرطان تولید شده اند، آنتی بادی ها کلاسی از داروها هستند که در سال های اخیر پیشرفت چشمگیری در این زمینه داشته اند(کارتر، ۲۰۰۱). بسته به استفاده نهایی آنتی بادی ها توسط مهندسی ژنتیک ، تغییراتی در ژنوم کد کننده آن هاداده می شود تا خصوصیا ت بیولوژیک آن ها با مورد استفاده آن ها همراه شود. علاوه بر این از مهندسی ژنتیک برای طراحی مولکول هایی با ویژگی و عملکرد بالا، کاهش اندازه آنتی بادی ، ایجاد اشکال مولتی والان[3] که از اتصال چند مولکول آنتی بادی به وجود می آیند برای بالا بردن توانایی[4] آنها برای درمان سرطان کمک گرفته می شود.

چندین آنتی بادی مونوکلونال موشی علیه دومن خارج سلولی پروتئین HER2 پیدا شده است که تکثیر سلول های سرطانی انسان را که به میزان زیادی HER2 را بیا ن می کنند، هم در آزمایشگاه وهم در بدن انسان مهار می کند.

جستجو برای کوچکترین قطعه آنتی بادی که توانایی اتصال به آنتی ژ ن خود را حفظ کرده باشد منجر به ساخت قطعات Fab و قطعات تک زنجیره ای Fv شد. این مولکول ها از قدرت نفوذ بیشتری به بافت توموری و کلیرانس خونی سریعتر و ایمنی زایی کمتری در مقایسه با مولکول کامل آنتی بادی برخوردارند. علی رغم این ویژگی های مفید، قطعات ScFv نیاز به مطالعات گسترده در زمینه پایداری(Willuda و همکاران، ۱۹۹۹) ، میزان بیان ، مقاومت در برابر پروتئازها و تجمع[5] آن ها که به دلیل قطعات لینکر سنتزی آن ها ایجاد می شود (Withlow و همکاران، ۱۹۹۳) دارند.

آنتی بادی های زنجیره سنگین که فاقد زنجیره سبک می باشند به طور طبیعی در کوسه های پرستار[6] (Green berg و همکاران ، ۱۹۹۵) ، کوسه های وابگونگ[7] (Nuttall و همکاران، ۲۰۰۱) و خانواده شتر سانان[8] (Harmsen-Casterman و همکاران، ۱۹۹۳) یافت می شوند.

---

[1] Signal Transduction
[2] Prognosis
[3] Multivalent
[4] Efficiency
[5] Aggrigation
[6] Nurse sharks
[7] Wobbegong sharks
[8] Camelidae

محل اتصال به آنتی ژن این آنتی بادی ها تنها یک دومن[1] دارد. به همین دلیل از دومن متغیر آنتی بادی ها ی زنجیره سنگین که حاوی کوچکترین قطعات آنتی بادی (وزن مولکولی ۱۵κ D) هستند ولی هنوز خاصیت اتصال به آنتی ژن خود را حفظ کرده اند با نام نانو بادی یاد می کنند.

اندازه کوچک و استحکام این آنتی بادی ها (Arbabi Ghahroudi و همکاران، ۱۹۹۷; Dumolin و همکاران، ۲۰۰۲)، عملاً آن ها را برای هدف گیری آنتی ژن هایی که در موقعیت های دور از دسترس هستند و نفوذ به بافت برا ی دسترسی به آن ها سخت است، مناسب می کند. به علاوه نانو بادی هایی که از شتر به دست می آیند تشابه زیادی با خانواده ژنی VH3 انسان نشان می دهند(Vu و همکاران، ۱۹۹۷).

cAb-Lys3 نانو بادی حاصل از شتر که می تواند فعالیت لیزوزیم را در آزمایشگاه مهار کند (Arbabi Ghahroudi و همکاران، ۱۹۹۷) به طور موثر توانست تومورها و ضایعات متاستاتیک حاصل از تومور ترانسژنیک مدل موشی SCID که لیزوزیم را در سطح غشای خود بروز می داد مهار کنند. آنتی بادی های اضافی به سرعت ازطریق سیستم پاکسازی خونی از بدن دفع شدند و هیچ باقیمانده ای در ارگان های سالم از خود به جا نگذاشتند (Cortez-Ritamozo و همکاران، ۲۰۰۲).

چگونگی استفاده از آنتی بادی در درمان سرطان ها بسیار متفاوت است. یکی از زمینه های مهم وفعال تحقیقاتی که سال ها است محققین را به خود مشغول داشته استفاده از آنتی بادی ها به عنوان گلوله های سحر آمیز[2] است.یکی از روش ها آن است که آنتی بادی ها به آنتی ژن های سطح سلول توموری متصل شده مواد توکسیک را به طور انتخابی به سلول های توموری منتقل نموده و باعث کشته شدن آنها می شوند. به علاوه ممکن است از تجویز آنتی بادی های اختصاصی ضد سلول های T جهت تقویت غیر اختصاصی پاسخ سلولی استفاده شود. از جمله آنتی بادی های ضد توموری متصل شده به مولکول های توکسیک، رادیوایزوتوپ ها و داروها، که همگی درایمونوتراپی بیماران سرطانی یا حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفته اند، آنتی بادی های آنتی–ایدیوتیپ که در درمان لنفومای سلول های B که ایمونوگلوبولین های سطحی خاصی با ایدیوتیپ های مشخصی را عرضه می کنند، آنتی بادی های هتروکونژوگه که این امکان رافراهم می کنند که سلول های سایتو توکسیک وارد تومور شوند و نیز آنتی بادی هایی که در درمان بیماران مبتلا به لنفوم سلول B در تخلیه سلول های توموری مغز استخوان به روش لیز با واسطه آنتی بادی و کمپلمان، برای پیوند اتولوگ مغز استخوان با استفاده از آ ن ها صورت می گیرد (ایمونولوژی وجگانی، ۱۳۸۵).

---

[1] Domain
[2] Magic bullets

۱-۲- هدف:

مطالعه ی حاضر بررسی امکان تهیه کتابخانه cDNA علیه آنتی ژن های لاین سلولی SK-BR-۳ می باشد. این لاین سلولی برخی از آنتی ژن هایی که در سرطان سینه بروز می یابند از جمله HER-۲ را بیان می کند. این کتابخانه که یک کتابخانه ایمن می باشد می تواند برای تولید دومن های VHH از طریق پرایمر های اختصاصی شتر مورد استفاده قرار گیرد که به همین منظور PCR نیز صورت گرفته و امکان تولید این دومن ها ارزیابی می شود. در ادامه می توان این قطعات ژنی کوچک را وارد وکتور مناسب نمود و پس از غربالگری و جدا کردن VHH دلخواه آن را در باکتری مناسب کلون نمود.

ازVHHها می توان درمصارفی که نیاز به پایداری بالا دارند، نظیر شامپو برای جلوگیری از شوره سر (Dolk و همکاران، ۲۰۰۵)، به دام انداختن معرف ها در خالص سازی، ایمونوافینیتی (Verheesen و همکاران، ۲۰۰۳)، استفاده در بیوسنسورها (Pleschberger و همکاران ، ۲۰۰۴) و هم در درمان بیماری های مختلف مانند آنکولوژی (Revets و همکاران، ۲۰۰۵) ، عفونت ها، بیماریهای نورودژنراتیو و التهابی استفاده نمود.

فصل دوم

کلیات

۲-۱ - تاریخچه:

در سال ۱۹۷۵ میلستن[1] و کوهلر[2] تکنولوژی آنتی بادی مونوکلونالی را معرفی کردند که می تواند لاین سلولی موشی را جاودان کرده ویک نوع آنتی بادی با ویژگی منحصر به فرد ترشح نماید. این تکنولوژی که هیبریدوما نامیده می شود امکان جداسازی وتولید آنتی بادی مونوکلونال ضد آنتی ژن های کربوهیدراتی ، اسید های نوکلئیک وهاپتن ها را فراهم کرده است. گذشته از اهمیت این تکنولوژی به عنوان یک ابزار تحقیقاتی، دسترسی به آنتی بادی مونوکلونال موشی راه را برای توسعه روش های درمانی و تشخیصی سرطان های انسان باز کرد.

کاربرد آنتی بادی های مونوکلونال موشی[3] در انسان محدودیت های تکنیکی و موانع بسیاری در پی داشت از جمله هزینه بالا ی تولید ، ناتوانی در استفاده از روش های بهینه سازی آنتی بادی با مهندسی ژنتیک، و ایمنی زایی قوی در انسان (Kuus-Reichel و همکاران، ۱۹۹۴).

---

[1]-Milsten
[2]-Kohler
[3]-Murine

به منظور غلبه بر ناتوانی ها اخیر روش هایی ابداع شدند ودر نتیجه این تلاش ها آنتی بادی های زیر تولید شدند:

۱-آنتی بادی های (Chimeric) که از به هم پیوستن نواحی متغیر موشی با نواحی ثابت انسانی تولید می شوند (Boulianne و همکاران، ۱۹۸۴).

۲- آنتی بادی های انسانی شده که کاملاً داربست انسانی دارندو فقط نواحی CDR متصل شونده به آنتی ژن آن ها موشی شده (Riechmann و همکاران، ۱۹۸۸).

۳- آنتی بادی های Veneered که قطعات آنتی بادی غیر انسانی هستند که تعدادی از واحد های موجود در نواحی داربست آن ها تغییر یافته و نظیر همتای خود در آنتی بادی انسانی گشته است (Padlan، ۱۹۹۱).

یکی از انواع از آنتی بادی های مونوکلونالی که برای درمان مورد استفاده قرار می گیرند و در بازار موجودند کاملاً موشی هستند (Orthoclone-OKT3, Johnson and Johnson) و چهار تای دیگر هستند Chimeric یعنی دارای VL و VH موشی و نواحی ثابت انسان می باشند (ReoPro,Centocor ; Simulect , Novartis; Remicade, Centocore ; Ritunax, IDEC) و ۳ آنتی بادی انسانی شده اند یعنی همه نواحی ثابت و داربست انسانی شده اند و فقط نواحی CDR آن ها ازآنتی بادی موشی منشا گرفته اند(Mylotarg, ; Herceptin, Genentech ; Sunagis ,MedImmune ; Zenapax, Protein Design Lab Wyeth). بدیهی است که این نمونه ها شاهدی بر قدرت درمانی آنتی بادی های مونوکلونال ومشتقات آن می باشد. تولید صحیح این هیبریدوماهای انسانی مشکل تر از آن چیزی بود که انتظار می رفت. با این وجود به نظر می رسد بوجود آوردن موش های ترانسژنیک که دارای بخش های زیادی از جایگاه های ایمونوگلوبولین انسانی هستند چشم انداز روشنی برای تولید آنتی بادی های مونوکلونال انسانی ترسیم می نماید (Green و همکاران، ۱۹۹۴؛ Bruggemann and Neuberge، ۱۹۹۶؛ Harding و Lonberg، ۱۹۹۵).

بیان ژن های آنتی بادی در باکتری منجر به کاهش هزینه تولید و تسهیل مهندسی ژنتیک بر روی ژن های آنتی بادی گشت. با این وجود آزمایشات اولیه برای تولید آنتی بادی در باکتری با سطوح پایین تولید آنتی بادی های عملکردی همراه بود(Boss و همکاران، ۱۹۸۴؛ Cabilly و همکاران، ۱۹۸۴)

در سال های اخیر مهندسی ژنتیک موفق به کلونینگ و مهندسی قطعات کوچکتر آنتی بادی شده است (Winter and Milsten، ۱۹۹۱؛ Winter و همکاران، ۱۹۸۸) .

قطعات آنتی بادی ویژه مانند Fab و Fv (هترودایمرهای به هم پیوسته غیر هم ارز از دومن های VL و VH) با موفقیت در باکتری ها (Skerra and Pluckthun ، ۱۹۸۸؛ Better و همکاران، ۱۹۸۸)، مخمرها یا قارچ ها (Frenken و همکاران، ۱۹۹۸) بیان شدند. به علاوه از طریق مهندسی پروتئین می توان خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و نیز عملکردی قطعات آنتی بادی را در جهت بالا بردن پایداری، کاهش ایمنی زایی، توزیع بافتی

و پاکسازی خونی سریعتر (زمانی که در بدن موجود زنده به کار می روند) بهبود بخشید (Wo و همکاران، ۱۹۹۶).

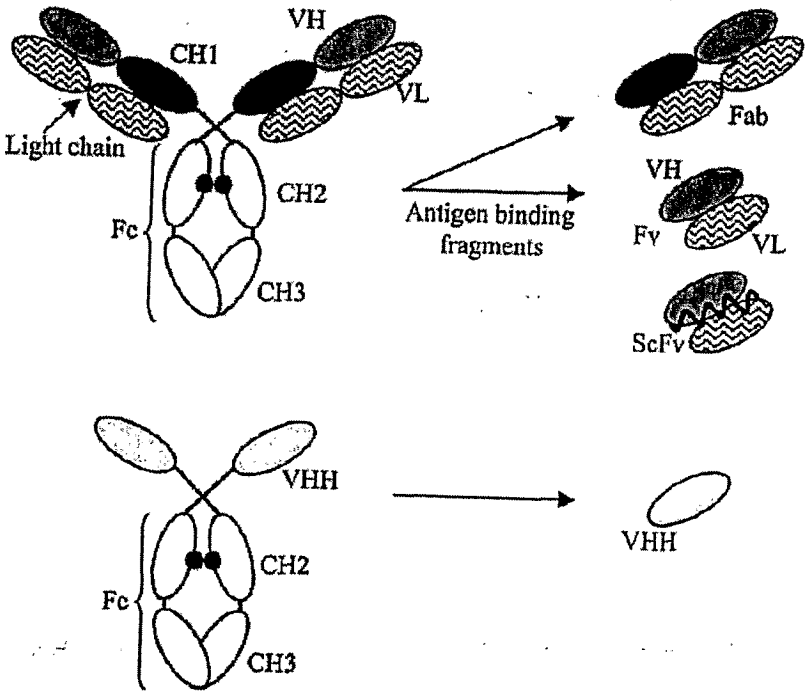
علی رغم این پیشرفت ها موانع تکنیکی بسیاری برسر راه کاربرد این تکنولوژی در مقیاس صنعتی وجود داشت، برای مثال برای ایجاد قطعات Fv پایدار بایداز یک لینکر پپتیدی انعطاف پذیر و هیدرو فیلیک که دومین های VH و VL را به یکدیگر متصل می کند، استفاده نمود تا یک قطعه Fv تک زنجیره ای(ScFv) پایدار ایجاد شود (Bird و همکاران، ۱۹۸۹; Hoston و همکاران، ۱۹۸۸ ، تصویر۱-۲ ، ScFv) در غیر این صورت به محض رقیق شدن، دو دومین VL و VH از یکدیگر تفکیک می شوند. متأسفانه این قطعات ScFv از افینیتی پایینی در مقایسه با آنتی بادی های والد خود برخوردارند (borrebaeck و همکاران، ۱۹۹۲; Mallender و همکاران، ۱۹۹۶; Glockshuber و همکاران، ۱۹۹۰) و قطعات لینکر اغلب موجب تجمع ScFv شده و به آسانی با پروتئولیز تجزیه می شوند (Whintlow و همکاران، ۱۹۹۳).

قطعات متصل شونده به آنتی ژنی که تنها از دومین متغیر (VH) آنتی بادی های معمولی تشکیل شده نیز در گذشته تولید شده اند (Ward و همکاران، ۱۹۸۹) در مقایسه با دومن های VL ، چنین دومن های VH ویژگی اتصال به آنتی ژن آنتی بادی های والد خود راحفظ می کنند چون CDR3 این دومین ها سهم زیادی در اتصال به آنتی ژن ایفا می کند. با این وجود برداشتن دومن های VL از قطعات FV سطح هیدروفوبیک بزرگی را از دومین VH در معرض حلال قرار می دهد به طوری که مولکول های VH جدا شده چسبناک شده و از این رو تولید شکل محلول این آنتی بادی ها مشکل است، به علاوه یک تا سه برابر از مقدار افینیتی در مقایسه با ScFv کاسته می شود (Borrebaeck و همکاران، ۱۹۹۲)، در نتیجه کاربرد آنتی بادی های VH به عنوان یک جایگزین با ارزش از آنتی بادی های مونوکلونال ممکن نشد.

در سال ۱۹۹۳ ، هامرس[1] و کاسترمن[2] متوجه شدند که سرم شترهای یک کوهانه (Dromedaries) و لاماها خواص منحصر به فردی ازآنتی بادی دارند یعنی آن ها فاقد هرگونه زنجیره سبک می باشند (Hamers-Casterman و همکاران، ۱۹۹۳ ; تصویر۲- ۱). زنجیره های سنگین این آنتی بادی های زنجیره سنگین که(HCAb) نامیده می شوند وزن مولکولی پایین تری نسبت به همتا ی خود در آنتی بادی های دو زنجیره ای دارند. این تفاوت به دلیل غیاب دومین CH_1 در این نوع آنتی بادی هاست. آنتی بادی های تک زنجیره ای با یک نوع دومن متغیر با آنتی ژن متصل می شوند که این دومن را برای تفریق از VH آنتی بادی های معمولی VHH می نامند(Muyldermans و همکاران، ۱۹۹۴). به معنای دقیق کلمه،

---

[1]-Hamers
[2]-Casterman



تصویر۲-۱-نمای شماتیک از آنتی بادی های چهار زنجیره ای (بالا) و زنجیره سنگین (پایین) موجود در سرم شتر. زنجیره سبک به صورت کامل (دومن های هاشور زده) و دومن CH_1 (دومن رنگ سیاه) در آنتی بادی های زنجیره زنگین شتر وجود ندارند. دومن های متصل شونده به آنتی ژن آنتی باد ی های چهار زنجیره ای بعد از پروتئولیز یا بعد از کلونینگ و بیان قطعات ژنی VH و VHH نشان داده شده اند. لینکر سنتزی نشان داده شده بین VH و VL دایمر های ScFv را ایجاد می کند. VHHکوچکترین قطعه آنتی بادی است که توانایی اتصال به آنتی ژن را دارد (Muyldermans، ۲۰۰۱).

VHHها، کوچکترین قطعه متصل شونده به آنتی ژن با وزن مولکولی (۱۵KDa) می باشندکه از ایمونوگلوبولین های کاربردی مشتق می شوند.

کلونینگ VHH در وکتورهای فاژی، و تولید آنتی بادی ها و جدا سازی انواع مفید بر اساس قابلیت اتصال انتخابی به آنتی ژن از طریق غربالگری و بیان VHH مورد نظر در باکتری ها، روش جالبی برای به دست آوردن واحد های تشخیصی مولکولی کوچک می باشد.

VHHهای حاصل از یک شتر یک کوهانه یا لاما در مقایسه با Fab، Fv یا ScFv مشتق شده از ایمونوگلوبولین های پستانداران دیگر مزیت هایی دارد:

اول اینکه در مورد VHH فقط نیاز به کلون و بیان کردن یک دومن برای ایجاد یک قطعه متصل شونده به آنتی ژن کامل و کارآمد است.

دوم خصوصیات ذاتی VHH هاست که موجب قابلیت های بالقوه آن ها از جمله حلالیت و پایداری بالای این قطعات آنتی بادی می شود.

امروزه پس از ۳۰ سال از تولید آنتی بادی های مونوکلونال (mAbs) از طریق کاربرد لاین سلولی هیبریدوما، این آنتی بادی ها یک نیروی پرقدرت برای صنعت زیست دارویی محسوب می شوند.

توانایی اتصال این مولکول ها به مولکول هدف با افینیتی و ویژگی بالا موجب بهره جستن از این آنتی بادی ها به عنوان عوامل درمانی و تشخیصی گشته است. پر فروش ترین داروهای آنتی بادی با نام های تجاری Remicade، *Ritoxan* و *Humira* امروزه با فروشی معادل چند بیلیون دلار رشدی سریعتر را نسبت به انواع دیگر آنتی بادی به خود اختصاص داده اند. در حال حاضر ۱۵ نوع آنتی بادی مونوکلونال مورد تأیید قرار گرفته و در بازار موجود است و بیش از ۱۵۰ آنتی بادی دیگر در مرحله آزمایشات کلینیکی هستند.

۲-۲-آنتی ژن

آنتی ژن اصطلاحی است که از آن به دو منظور مختلف استفاده می شود. گاهی منظور از آنتی ژن ماده ای است که باعث ایجاد پاسخ ایمنی می شود و زمانی منظور ماده ای است که به طور اختصاصی می تواند با آنتی بادی ایجاد شده واکنش دهد (اگر چه قادر به ایجاد پاسخ نباشد).

۲-۲-۱-انواع آنتی ژن ها از نظر ماهیت

پروتئین ها

اصولاً همه‌ی پروتئین ها ایمونولوژیک نیستند لیکن قدرت ایمنی زایی هر یک با دیگری فرق می کند. همچنین اگر چه یک پروتئین بیگانه می تواند باعث تولید آنتی بادی شود اما ویژگی پاسخ در مقابل پروتئین های مختلف متفاوت است از جمله اینکه پروتئین های دناتوره نسبت به همنوع طبیعی خود از ایمنی زایی کمتری برخوردارند. غالباً مجتمع شدن مولکول های پروتئینی موجب می شود ایمنی زایی آن به طور قابل ملاحضه ای افزایش یابد اگر چه تعداد شاخص های آنتی ژنیک به اندازه ی مولکول سطح خارجی و وسعت نواحی از آن که با محیط اطراف تماس بیشتری دارند بستگی دارد. لیکن در پروتئین های کروی ارتباط بین ساختمان مولکولی و خاصیت آنتی ژنیک بسیار پیچیده تر از سایر آنتی ژن هاست زیرا در این مولکول ها کیفیت شاخص ها به میزان زیادی به شکل فضایی مولکول بستگی دارد. در این حالت شاخص آنتی ژنیک از کنار هم قرار گرفتن اسیدهای آمینه ای که ممکن است بطور طبیعی بسیار از هم دور باشند تشکیل می شوند اما در پروتئین های رشته ای شاخص ها ترتیبی بوده و از سه تا شش اسید آمینه ی متوالی تشکیل می شوند.

پلی ساکارید ها

آنتی ژن های خالص پلی ساکاریدی برای برخی گونه ها (انسان و موش) ایمنی زا بوده ولی برای سایر گونه ها (خرگوش و خوکچه هندی) ایمنی زا نیستند. شاخص های پلی ساکاریدی غالباً ترتیبی اند و از ۴ تا ۶ قند

تشکیل شده اند. پلی ساکارید های میکروبی و آنتی ژن های گروه های خونی از جمله آنتی ژن های پلی ساکاریدی هستند.

اسید های نوکلئیک

اسید های نوکلئیک آنتی ژن هایی هستند که خواص و ویژگی های آنتی ژنیک آن ها بسیار دیرتر از پروتئین ها و پلی ساکاریدها شناخته شده است. اگر چه تاکنون ایمونوژنی تهیه نشده که در حیوانات آزمایشگاهی آنتی بادی ضد DNA دو رشته ای ایجاد کند لیکن این آنتی بادی ها در افرادی که به بیماری های نادری مثل لوپوس اریتماتوز مبتلا هستند و همچنین در اختلالات خاصی در موش و سگ یافت می شوند.

لیپید ها

مهمترین لیپید ها فسفولیپید هایی نظیر اسفنگو میلین، سفالین و گلیکواسفنگولیپیدهایی مثل گالاکتوسربروزیدها هستند. عصاره ی لیپیدی بافت های مختلف در بیماری سفلیسس و آنتی ژن فورسمن که در حضور کمپلمان و آنتی سرم مربوطه باعث لیز گلبول های قرمز گوسفند می شوند از جمله این آنتی ژن هاست.

آنتی ژن های مصنوعی

اغلب آنتی ژن هایی که باعث پاسخ توموری می شوند را می توان به صورت مصنوعی تولید نمود.در سال های اخیر ایمونوژن هایی کاملاً مصنوعی شامل قطعات پپتیدی پوشش پروتئینی ویروس ها ، مثل باکتریوفاژ MS2، ویروس هپاتیت یا توکسین های باکتر یایی(دیفتری – وبا) نیز تولید شده اند.

آلرژن ها

آنتی ژن هایی که باعث واکنش های ازدیاد حساسیت فوری(با تولید IgE) یا تأخیری می گردند را آلرژن می نامند. گرد و غبار، قارچ ها مو و پشم حیوانات، گرده گیاهان، پروتئین های باکتریایی غذا یا داروها هر یک می توانند آلرژن باشند.

۲-۲-۲-آنتی ژن های توموری

آنتی ژن های توموری را از گذشته برمبنای روش تشخیص ایمونولوژیک آن به دو گروه تقسیم می کنند:

گروه اول- آنتی ژن های توموری که توسط لنفوسیت های Tشناسایی می شوند. این آنتی ژن های توموری، پروتئین های سلولی هستند که در سلول ها یAPC پرورده و در کنار MHC به سلول های +TCD4