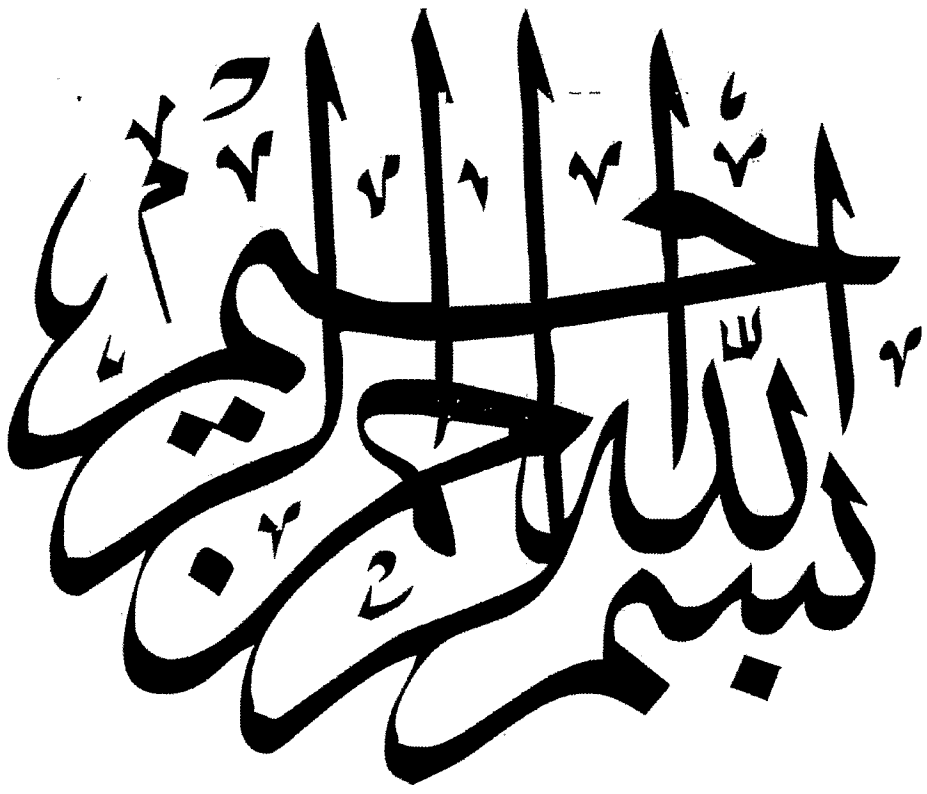

٩٩٤١٧

دانشگاه‌تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی

افزایش بیان آنتی بادی تک دومنی تک زنجیره ای متصل به پروتئین سبز فلورسانس با بهره گیری از درج اینتگراز ΦC31

نگارش:
یاشار سعدیان

استاد راهنمای اول:
دکتر محمد جواد رسائی

استاد راهنمای دوم:
دکتر فاطمه رهبری زاده

۱۳۸۷ /۵/ ۲۵

بهار ۸۷

۹۹۴۱۱

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد **آقای یاشار سعدیان** رشته: **بیوتکنولوژی پزشکی** گرایش: تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

آقای دکتر محمد جواد رسایی (استاد راهنمای اول)

خانم دکتر فاطمه رهبری زاده (استاد راهنمای دوم)

آقای دکترحسین عبدل تهرانی (نماینده تحصیلات‌تکمیلی)

آقای دکتر بهرام کاظمی (استاد ناظر)

آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم (استادناظر)

۹۹۴۷

آئین نامه پایان نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی- پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلا به طور کتبی به دفتر" دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته بیوتکنولوژی پزشکی است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی دکتر ... مشاوره دکتر ... از آن دفاع شده است."

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به" دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ٤: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب ..... دانشجوی رشته بیوتکنولوژی پزشکی کارشناسی ارشد مقطع ..... تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام ونام خانوادگی [redacted]

تاریخ و امضا ۸۷/۳/۷

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

نام و نام خانوادگي . یاشار عدیلی
تاریخ و امضاء ۸۷/۳/۷

سپاس گزاری

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

و

جناب آقای دکتر محمد جواد رسائی و سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری زاده که رهنمودهای ایشان در پیمودن این مسیر همواره بهره جستم. همچنین از سرکار خانم دکتر معصومه رجبی بذل، جناب آقای دکتر داود احمدوند، جناب آقای محسن نواری و سرکار خانم فرنوش جعفری کمال تشکر را دارم.

چکیده
با ابداع تکنولوژي هیبریدوما، تحول شگرفي در عرصه علوم بیوتکنولوژي و پزشکي ایجاد شد و آنتي بادي هاي منوکلونال خود را به عنوان یك عامل موثر در درمان، تصویر برداري و صنعت مطرح کردند. در اوایل دهه نود وجود یك رده جدید از آنتي بادي ها در سرم شتر اثبات شد. این آنتي بادي ها فاقد زنجیره سبك و دومن CH1 که در دیگر آنتي بادي ها وجود دارد، بودند. بنابراین، کوچکترین ذراتي که آنتي ژن متصل مي شوند کشف و VHH نام گرفتند. با توجه به اهمیت روزافزون آنتي بادي در صنعت و درمان، نیاز مبرم به تولید در سطح انبوه وجود دارد. در راستاي تحقق این مهم، میزبان هاي مختلفي به منظور تولید مورد استفاده قرار گرفته اند که از جمله آنها مي توان به *E. coli*، *Pichia pastoris*، سلولهاي حشرات، گیاهان نوتركیب و رده هاي سلولي یوکاریوتي اشاره نمود. با توجه به وجود پیوندهاي دي سولفیدي و الگوهاي گلیکوزیلاسیون در آنتي بادي ها، سلولهاي یوکاریوتي از جمله CHO، Sp2/0 و NS0 براي تولید آنتي بادي ارجحیت دارند. طاقت فرساترین مرحله در تولید رده سلولي یوکاریوتي مولد، ایجاد و انتخاب سلولي است که به طور پایدار آنتي بادي در حجم بالا تولید مي کند بدون اینکه رشد آن مختل شود. در راستاي افزایش بیان آنتي بادي از سیستم هاي آنزیم دي هیدروفولات ردوکتاز، گلوتامین سنتاز و درج اختصاصي با آنزیم هاي اینتگراز استفاده شده است. در این تحقیق از آنزیم اینتگراز ΦC31 به منظور درج و افزایش بیان ژن آنتي بادي شتري متصل به پروتئین سبز فلورسانت در سلولهاي یوکاریوتي استفاده شد. سلولهاي CHO، SP2/0، MCF-7 و Cos-7 مورد آزمایش قرار گرفتند. هم انتقالي پلاسمید هاي حاوي ژن آنتي بادي و اینتگراز به سلولهاي Sp2/0 با نرخ بسیار پایین انجام شد که منجر به غربالگري موفق سلول ها نشد. بیان در سلول Cos-7 موقت و ناپایدار بود. بیان در سلول هاي MCF-7 در مقایسه با سلول CHO پائین تر بود. در نتیجه، سلول هاي CHO به گزینه اصلي انتخاب شدند. نتیجه واکنش RT-PCR بعد از **60** روز نشان داد که سلول ها به طور پایدار آنتي بادي تولید مي کنند. اما با استفاده از تکنیك هاي بیو شیمیائي از جمله الایزا و وسترن بلاتینگ افزایش قابل توجهي در بیان مشاهده نشد.

فهرست

فصل ۱ ..... ۳
۱-۱- آنتي بادي ۳
۱-۱-۱- تاريخچه ۳
۱-۱-۲- ساختار آنتي بادي ۳
۱-۱-۳- كاربرد آنتي بادي هادر كلينيك ۴
۱-۱-۴- انواع آنتي‌باديهاي نوتركيب ۴
۱-۱-۵-*VHH* ۱۱
۱-۲- توليد آنتي بادي ۱۴
۱-۲-۱- بيان در *E. coli* ۱۵
۱-۲-۲- بيان در مخمر ۱۷
۱-۲-۳- بيان در سلولهاي حشرات ۱۸
۱-۲-۴- بيان در سلولهاي پستانداران ۲۰
۱-۳- درج ژنومي (Genomic Integration) ۲۶
۱-۳-۱-*PhiC31* و عملكرد آن ۲۹
۱-۳-۲- مناطق درج *(Integration sites)* ۳۱
۱-۳-۳- موارد استفاده انزيم *PhiC۳۱ 31* به غير از ژن درماني(*Non gene thrapy uses of the PhiC31integrase*) ۳۴
۱-۳-۴- ژن درماني با انزيم *31PhiC* (*Gene Therapy with ΦC31 integrase*) ۳۵
۱-۳-۵- ايمني در استفاده از آنزيم *PhiC31* (*SAFETY*) ۳۹
فصل ۲ ..... ۴۲
۲-۱- مواد ۴۲
۲-۱-۱- بافرها ۴۲
۲-۱-۲- رنگ برادفورد ۴۳
۲-۱-۳- محيطهاي كشت ۴۴
۲-۱-۴- پلاسميدها ۴۶
۲-۱-۵- كيتها ۴۶
۲-۱-۶- پرايمرها ۴۶
۲-۱-۷ رده هاي سلولي ۴۷
۲-۱-۸- وسايل ۴۸
۲-۱-۹- دستگاه ها ۴۸
۲-۲- روشها ۴۸
۲-۲-۱- روشهاي مشترك استفاده شده ۴۸
۲-۲-۲- كلونينگ ژن اينتگراز در وكتور *pcDNA3.1* ۵۴
۲-۲-۳- كلونينگ قطعه *attB* در وكتور *pcDNA3.1-RR81-GFP* ۵۵
۲-۲-۴- هم انتقالي وكتورهاي *pCMV-int* و *pcDNA3.1-RR81-GFP* به سلول هاي *CHO* ۵۵
۲-۲-۵- هم انتقالي وكتورهاي *pCMV-int* و *pcDNA3.1-RR81-GFP* به سلول هاي *MCF-7* ۶۵
۲-۲-۶- هم انتقالي وكتورهاي *pCMV-int* و *pcDNA3.1-RR81-GFP* به سلول هاي *Cos-7* ۶۵
۲-۲-۷- هم انتقالي وكتورهاي *pCMV-int* و *pcDNA3.1-RR81-GFP* به سلول هاي *SP2/0* ۶۶
فصل ۳ ..... ۶۷
۳-۱- كلون كردن ژن اينتگراز فاژ C31Φ در وكتور pCDNA3.1 ..... ۶۷
۳-۱-۱- تخليص پلاسميد هاي *pIJ8600* و *pCDNA3.1* ۶۷

۳-۱-۲- واکنش *PCR* بروي ژن اینتگراز ۶۷
۳-۱-۳- هضم آنزیمي ژن اینتگراز و پلاسمید *pCDNA3.1* ۶۸
۳-۱-۴- واکنش لیگاسیون بین ژن اینتگراز و پلاسمید *pCDNA3.1* ۶۹
۳-۱-۵- الکتروپوریشن سازه حاوي ژن اینتگراز در باکتري *TG1* و تائید کلونینگ با هضم آنزیمي ۶۹
۳-۲- تخلیص و هضم آنزیمي پلاسمیدهاي pCMV-INT و pTA-attB ۷۱
۳-۳- کلون کردن قطعه attB در پلاسمید pCDNA3.1 داراي فیوژن VHH-GFP ۷۲
۳-۳-۱- تخلیص پلاسمید *pCDNA3.1* داراي فیوژن *VHH-GFP* ۷۲
۳-۳-۲- تکثیر قطعه *attB* ۷۳
۳-۳-۳- هضم آنزیمي قطعه *attB* و پلاسمید *pCDNA-RR81-GFP* ۷۴
۳-۳-۴- واکنش لیگاسیون بین کردن قطعه *attB* و پلاسمید *pCDNA3.1* داراي فیوژن *VHH-GFP* ۷۵
۳-۳-۵- الکتروپوریشن سازه حاوي ژن *VHH-GFP* و قطعه *attB* در باکتري *TG1* و تائید کلونینگ با هضم آنزیمي ۷۵
۳-٤- هم انتقالي وکتورهاي pCMV-int و pcDNA3.1-RR81-GFP به سلول هاي CHO ۷۶
۱) با استفاده از کلسیم فسفات ۷۶
۲) با استفاده از Lipofectamine2000 ..... ۷۷
۳) با استفاده از Arrest-in ۸۰
۳-۴-۱- نتایج *RT-PCR* ۸۳
۳-۴-۲- نتایج *ELISA* ۸۴
۳-۴-۳- نتیجه *SDS-PAGE* ۸۵
۳-۴-۴- نتیجه *Western Blotting* ۸۵
۳-٥- هم انتقالي وکتورهاي pCMV-int و pcDNA3.1-RR81-GFP به سلول هاي MCF-7 ..... ۸۶
۳-۶- هم انتقالي وکتورهاي pCMV-int و pcDNA3.1-RR81-GFP به سلول هاي Cos-7 ..... ۸۷
۳-۷- هم انتقالي وکتورهاي pCMV-int و pcDNA3.1-RR81-GFP به سلول هاي SP2/0 ..... ۸۷
فصل ۴ ..... ۸۹
٤-۱- بحث و نتیجه گیري ۸۹
4-2- منابع ۹۶

فصل ۱

۱-۱- آنتي بادي

۱-۱-۱- تاريخچه

تحقيقات بر روي مولكول آنتي بادي از سال ۱۹۳۰ توسط Landsteiner آغاز شد كه در نهايت Edelmanو Porter در سال ۱۹۷۲ جايزه نوبل پزشكي را به خود اختصاص دادند[۱].
در سال ۱۹۷۵ با ابداع تكنولوژي هيبريدوما و به دست آوردن توانائي عرضه آنتي بادي منوكلونال تحول شگرفي در علوم پزشكي و داروئي ايجاد شد. در دهه ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ با پيشرفت هاي حاصله در مهندسي ژنتيك و تكنيك نمايش فاژي عرصه را براي يافتن آنتي بادي هاي منوكلونال هموار نمود.

۱-۱-۲- ساختار آنتي بادي

آنتي بادي ها در پنج كلاس اصلي IgG, IgM, IgD, IgE, IgA طبقه بندي مي شوند. با توجه به اين نكته كه IgG مهمترين كلاس مي باشد در اين بخش به توضيح ساختار ان پرداخته خواهد شد. مولكول IgG شامل هموداimري از دو زنجيره سبك و سنگين است كه در آن زنجيره سبك ۲۵۰ اسيد آمينه بادو حوزه ايمنوگلوبوليني و زنجيره سنگين ۴۵۰ اسيد آمينه با ۴ حوزه ايمنوگلوبوليني طول دارد. هر زنجيره از يك بخش ثابت و يك بخش متغير تشكيل شده است. بخش متغير داراي سه ناحيه ۱۲-۹ اسيد امينه اي تحت عنوان CDR مي باشد. شش ناحيه CDR زنجيره سبك و سنگين در كنار يكديگر يك سطح اختصاصي براي اتصال به آنتي ژن را فراهم مي كنند[۲].

۱-۱-۳- کاربرد آنتي بادي هادر کلينيك

با بذل توجه به اين نكته كه آنتي بادي ها توانائي اتصال اختصاصي به آنتي ژن را دارا مي باشند, انها را به عنوان يك ابزار به منظور درمان و تصوير برداري تبديل نموده است به طوري كه سازمان FDA تا كنون با استفاده از ۱۸ آنتي بادي منوكلونال در درمان انواع سرطان موافقت نموده است[۳.]

اخيرا دو آنتي بادي به نام هاي Tositomomab و Ibritumomab كه به ترتيب به راديو ايزوتوپ هاي ^{131}I و ^{90}Y متصل هستند براي درمان لنفوم غير هوچكيني به كار رفته اند[۴]. همچنين از Alemtuzumab در درمان chronic lymphocytic lymphoma, ، bevacizumab در درمان metastatic renal cell carcinoma, Rituximab در درمان rheumatoid arthritis , Herceptin در درمان سرطان سينه و... استفاده مي شود[۵، ۶، ۷، ۸].

۱-۱-۴- انواع آنتي‌باديهاي نوتركيب

۱-۱-۴-۱- آنتي‌باديهاي كايمريك انساني - موشي

گرچه ساخت آنتي‌باديهاي منوكلونال موشي از دهه ۱۹۷۰ توسط Kohler و Milstein انقلابي در علم ايمونولوژي به حساب مي‌آيد و اين ابداع، پديد آوردندگان‌اش را محقّ دريافت جايزه نوبل نمود، ولي آنتي‌باديهاي منوكلونال موشي به علت ايمونوژن بودن در انسان و ايجاد پديدهٔ HAMA، قابليت استفاده در ايمونوتراپي انسان را نداشت. گسترش و بهبود مهندسي ژنتيك نقطه مركزي استفاده باليني آنتي‌باديها مي‌باشد. تكنولوژي تهيه آنتي‌بادي نوتركيب (rAb) اين امكان را فراهم كرد تا آنتي‌باديهاي منوكلونال موشي ساخته شده به انواع كايمرهاي انساني - موشي تبديل شوند و گاهاً فقط مناطق بسيار متغير[1] (CDR) از منشاء موشي باقي مانده است. اين تكنولوژي اثر بارزي بر كاهش ايمونوژني، به كارگيري افكتورهايي مثل

[1]- Complementarity – determining regions

کمپلمان و سیتوتوکسیك سلها ونیمه عمر این عوامل در جریان خون دارد. گرچه در مقایسه با آنتیبادیهای موشي، کایمرهاي مذکور کمتر پاسخ ایمني را تحریك میکنند، ولي هنوز پتانسیل تحریك پاسخ ایمني وجود دارد و در ۱۲% از بیماران، بسته به طبیعت آنتیژن هدف، فرآیند درمان، جدول زماني و مقدار تجویز آنتیبادي، پاسخهاي ایمني دیده شده است.

مزیت دیگر کایمر کردن این آنتیبادیها، افزایش طول عمر آنتیبادي در جریان خون میباشد. در آنتیبادیهاي کایمر انساني - موشي قسمت Fc که از IgG انساني گرفته شده است میتواند مولکول کایمر را همچون IgG انساني به رسپتور ویژة Fc بر سطح سلولهاي اندوتلیال (رسپتورهاي FcRn یا رسپتورهاي Brambell) متصل کرده و در نتیجه آنتیبادي اندوسیتوز شده به جاي تخریب داخل سلولي، دائماً به صورت یك جریان چرخه اي به خون بر میگردد. در حالي که آنتیبادي منوکلونال جوندگان قابلیت اتصال به FcRn رسپتورها را نداشته و با ورود به مسیرهاي تخریب داخل سلولي مرتباً از سیرکولاسیون خارج میشود [۹].

۱-۱-۴-۲- مهندسي قطعات آنتیبادي

در سال ۱۹۸۸ تکنیك مهندسي آنتیبادي بوسیله Skerra و همکاران با بیان قطعات آنتیبادي در E. coli تجدید حیات یافت. از کوچکترین مدل این قطعات، Fv بود که با اتصال VH و VL (قسمتهاي متغییر از زنجیرة سنگین و سبك آنتیبادي) بدست میآید. چون اینتراکشنهاي هیدروفوبیك بین این دو دومن قوي نیست، پس اتصالات کووالان براي ساخت مولکول پایدار لازم است. معمولترین طرح، استفاده از یك لینکر[1] قابل ارتجاع پپتیدي است که از ۱۵ تا ۲۰ اسید آمینه ساخته شده است و

[1]- Linker

دو دومن فوق را به هم متصل مي‌كند. قطعه حاصل قطعه F_v تك رشته اي(scFv) گفته مي‌شود. طرح ديگر مهندسي يك باند دي سولفيدي در سطح واكنشگر بين VH و VL است، كه اين فرم در سرم نسبت به حرارت پايدارتر از scFv مي‌باشد.

شكل ديگر قطعات آنتي‌بادي، Fab گفته مي‌شود و از يك زنجيره سبك كامل همراه با VH و CH1 (از زنجيره سنگين) ساخته مي‌شود. اين قطعه چندين مزيت نسبت به scFv دارد: ۱) دو زنجيره بطور طبيعي اتصال كووالانت دارند، ۲) قطعه Fab قادر به ديمريزه شدن نيست پس تعيين افينيتي آن راحت‌تر است ۳) قطعه CH1 را مي‌توان به عنون يك نشانه[1] براي ارزيابي‌ها به كار برد و ٤) پايدارتر از scFv است.

مينيبادي شكل ديگر قطعات آنتي بادي است كه از اتصال دومن HC3 به دو scFv يا Fab ساخته مي‌شود. اين مولكول سرعت جدا شدن (Kd) كمتري دارد و به صورت ديمر است و حدود ۱۲۰-۹۰ كيلودالتون وزن دارد. در گزارشي از Lee و همكاران به منظور تسهيل روشهاي تلقيح ژن براي ايمونوتراپي با آنتي‌بادي، يك ايمونوگلبولين تك رشته‌اي جديد طراحي شده كه در انتهاي كربوكسيلي آن ناحيه ثابت زنجيره سبك با يك لينكر از Gly-Ser به طول ۳۰ اسيد آمينه به انتهاي متغيير از زنجيره سنگين (VH) متصل است. آنتي‌بادي حاصل تك رشته‌اي و ضمناً حاوي همة دومن‌هاي IgG است. خواص اتصال به آنتي‌ژن اين آنتي‌بادي تك رشته‌اي در *in vitro* با آنتي‌بادي معمولي قابل مقايسه است. از طرفي خاصيت كشندگي سلولي وابسته به آنتي‌بادي (ADCC) در آنتي‌بادي كامل تك رشته‌اي و آنتي‌بادي معمولي نيز تقريباً مشابه مي‌باشد. كلاً طرح single – gene براي توليد يك مولكول آنتي‌بادي مي‌تواند موجب سهولت تلقيح ژن در *in vivo* و ترانس فكشن ex vivo به لنفوسيتهاي ارتشاح يافته به تومور در پروتكل‌هاي ايمونوتراپي، گردد[۱۰، ۱۱].

---

[1]- Tag

۱-۱-۴-۳- آنتي‌بادي نوتركيب چند ظرفيتي

آنتي‌بادي‌هاي كامل مولكولهاي چند ظرفيتي هستند كه همين مسئله افزايش قابل ملاحظه‌اي در تمايل كلي (avidity) آنها ايجاد مي‌كند و به اين علت اتصال خود به خود به دو يا چند آنتي‌ژن هدف انجام مي‌شود (مولكولهاي IgG دو ظرفيتي و IgM ده ظرفيتي هستند). Fv كوچكترين قطعه‌اي است كه حاوي افينيتي اتصال يك ظرفيتي از آنتي‌بادي والد سالم مي‌باشد. بطور ايده‌آل وجود تعداد بيشتر بازوهاي اتصال به آنتي‌ژن، موجب افزايش تمايل كلي به آن آنتي‌ژن مي‌شود و در اين مسئله قابليت ارتجاعي بين جايگاههاي اتصال به آنتي‌ژن هم اهميت دارد. اخيراً هموديمرهاي داراي اتصالات متقاطع يا چهار بازوي Fab ساخته شده است كه با رسپتورهاي مجاور بر روي سطح يك سلول اتصال متقاطع داشته و در نتيجه انتقال پيام داخل سلولي و آپپتوز را فعال نموده است. در مورد آنتي‌باديهاي ويژة ماركرهاي سلول سرطاني اگر نحوة مهندسي به گونه‌اي باشد كه ساختار ارتجاعي‌تر باشد و قابليت متصل كردن متقاطع مولكول‌هاي رسپتور را داشته باشند، اثرات درماني بهتري ايجاد خواهد شد. البته اين قضيه اغلب با بزرگي مولكول همراه مي‌شود كه در نتيجه مولكول نفوذ مؤثر كمي در تومور خواهد داشت. پس براي كاهش دادن اندازة مولكول همراه با حفظ اويديتي، چندين تلاش موفق براي ساخت مولكولهاي Fab به فرم مولتي‌مر و ديمر كه داراي قدرت ايجاد اتصال متقاطع باشند، با روشهاي شيميايي انجام شده است و به اين ترتيب عواملي با اويديتي زياد و اندازه مناسب كه بين ۶۰ تا ۱۲۰ كيلودالتون است و نفوذ سريع در تومور و پاكسازي مناسب كليوي دارد ساخته شده است. براي افزايش تمايل به آنتي‌ژن از scFvهاي يك ظرفيتي مجموعه‌اي به شكل ديمر، تريمر و يا تجمع‌هاي بزرگتر ساخته شده

است.

شايد ساده‌ترين طرح براي ديمرهاي scFv دو ظرفيتي، ديابادي[1] (٦٠ كيلودالتون) باشد. در اين مولكول يك لينكر كوتاه ٥ اسيد آمينه‌اي بين دومن V_L و V_H از هر يك از scFvها قرار داده مي‌شود كه مانع از جفت شدن V_H و V_L در يك مدل F_v مي‌شود و به جاي آن دو مولكول scFv با هم يك ديمر مي‌سازند. ديابادي دو جايگاه اتصال به آنتي‌ژن دارد. در صورتي كه لينكر از سه اسيد آمينه باشد، يك تريمر از كنار هم قرار گرفتن سه scFv ساخته مي‌شود (٩٠ كيلودالتون) كه در اين مولكول سه جايگاه كارآ براي اتصال به آنتي‌ژن وجود دارد. تجمع چهار scFv و ايجاد شكل چهار ظرفيتي نيز گزارش شده است.

در مطالعات هدفگيري سرطان با استفاده از قطعات آنتي‌بادي چند ظرفيتي، مولكولهاي كوچك مثل scFv، سريعاً از خون پاكسازي مي‌شوند. از طرفي آنتي‌باديهاي كامل، بزرگتراز حدي هستند كه نفوذ مؤثر به تومور داشته باشند و پاكسازي آهسته آنها مي‌تواند احتباس زيادشان در كبد و ساير ارگانها را به دنبال داشته باشد. برطبق آخرين مطالعات مولتي مرهايي كه با اندازه بين ٦٠ تا ١٢٠ كيلودالتون هستند و افينيتي كلي (اويديتي) بالايي دارند، مولكول ايده‌آل براي هدفگيري تومور به حساب مي‌آيند.

پيشرفت بعدي در فارماكوكينتيك بوسيله افزايش ميزان بار منفي سطحي يا تغييرات راديونوكلئوتيد از نظر شيميايي بدست مي‌آيد. هر دو استراتژي مذكور جذب كليوي را كه اغلب در مورد آنتي‌باديهاي كوچك و مهندسي شده ديده مي‌شود، كاهش مي‌دهند. بهبود اويديتي و نفوذ در تومور و توزيع مناسب اين ساختارهاي آنتي‌بادي نوتركيب در بدن، طراحي نسل بعدي عوامل هدفگيري و درمان تومور را به دنبال داشت [١٢،١٣].

---

[1]- Diabody

آنتي‌باديهاي نوتركيب با ويژگي دوگانه و يا چند عملكردي

الف) اتصال دو يا چند جايگاه اتصال به هم: براي اين مسئله بايد دومن‌هاي مختلف متصل شونده به آنتي‌ژن از طريق اتصالات با قابليت ارتجاعي كافي، به هم متصل شوند. كه در نتيجه حصول به اويديتي بالاتر و نيز اتصال به دو اپي‌توپ هدف متفاوت و مجاور هم ميسر مي‌شود. اين روش براي بهره‌گيري از سلولهاي T، ماكروفاژها و يا ويروسهاي سمي مثل Adeno-associated ويروسها در ژن درماني به كار رفته است.

يكي از راههاي ساخت آنتي‌باديي با دو جايگاه ويژه متفاوت (bi-specific)، ادغام دو ردة سلولي هيبريدوما با هم و انتخاب ردة سلولي quadroma در بين سلولهاي حاصل است. در ردة سلولي quadroma، محصول ايمونوگلبولييني مخلوط متنوعي از رشته‌هاي سبك و سنگين از سلولهاي والد متفاوت مي‌باشد. اين تكنيك گران و وقت گير است و استراتژي ساده‌تر شامل كونژوگاسيون شيميايي براي جفت كردن دو قطعه آنتي‌بادي با هم است.

ديابادي‌هاي دو ويژگي (Bi-specific) نيز ساختارهاي نوتركيب ساده‌اي هستند كه از تركيب دو scFv ساخته شده‌اند. از كاربردهاي اين ديابادي‌ها، اتصال متقاطع سلولهاي سرطاني با ايمونوگلبولين‌هاي سرم كه در نتيجه موجب القاء آبشار كمپلمان، فاگوسيتوز و انفجار فاگوسيت منوكلوئر و هدايت كشندگي سلولي توسط سلولهاي T سينرژيستيك مي‌شود[١٤، ١٦، ١٥].

١-١-٤-٤- آنتي‌باديهاي دو نقشي (Bi-functinal)

در اين استراتژي با استفاده از آنتي‌بادي خاص سلول به عنوان عوامل حمل، هدايت يك جزء كشنده سلولي به جايگاه تومور انجام مي‌شود. از نمونه‌هاي اين استرتژي، ادغام دومن Fc

به يك ساختار آنتي‌بادي نوتركيب ويژه به منظور القاء آبشار كمپلمان و اعمال سيتوتوكسيك مربوطه مي‌باشد. البته القاء اعمال فوق به صورت مؤثر به پايدار ماندن اتصال دي سولفيدي لولا به Fc و نيز قابليت انعطاف بستگي دارد.

بعضي از محققين به منظور هدايت ايمني، از اتصال آنتي‌بادي به سيتوكانيهايي مثل IL-2، GM-CSF و IL-12 و داروهاي سايتوتوكسيك، راديو نوكلئوتيدها، ليپوزوم ها، پپتيدها، پروتئين‌هايي مثل آنزيم‌ها و يا پيش داروها استفاده كرده اند [۱۸،۱۹،۱۷،۲۰].

در طي استراتژي APEDT (آنزيم - پيش دارو درماني هدايت شده بوسيله آنتي‌بادي) با استفاده از فيوژن پروتئين آنزيم - آنتي‌بادي براي فعال كردن يك پيش دارو در محل ويژه (سلول هدف) اقدام مي‌كنند. كپسولهاي حمل و يا دنباله هاي كاتيوني متصل شونده به DNA با آنتي‌باديها ادغام مي‌شوند تا ژن‌ها را مستقيم به محل حمل كنند. با اتصال و ادغام scFv به سطح T سلها، T-bodyهاي ساتيوتوكسيك خاص تومور را ساخته اند.

با اتصال آنتي‌باديهاي ويژه آنتي‌ژنهاي توموري به سيتوكانيها، اين عوامل در محدودة تومور متمركز مي‌شوند و به اين ترتيب مستقيماً اثر كشندگي تومور توسط آنتي‌بادي و يا پاسخ ايمني ميزبان (سلول كشنده طبيعي و يا B و T لنفوسيتها) عليه تومور را افزايش مي‌دهند. از طرفي با اتصال سيتوكانيها به آنتي‌بادي، از عوارض مصرف سيستماتيك سيتوكانيها مثل تب، سميت كارديوواسكولار و گاستروانتستينال و ... اجتناب مي‌شود و سيتوكاين با غلظت بالا در محل تومور متمركز مي‌شود. در اين فرم از آنتي‌باديهاي نوتركيب مثل scFv، Fab و ... استفاده شده است [۲۱،۲۲،۲۳].

۱-۱-۴-۵- آنتي‌بادي‌هاي متصل به سوپرآنتي‌ژن

سموم باكتري‌هاي گرم مثبت از دسته پروتئين‌هاي فعال كننده لنفوسيتهاي T مي‌باشند كه سوپرآنتي‌ژن (SAg) گفته مي‌شود. با پيشرفت تكنولوژي DNA نوتركيب، آنتي باديهاي ويژة تومور را به سوپرآنتي‌ژنها متصل كرده و در نتيجه سلولهاي T را مستقيماً به محل تومور مي‌كشند. اين مسئله باعث مي‌شود كه عوارض جانبي كه از در معرض بودن وسيع با سوپرآنتي‌ژنها براي فرد حادث مي‌شود، حذف گردد. قابليت SAgها براي فعال كردن نسبت زيادي از سلولهاي T در فرآيند وابسته به MHC كلاس II، منجر به نامگذاري سوپرآنتي‌ژن براي اين عوامل شد. از طرفي سوپر آنتي‌ژنها مي‌توانند در سيستم *in vitro* و *in vivo* ترشح TNFα، TNFβ، IL-6، IL1β، IFN-γ و IL-2 را القاء كنند. CTLهاي هدايت شده توسط SAgها سلولهاي هدف را كه داراي MHC كلاس II هستند، ليز مي‌كنند. اين پديده كشندگي سلولي وابسته به SAg (SDCC) گفته مي‌شود. چون MHC كلاس II در اغلب سلولهاي سرطاني بيان نمي‌شود و يا بيان هترولوگوس در مجموعة سلولهاي يك تومور ديده مي‌شود، پس SAgها هميشه و به تنهايي قابليت عمل ندارند. براي مهندسي SAgهاي داراي فعاليت ضدتوموري، فيوژن پروتئين نوتركيب شامل آنتي‌بادي واكنش دهنده با TAA به صورت متصل به SAg استفاده شده است.

بعد از مشاهدة اثرات جانبي به علت توليد سيتوكانيهاي پيش التهابي مثل TNFα و IL-1β و IL-6، با تغييرات مهندسي ژنتيكي، SAg موتانت كه در آن افينيتي اتصال به MHC كلاس II صدبرابر كمتر شده است مورد استفاده قرار گرفت[۲۴، ۲۵، ۲۶].

۱-۱-۵- VHH

در سال ۱۹۹۳ سرم انواع شترهاي يك كوهانه و لاما كه حاوي نوع منحصر به فردي از آنتي‌بادي‌هاي فاقد رشته سبك هستند شناسايي شد. رشته سنگين از اين آنتي‌باديهاي شتري كه به

آنتي‌بادي‌هاي زنجيره سنگين(HCAb) معروف شده است نسبت به همتاي خود در آنتي‌بادي‌هاي معمولي‌به علت غياب اولين دومن CH1، وزن كمتري دارد.چون رشته سبك حذف شده است، آنتي‌بادي‌هاي زنجيره سنگين فقط از طريق تك دومن VH شان (كه براي تفاوت نسبت به VHمعمولي VHH گفته مي‌شود) به آنتي‌ژن وصل مي‌شوند. به اين ترتيب تك دومن VHH كوچكترين قطعه آنتي‌بادي متصل شونده به آنتي‌ژن است كه قطعه كامل آن وزني در حدود ۱۵-۱۲ كيلو دالتون دارد و از يك ايمونوگلوبين داراي قدرت اتصال مشتق شده است. VHH از ۹ رشته β كه در دو صفحه قرار دارند و دو صفحه با پيوندهاي ديسولفيدي در مقابل هم مستحكم شده است.

مطالعات نشان دهنده تفاوتهاي ساختاري‌بين VH و VHHمي‌باشد. گر چه درVHH نيز سه ناحيه CDR وجود دارد اما ناحيه CDR3 در آن شامل ۲٤ اسيد آمينه و طويل تر از ساير آنتي‌باديها مي‌باشد. به نظر مي رسد اين افزايش طول تا حدي منجر به اتصال بهتر به آنتي‌ژن شده و عدم وجود VLرا جبران نمايد. سايز بزرگ در دومن‌هاي V شتري كه با يك باند دي سولفيدي داخل لوپي پايدار شده است، يك جزء مهم و بحراني دز ايجاد سطح مناسب و كافي متصل شونده به آنتي‌ژن مي‌باشد[۲۷].

۱-۱-۵-۱- مزاياي VHH نسبت به ساير آنتي‌باديهاي نو تركيب

۱-۱-۵-۱-۱-هموژي زياد با دومن VH انساني

مقايسه توالي VH انساني وVHH درجه بالايي از هموژي را نشان مي‌دهد. انساني كردن آنتي‌باديهاي VHH شتري در مقايسه با انواع موشي ، به علت كوچكتر بودن VHHو نيز هموژي‌بالاي آن با VH انساني‌بسيار ساده‌تر و كارآتر است. با توجه به ساختار VHH ، مي‌توان پيشگويي كرد كه اغلب جايگزيني‌ها با سكانس انساني ، بجز در مورد اسيد آمينه‌هاي كليدي مشترك در

ناحيه داربستي ۲ (FR2) بدون تغيير در عملكرد و خواص آن قابل اجراست[۲۷].

شناسايي اپي‌توپهاي منحصر بفرد فضايي

ناحيه متصل شونده به آنتي‌ژن، در آنتي‌باديهاي معمولي‌بسته به نوع آنتي‌ژن از يک سطح صاف يا مقعر تشكيل شده است. پس اين آنتي‌باديها قادر به شناسايي اپي توپهاي فرو رفته و مخفي نمي‌باشند. اندازه كوچك VHH و طويل بودن ناحيه CDR3 در آن، امكان شناسايي چنين اپي‌توپهايي را فراهم مي‌آورد[۲۷].

۱-۱-۵-۱-۱-۱-نفوذپذيري و پاكسازي مناسب

آنتي‌باديهاي نوتركيب تك دومني‌به علت اندازه كوچكشان نسبت به ايمونوگلوبولين هاي معمولي قابليت نفوذپذيري بهتري در بافتها و تومورهاي سخت دارند و پاكسازي‌شان از خون به سرعت كافي انجام مي‌شود[۲۷و۲۸].

۱-۱-۵-۱-۱-۲-ويژگي نسبت به آنتي‌ژن و تمايل بالا

افينيتي گزارش شده براي VHH هاي خاص آنتي‌ژن قابل مقايسه با افينيتي قطعات Fab و scFv كه براي همان آنتي ژن‌ها ساخته شده است مي‌باشد. تمايل VHH هاي جداسازي شده از كتابخانه‌هاي ايمن در حد نانو مولار و مشابه منومرهاي جداسازي شده از آنتي‌باديهاي منوكلونال مي‌باشد[۲۷].

۱-۱-۵-۱-۱-۳-حلاليت و پايداري زياد

خصوصيت ديگر VHH محلول بودن آن است . به علت جايگزيني اسيد آمينه هاي خاص موجود در سطح تماس با آنتي‌ژن درVHH با اسيد آمينه‌هايي كه آبگريزي سطح تماس را زياد مي‌كنند و تاشدگي خاص CDR3 برسطح دو دومن متغير ديگر مي‌باشد.در نتيجه اين دو تغيير VHH علي رغم همراه نداشتن VL و تك رشته اي بودن حلاليت كافي و مناسب دارد كه اين يكي از مزاياي