

## ساخت، غربالگری و انتخاب نانوبادی‌های ویژه، علیه اپی توپ القا کننده آپوپتوز در دومن DR5-NTR با استفاده از تکنیک نمایش فاژی

شیرین جلیلی<sup>1</sup>، صادق حسن نیا<sup>2\*</sup>، سیده شیرین شاهنگیان<sup>3</sup>، محمد محمدی<sup>4</sup>، سید شهریار عرب<sup>5</sup>،  
رضا حسن ساجدی<sup>2</sup>، خسرو خواجه<sup>6</sup>، منوچهر میرشاهی<sup>2</sup>

- 1- دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 2- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 3- دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
- 4- استادیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
- 5- استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 6- استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

\* تهران، صندوق پستی 175-14115

hasannia@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: 93/4/22 پذیرش مقاله: 93/5/5)

**چکیده-** یکی از امید بخش‌ترین روش‌های درمان سرطان، القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است. به همین منظور، چندین آگونیست علیه گیرنده مرگ 5 (DR5) تولید شده است، که در مرحله ارزیابی بالینی قرار دارند. اساساً با فعال شدن DR5 در سلول‌های سرطانی القای آپوپتوز در مسیرهای داخلی و خارجی آغاز می‌شود. این گیرنده در بخش خارج سلولی خود دارای چندین دومن عملکردی است که در بین آنها دومن‌های غنی از سیستمین (CRDs) نقش کلیدی در القای آپوپتوز با واسطه اتصال به TRAIL دارند. به تازگی مشخص شده که اتصال آنتی‌بادهای منوکلونال آگونیست به دومن دیگری از ناحیه N-ترمینال DR5 نیز می‌تواند آپوپتوز را القا کند. دومن‌های متغییر مشتق شده از زنجیره سنگین آنتی‌بادی‌های شتری به نام VHH‌ها یا نانوبادی‌ها، کوچکترین قطعات مقاوم و کارآمدی‌اند که قادرند به آنتی‌ژن‌ها متصل شوند. این ویژگی منحصر به فرد VHH‌ها، باعث شده که آنها کاندیداهای مناسبی برای تشخیص و درمان محسوب شوند.

در این تحقیق با استفاده از تکنیک نمایش فاژی و ایمن کردن شتر با پپتید حاوی بخش اپی‌توپی (ITQQDLAPQQRA121)، کتابخانه ژنی حاوی VHH شتری ساخته شد. با غربالگری این کتابخانه فاژی، در طی مراحل غنی‌سازی جداسازی سه متصل شونده با تمایل بالا به این اپی‌توپ واقع در ناحیه NTR انجام شد. با در نظر گرفتن نقش کلیدی این اپی‌توپ در القای آپوپتوز، متصل شونده‌های انتخاب شده، می‌توانند کاندیداهای مناسبی برای راه‌اندازی آپوپتوز در سلول‌های سرطانی متفاوت باشند.

**کلیدواژگان:** نمایش فاژی، گیرنده مرگ 5، نانوبادی، آپوپتوز.

**1- مقدمه**

آپوپتوز یکی از اهداف مهم در درمان سرطان است. از این رو روش‌های درمانی که بتوانند مانع تکثیر سلول‌های سرطانی شوند و آپوپتوز را در این سلول‌ها القا کنند، بسیار مورد توجه است. در سال‌های اخیر برای توسعه روش‌های درمانی مبتنی بر القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطانی، تلاش‌های زیادی صورت گرفته است. متأسفانه به کار بردن این روش‌ها برای رسیدن به نتایج مطلوب درمانی با محدودیت‌هایی همراه بوده است. به تازگی استفاده از عوامل بیولوژیکی نتایج بالینی امیدوارکننده‌ای را همراه داشته است. در این رابطه عوامل بیولوژیکی که بتوانند بدون تأثیر روی سلول‌های سالم، باعث آپوپتوز در سلول‌های بدخیم شوند از اولویت درمانی برخوردارند. پروتئین TRAIL (لیگاند القا کننده آپوپتوز مرتبط با TNF) و گیرنده‌های مربوط به آن از جمله این عواملند که از خانواده بزرگ TNF به حساب می‌آیند [1].

پروتئین TRAIL (که با عنوان Apo2L نیز نامیده می‌شود) یک پروتئین گذرنده از غشا با وزن مولکولی 32 kD است که در طیف وسیعی از سلول‌های بافت نرمال جنینی و بزرگسالان بیان می‌شود. این پروتئین قادر است مرگ سلولی را در سلول‌های ترانسفورم شده و سلول‌های سرطانی القا کند، در حالی که این توانایی را در سلول‌های نرمال ندارد. TRAIL، آپوپتوز را از طریق تعامل با دو گیرنده سطح سلول DR4 (TRAIL-R1) و DR5 (TRAIL-R2) القا می‌کند. این پروتئین همچنین با سه گیرنده TRAIL-R3 (DcR1)، TRAIL-R4 (DcR2) و اوستئوپروتگرین<sup>1</sup> در ارتباط است. بخش سیتوپلاسمی 4DR و 5DR یک دومن داخل سلولی به نام دومن مرگ دارند، که برای شروع سیگنال‌های آبشاری داخل سلولی آپوپتوز ضروری است و منجر به مرگ سلول می‌شود [2-5].

سه گیرنده دیگر TRAIL که گیرنده‌های طعمه<sup>2</sup> نامیده می‌شوند، به علت نداشتن دومن مرگ، توانایی انتقال سیگنال‌های آپوپتوز را ندارند. تصور می‌شود این گیرنده‌ها به عنوان مهارکننده‌های دو گیرنده DR5 و DR4 در سلول‌های سالم عمل کنند. این گیرنده‌ها در سلول‌های نرمال برای اتصال با TRAIL رقابت می‌کنند و با ممانعت از اتصال TRAIL به DR4 و DR5 باعث حفاظت سلول‌های سالم در برابر مکانیسم القای مرگ سلولی TRAIL می‌شوند [3,4,6]. با این توضیح، پروتئین TRAIL و گیرنده‌های آن گزینه‌ای مناسب برای درمان سرطانند، زیرا می‌توانند از طریق مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوز، باعث مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی شوند، در حالی که در سلول‌های نرمال توانایی انجام این کار را ندارند.

آنتی‌بادی‌های منوکلونال با ویژگی آگونیستی علیه DR4 و DR5، نتایج رضایت‌بخشی در القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی داشته و از پتانسیل درمانی مناسبی بهره‌مندند. برای این منظور، تعدادی آنتی‌بادی آگونیست موشی علیه DR4 و DR5 گزارش شده که قادر به القای آپوپتوزند [7-9]. مشخص شده که بسیاری از این آنتی‌بادی‌ها برای نشستن بر روی گیرنده DR5 با TRAIL برای جایگاه اتصال با هم رقابت می‌کنند [10,11] و مکانیسم القای آپوپتوز را به جای TRAIL تقلید می‌کنند [12]. با در نظر گرفتن این موارد، تولید آنتی‌بادی‌هایی که با TRAIL از نظر عملکرد، هم‌افزا<sup>3</sup> بوده و هم‌زمان با TRAIL بتواند بدون ممانعت از اتصال TRAIL به گیرنده DR5 باعث القای آپوپتوز شود، اهمیت زیادی دارند.

تغییر در کانفورماسیون DR5 باعث انتقال سیگنال‌های متفاوتی از این رسپتور می‌شود. این تغییرات کانفورماسیونی می‌تواند از طریق اتصال فاکتورهای متفاوتی در DR5 القا شود. در برهم‌کنش‌های لیگاند-

1. Osteoprotegerin

2. Decoy Receptor

3. Synergize

اما مطالعات اخیر نشان می‌دهد، NTR می‌تواند فعال شدن DR5 (که منجر به انتقال سیگنال‌های آپوپتوزی می‌شود) را از طریق آنتی‌بادی‌های منوکلونال آگونیست وساطت کند. یک اپی‌توپ جدید در ناحیه NTR گیرنده DR5 از طریق روش Peptide Array شناسایی شده است. آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه این ناحیه، بدون رقابت با TRAIL، تمایل خوبی به DR5 داشته و باعث فعال شدن کاسپازها و در نهایت آپوپتوز می‌شوند [۱۲،۱۶]. این نتایج نشان می‌دهد که ناحیه NTR گیرنده DR5 می‌تواند به عنوان یک ناحیه عملکردی مستقل از جایگاه‌های اتصال TRAIL برای القای آپوپتوز عمل کند. از این رو آنتی‌بادی‌هایی که علیه این ناحیه تولید می‌شوند، می‌توانند به‌عنوان یک فاکتور هم‌افزا با TRAIL عمل کنند.

با وجود موفقیت‌های به‌دست آمده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال هیبریدوما در سال‌های اخیر، روش‌های جدیدی مانند نمایش فاژی و نمایش ریبوزومی ابداع شده‌اند که می‌توانند آنتی‌ژن‌های کوچک با تمایل اتصال بالا را خیلی سریع شناسایی کنند [17]. روش‌های نمایش فاژی و نمایش ریبوزومی به دلیل توانایی منحصر به فردشان در بروز هم‌زمان فنوتیپ و ژنوتیپ، پتانسیل بالایی در انتخاب تعداد زیادی از آنتی‌بادی‌های مختلف علیه یک آنتی‌ژن دارند، که منجر به جداسازی اتصال شونده‌های<sup>2</sup> مختلفی با پایداری و تمایل بالا می‌شوند [18،19].

آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی اگرچه ابزار مهمی در تشخیص و درمان بیماری‌های انسانی‌اند، اما کاربرد آنها محدودیت‌هایی از قبیل نیاز به سیستم بیان یوکاریوتی برای تولید انبوه، وزن ملکولی بالا و از همه مهمتر حساسیت‌زایی در کاربردهای درمانی را دارد. اگرچه برای رفع این مشکلات راه‌کارهای متفاوتی از جمله انسانی کردن آنتی‌بادی موشی ارائه شده است، ولی همچنان بر روی روش‌های جایگزینی از جمله استفاده از پپتیدهای

رسمپتور، تمایل اتصال و الگوی برهم‌کنش بسیار مهم است. لیگاند‌هایی که با DR5 با تمایلات متفاوتی برهم‌کنش دارند، می‌توانند یک سری از مسیرهای پیام‌رسانی مانند مسیرهای مشخص آپوپتوز و یا سایر مرگ‌های برنامه‌ریزی شده سلولی را آغاز کنند. هر کدام از این مسیرها، بر اساس کانفورماسیونی است که از طریق لیگاند‌های متصل شونده به DR5 القا شده است. این تفاوت در انواع کانفورمیشن‌ها بستگی به تمایل اتصال لیگاند‌های مورد نظر به DR5 دارد. TRAIL و آنتی‌بادی‌های منوکلونال آگونیستی که تمایل بالایی به DR5 دارند، می‌توانند در سلول‌های سرطانی که به TRAIL حساس‌اند، از طریق آپوپتوز باعث مرگ سلولی در این سلول‌ها شوند [8]. در سایر موارد بسته به نوع سلول و محرک‌های خارجی، TRAIL و آنتی‌بادی‌های منوکلونالی که تمایل کمتری به DR5 دارند، می‌توانند مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی دیگری مانند اتوفازی<sup>1</sup> را القا کنند [۱۳،۱۴].

بررسی کمپلکس TRAIL-DR5 نشان می‌دهد که DR5 دو بخش کاملاً مشخص در برهم‌کنش با TRAIL دارد. بخش اول، یک موتیف حفاظت شده هیدروفوب و بخش دوم دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است که خصوصیات انتخاب‌پذیری و اختصاصی بودن رسمپتور برای لیگاند را مشخص می‌کند. این دو لوپ رسمپتور، بیشترین ناحیه درگیر در برهم‌کنش با لیگاند را شامل می‌شود. این نواحی عبارت‌اند از: لوپ 50s شامل رزیدوهای 51-65 و لوپ 90s که دربرگیرنده رزیدوهای 91-104 است [15]. در لوپ خارج سلولی 50s چندین دومن عملکردی غنی از اسیدهای آمینه سیستین (CRDs) وجود دارد. این دومن‌ها عملکرد حفاظت شده‌ای را در القای آپوپتوز ایفا می‌کنند. گرچه نقش منطقی N ترمینال (دربرگیرنده N1-cap) به طور کامل مشخص نشده است،

مشتق از آنتی‌بادی‌ها تحقیقات بسیار زیادی انجام می‌شود. یکی از این پپتیدها، قطعه متغیر آنتی‌بادی شتری است که به آن VHH اطلاق می‌شود.

سرم انواع شتر یک کوهانه و لاما حاوی نوع منحصر به فردی از آنتی‌بادی‌های بدون رشته سبک است. همچنین رشته سنگین این آنتی‌بادی‌های شتری که به آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین (HCAb) معروف شده است، نسبت به همتای خود در آنتی‌بادی‌های معمولی به علت غیاب اولین دومن CHI وزن کمتری دارد [20,21]. آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین فقط از طریق تک دومن VH شان (که برای تمایز از VH معمولی VHH گفته می‌شود) به آنتی‌ژن وصل می‌شوند. به این ترتیب تک دومن VHH کوچکترین قطعه آنتی‌بادی تولیدی است که توانایی اتصال به آنتی‌ژن را دارد. قطعه کامل VHH وزنی در حدود 12 تا 15 کیلو دالتون دارد و از یک ایمونوگلوبولین تک‌زنجیره با قدرت اتصال مشتق شده است. VHH این شانس را فراهم آورده است که دسته جدیدی از آنتی‌بادی‌های درمانی با کوچکترین اندازه تهیه شوند [22-27]. این در حالی است که بعضی از ویژگی‌های دیگر VHH نسبت به آنتی‌بادی‌های معمولی منحصر به فرد است. مقایسه سکانس VH انسانی و VHH شتری درجه خیلی بالایی از همولوژی را نشان می‌دهد. انسانی کردن آنتی‌بادی‌های شتری VHH در مقایسه با انواع موشی به علت کوچکتر بودن و همولوژی زیاد با VH انسانی، بسیار ساده‌تر و کاراتر است [28,30]. با توجه به ساختار VHH می‌توان پیشگویی کرد که اغلب جایگزینی‌ها با سکانس انسانی بجز در موارد اسیدهای آمینه کلیدی شتری در (Phe/Tyr-42, Glu-49, Arg/Cys-50, Gly-52), FR2 بدون تغییر در عملکرد و خواص VHH قابل اجرا است. پس VHH یک کاندیدای خوب برای انسانی کردن به‌وسیله تغییرات سطحی است [31].

از این‌رو هدف این مطالعه، تولید نانوبادی‌های شتری

(VHH) از طریق روش نمایش فاژی علیه اپی‌توپ ناحیه NTR رسپتور DR5 بود.

## 2- مواد و روش‌ها

### 1-2- تهیه آنتی‌ژن پپتیدی متصل به BSA

اپی‌توپ پپتیدی ناحیه DR5-NTR، بعد از سنتز قطعه پپتیدی با توالی ITQQDLAPQQRA121 در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک با BSA کانژوگه شد، و به عنوان آنتی‌ژن در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

### 2-2- ایمن‌سازی شتر با پپتید

پپتید کانژوگه شده به BSA در هفت نوبت به صورت عضلانی و زیر جلدی به شتر هر دو هفته یک بار با غلظت 1mg/ml تزریق شد. قبل از شروع ایمن کردن شتر، خون حیوان به عنوان کنترل گرفته شد. در تزریق اول، ایمونوژن مورد نظر با حجمی برابر با ادجوانت فروند کامل به منظور ایجاد یک امولسیون یکنواخت مخلوط و در چند ناحیه مختلف عضلانی و زیر جلدی به شتر تزریق شد. در شش تزریق بعدی برای افزایش پاسخ ایمنی از ادجوانت فروند ناقص استفاده شد. از حیوان ایمن شده، هر دو هفته یک بار قبل از تزریق، خون‌گیری شد، تا روند ایمن شدن حیوان علیه آنتی‌ژن مورد نظر با تکنیک الایزا بررسی شود. به این صورت که در هر مرحله خون‌گیری رقت‌های مناسبی از سرم حیوان ایمن تهیه و به چاهک پلیت الایزای حاوی 100 میکرولیتر پپتید متصل به BSA با غلظت 10µg/ml اضافه شد. سپس به‌وسیله بافر بلاک‌کننده، بلاک و بعد از یک ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه و دوباره شستشو شد. میزان آنتی‌بادی تولید شده در هر مرحله از تزریق با استفاده از آنتی‌بادی خرگوشی علیه آنتی‌بادی شتری و آنتی‌بادی موشی علیه آنتی‌بادی خرگوشی متصل به HRP مورد سنجش قرار گرفت. بررسی نتایج الایزا نشان داد که 98

و خالص شد. پس از هضم آنزیمی قطعات ژنی VHH و وکتور فاژمیدی Pcomb3x حاوی جایگاه برشی SfiI، این قطعات به وکتور فاژمیدی Pcomb3x الحاق و محصولات حاصل از الحاق (فاژمیدهای نوترکیب) به باکتری مستعد TGI ترانسفرم شد.

فاژمیدهای نوترکیب ترانسفورم شده، جمع‌آوری و در محیط LB حاوی 70 درصد گلیسرول در 70- ذخیره شد.

#### 4-2- رهاسازی و تخلیص فاژ نوترکیب و تعیین تیتراژ

آن

فاژمیدهای نوترکیب حاصل از مرحله قبل در 20 میلی‌لیتر محیط SB که حاوی 100g/ml  $\mu$  آمپیسیلین بود تا رسیدن به جذب نوری 0/5-0/6 در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با دور همزن 250 RPM انکوبه شد. بعد از رسیدن به رشد مناسب، فاژمیدهای نوترکیب با فاژ کمکی M13K07 آلوده و به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد بصورت ساکن انکوبه شدند.

فاژمیدهای نوترکیب آلوده شده با فاژ کمکی به 250 میلی‌لیتر محیط SB حاوی 100g/ml  $\mu$  آمپیسیلین و 50g/ml  $\mu$  کانامایسین اضافه و در 37 درجه با دور RPM 250 به مدت یک شب انکوبه شد. سپس محیط کشت سانتریفیوژ (4000 RPM، 20 دقیقه) و محلول رویی بعد از یک شب انکوبه کردن با 20 درصد حجمی محلول PEG، 6000 و NaCl نیم‌مولار در 18000 g به مدت 30 دقیقه رسوب داده شد.

روز بعد از شروع اولین تزریق، پاسخ ایمنی مناسبی علیه آنتی‌ژن مورد نظر در حیوان داده شده است.

در هفته چهاردهم، 250 میلی‌لیتر خون از حیوان ایمن گرفته و لنفوسیت‌های آن به وسیله محلول فایکول جدا شد. لنفوسیت‌های جدا شده بعد از شستشو، سانتریفیوژ و در بافر فسفات استریل حل شد و بعد از شمارش در هر میکروتیوپ حدود  $5 \times 10^7$  سلول در 70- ذخیره شد.

#### 3-2- مراحل ساخت کتابخانه ژنی نانوبادی

برای تهیه کتابخانه ژنی، محتوای cDNA، از RNA توتالی که از لنفوسیت‌های حیوان ایمن شده استخراج شده بود، ساخته شد (جدول 1).

قطعات ژنی کد کننده دومن متغیر تا قسمت CH2 از cDNA با کمک پرایمرهای VHRev1-VHFor1 و VHRev2-VHFor2 تکثیر شد. این قطعات حاوی بخش‌های ژنی VHH و VH است. قطعات 600 جفت بازی که حاوی بخش VHH-CH2 بدون بخش CH1، از قطعات 900 جفت بازی که در بر گیرنده قطعه ژنی VH-CH1-CH2 (و موجود در تمامی آنتی‌بادی‌های معمول) است، در ژل آگارز رویت و جداسازی شد. از آنجا که تمامی VHH متعلق به یک خانواده ژنی شبیه به هم‌اند (خانواده سه) این بخش (VHH) به وسیله Nested PCR با کمک یک PCR دیگر با پرایمرهای VHHFor1 و VHHRev1 از قسمت FR1 تا FR4 تکثیر شد. سپس قطعات DNA 400 جفت بازی از ژل استخراج

جدول 1 پرایمرهای مورد استفاده در ساخت کتابخانه فاژی

نام پرایمرها	توالی	کاربرد
VHFor 1	5' GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG3'	Forward PCR1
VHRev 1	5' GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC3'	Reverse PCR1
VHFor 2	5' GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGRGGAGG3'	Forward PCR1
VHRev 2	5' CGCCATCAAGGTACCAGTTGA3'	Reverse PCR1
VHHFor 1	5' ACTGGCCAGCGGCCGAGTGCAGCTGSWWSAKTCK3'	Forward PCR2
VHHRev 1	5' ACTGGCCGGCCTGGCCTGAGGAGACGGTGACCGGGTC3'	Reverse PCR2

سانتی‌گراد انکوبه شد. محلول رویی تخلیه و چاهک، ده تا پانزده دفعه با بافر TBST، شستشو داده شد. سپس 100 میکرولیتر بافر گلايسين-HCl با pH حدود 2/2 به منظور رهایی فازهای متصل شده به آنتی‌ژن به چاهک اضافه و در دمای محیط به مدت 10 دقیقه انکوبه شد. سپس محتویات چاهک که شامل فازهای رها شده است به وسیله بافر 10 میکرولیتر تریس با pH حدود 9 خنثی شد. مشابه مراحل ذکر شده در بالا، به‌طور متوالی پنج بار مرحله غنی‌سازی تکرار شد. تنها مورد متغیر، تعداد شستشوی فازهای نوترکیب از روی آنتی‌ژن و افزایش مولاریته بافر شستشو دهنده در هر مرحله غنی‌سازی است، به این ترتیب که غلظت توئین<sup>1</sup> در هر مرحله غنی‌سازی نسبت به مرحله قبل دو برابر و تعداد شستشوها در هر مرحله غنی‌سازی افزایش یافت. پس از هر مرحله غنی‌سازی، تیتراژهای حاصل در بافر شستشو دهنده (ورودی) و بافر جدا کننده (خروجی) تعیین و نسبت عددهای به دست آمده برای تعیین میزان پیشرفت غنی‌سازی محاسبه شد. بعد از دور چهارم غنی‌سازی، کتابخانه دارای تیتراژ مناسبی شد. از پلیت‌های واجد حداکثر، صد تا صد و پنجاه کلونی، به‌طور تصادفی چند کلون برای تعیین توالی و مراحل بعدی کار انتخاب شدند.

## 6- جداسازی فازهای مناسب<sup>2</sup>

برای انتخاب و جداسازی فازهایی با بیشترین تمایل به آنتی‌ژن مورد نظر، 18 کلونی از مرحله چهارم غنی‌سازی انتخاب و هر کلون به منظور دستیابی به یک منوکلونال فاژی به‌طور جداگانه مورد تکثیر قرار گرفت. بعد از تکثیر و غنی‌سازی فازهای منوکلونال مورد نظر از طریق روش "منوکلونال فاژ الایزا" بهترین کلون‌ها انتخاب شدند. به این ترتیب که چاهک‌های الایزا با 100 میکرولیتر از

فازهای نوترکیبی که به این طریق جدا شده بود، در 700 میکرولیتر محلول استریل TBST حل و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد برای مراحل بعدی (غنی‌سازی) نگه‌داری شد.

## غنی‌سازی کتابخانه فاژی علیه اپی‌توپ پپتیدی

مرحله غنی‌سازی یکی از مهمترین مراحل تولید آنتی‌بادی با استفاده از فناوری نمایش فاژی است. به علت خاصیت عملکردی قطعات آنتی‌بادی روی سطح فاژ، می‌توان با استفاده از خاصیت اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن، فازهای اختصاصی را انتخاب کرد. سپس بعد از تکرار متعدد این مرحله با استفاده از مقادیر کاهش یافته آنتی‌ژن و یا با استفاده از بافر جدا کننده با افزایش مولاریته و نیز تکرار مراحل شستشو می‌توان آنتی‌بادی‌هایی با میل پیوندی بالاتر به دست آورد.

## 5- مراحل غنی‌سازی با استفاده از پپتید تثبیت

### شده بر سطوح چاهک پلیت الایزا

100 میکرو لیتر محلول 10g/ml $\mu$  آنتی‌ژن (پپتید متصل به BSA) و BSA به دو چاهک به صورت جداگانه اضافه و به مدت یک شب در 4 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. چاهک حاوی BSA تخلیه و بعد از سه مرحله شستشو، 300 میکرولیتر بافر بلاک کننده TBS حاوی نیم درصد BSA به آن اضافه و یک ساعت در حرارت 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بافر بلاک کننده تخلیه و سه بار با بافر TBST شستشو داده شد. به هر چاهک بلاک شده BSA، 100 میکرولیتر از کتابخانه فاژی محلول در TBST (حاوی حدود  $10^{11} \times 1/5$  ذره‌ی فاژی) اضافه شد و به مدت دو ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محلول فاژی از چاهک حاوی BSA بعد از گذشت زمان انکوباسیون، خارج و به چاهک حاوی پپتید متصل به BSA که مانند چاهک حاوی BSA شستشو و بلاک شده بود، اضافه و به مدت سه ساعت در حرارت 37 درجه

1. Tween  
2. Screening

### 3- نتایج

#### 3-1- بررسی روند ایمنی‌زایی در شتر

برای نمونه کنترل، از حیوان غیر ایمن حدود 100 میکرولیتر خون گرفته شد. سپس هفت تزریق از محلول آنتی‌ژنی پپتید متصل به BSA در فواصل زمانی مشخص به شتر انجام شد. خون حیوان ایمن شده قبل از هر تزریق گرفته می‌شد. پی‌گیری پاسخ ایمنی سرم شتر با بررسی سرم کامل به روش الیزا علیه پپتید متصل به BSA صورت گرفت. به این ترتیب در هر مرحله از خون‌گیری، یک سری رقت از سرم کامل حیوان ایمن تهیه و به پلیت الیزای که با پتید متصل به BSA پوشانده شده بود اضافه می‌شد. بعد از انجام مراحل الیزا، جذب نوری رقت‌های مختلف سرم در 450 نانومتر خوانده شد. نمودار پاسخ ایمنی (شکل 1) نشان می‌دهد بعد از حدود 98 روز از اولین تزریق تیتر خوبی از آنتی‌بادی علیه پپتید متصل به BSA در شتر ایجاد شده است. به طوری که آنتی‌بادی‌های موجود در رقت‌های 1/32000 از سرم علیه پپتید متصل به BSA واکنش‌پذیری بالایی از خود نشان می‌دهند.

#### 3-2- ساخت کتابخانه VHH از شتر ایمن شده با پپتید

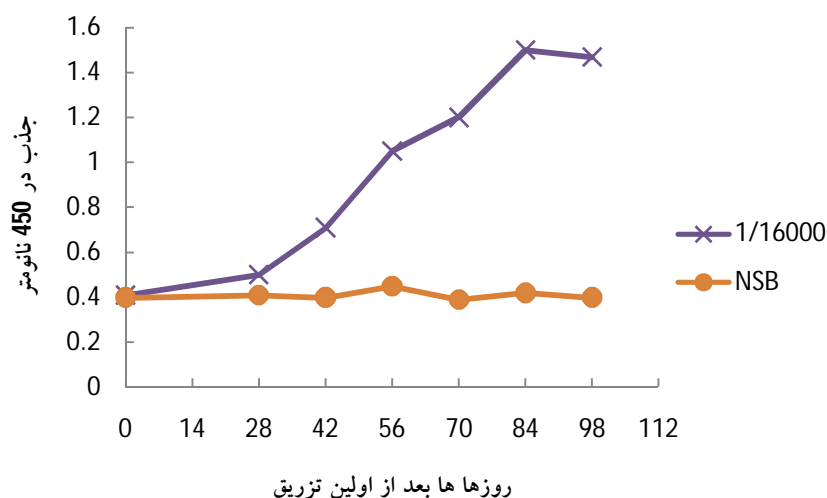
##### متصل به BSA

تخلیص لئوسیت به وسیله شیب غلظت فایکول انجام شد. پس از استخراج RNA و تعیین غلظت آن، cDNA توسط کیت ساخت cDNA شرکت فرمنتاز ساخته شد. برای تکثیر ژن، نانوبادی‌ها (VHH) از Nested PCR استفاده شد. به این ترتیب از تکثیر ژن‌های دیگر و ایجاد باندهای غیر اختصاصی جلوگیری می‌شود. محصول PCR اول شامل سه باند است. باند اول قطعاتی با وزن ملکولی بین 800 تا 900 جفت باز، باند دوم قطعاتی با وزن ملکولی بین 700 تا 800 جفت باز و باند سوم وزن ملکولی 550 تا 600 جفت باز دارد.

محلول آنتی ژنی با غلظت 10g/ml با یک شبانه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای کنترل از محلول BSA استفاده شد. روز بعد پلیت با BSA سه درصد که در بافر TBS حل شده بود به مدت هشت ساعت در دمای اتاق بلاک شد. سپس همه چاهک‌ها، سه بار با بافر TBST شستشو و 100 میکرولیتر از منوفاژهای که در بافر TBST حل شده بودند (با تیتر  $1/5 \times 10^{11}$ ) به هر چاهک از پلیت اضافه و به مدت سه ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از پنج بار شستشو با بافر TBST به هر چاهک 100 میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال M13 که به نسبت 1:5000 با بافر TBS رقیق شده بود اضافه و به مدت یک ساعت دیگر در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از پنج بار شستشو با TBST، به هر چاهک 100 میکرولیتر آنتی‌بادی ضد خرگوشی متصل به HRP که در بافر TBS با نسبت 1:2000 رقیق شده بود اضافه و به مدت یک ساعت دیگر در دمای اتاق انکوبه شد.

برای مشاهده رنگ از TMB استفاده شد و بعد از اضافه کردن TMB به مدت ده دقیقه در تاریکی نگه‌داری شد. واکنش با 10 میکرولیتر محلول HCL دومولار متوقف و جذب نوری پلیت با کمک دستگاه الیزا ریدر در طول موج 405 خوانده شد. سپس ده کلون که جذب نوری بالایی داشتند (نسبت به کنترل جذب بالای 1/3) دوباره تکثیر و به وسیله PEG-NaCl رسوب داده شده و رسوب در محلول استریل حل شد. سپس از هر کلون پلازمید آن استخراج شد. میزان تمایل اتصال هر مونوفاژ تولید شده به آنتی‌ژن پپتیدی متصل به BSA به صورت جداگانه با روش منوفاژالیزا مورد بررسی قرار گرفت.

با استفاده از پرایمرهای VHHFor1 و VHHRev1 و پلازمید استخراج شده قطعات ژنی حاوی VHH تکثیر شدند. تعیین توالی پلازمیدها به وسیله شرکت پیشگام انجام شد. سپس توالی امینو اسیدی هر VHH با <http://web.expasy.org/translate> به دست آمد.



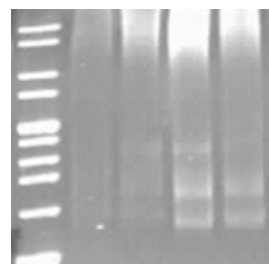
شکل 1 بررسی نمودار القا پاسخ ایمنی در شتر پس از هر بار تزریق

قطعات VHH و همچنین فاژمید pComb3x تخلیص شده از ژل، پس از تعیین غلظت، به وسیله آنزیم برشی Sfi1 مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. واکنش الحاق با اضافه کردن غلظت مناسب قطعه VHH به وکتور صورت گرفت. فاژمیدهای نوترکیب به روش الکتروپوریشن به باکتری TGI ترانسفرم شدند. پس از انتقال محصول، واکنش الحاق به باکتری TGI برای اطمینان از اتصال قطعات VHH به فاژمید از دو روش هضم آنزیمی و کلونی PCR استفاده شد. به دست آمدن قطعات با طول 400 جفت باز در این دو روش بیانگر اتصال موفقیت آمیز قطعات VHH به فاژمید بود. همان گونه که در شکل های 4 و 5 نشان داده شده، وجود قطعات 400 جفت باز در واکنش هضم آنزیمی و کلونی PCR بیانگر اتصال قطعات است.

### 3-3- ارزیابی پیشرفت مراحل غنی سازی با الایزا

یکی از روش های ارزیابی پیشرفت غنی سازی، انجام الایزا بر روی محلول پلی کلونال فاژی به دست آمده در مراحل غنی سازی است.

قطعات بین 700 تا 550 جفت باز مجموعه آنتی بادی های زنجیره سنگین اند که پس از جداسازی و تخلیص از ژل به وسیله PCR دوم تکثیر می شوند. محصول PCR دوم قطعه ژنی با طول 400 جفت باز است و دارای توالی کد کننده بخش VHH آنتی بادی های شتری است. شکل های 2 و 3 نشان دهنده نتایج واکنش زنجیره ای پلیمر از اول و دوم است.



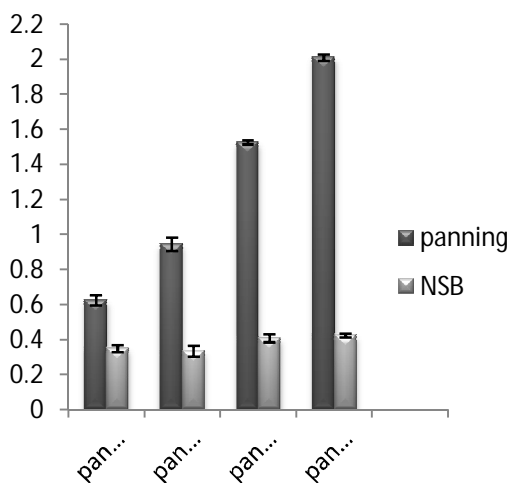
شکل 2 بررسی محصول PCR اول بر روی ژل PAGE شش درصد، ستون 1 استاندارد وزن ملکولی DNA، ستون 3-4 و 5، محصول PCR اول، سه باند با وزن ملکولی 600-550 و 800-700 جفت باز به وضوح مشخص است.

شکل 3 بررسی محصول PCR دوم بر روی ژل آگارز یک و نیم درصد. ستون 1 استاندارد وزن ملکولی DNA، ستون ۲،۳،۴،۵،۶ و 7 محصول PCR دوم که شامل قطعات ژنی VHH با وزن ملکولی 400 جفت باز است.



پلی کلونال حاصل از هر مرحله غنی سازی و با استفاده از پپتید متصل به BSA به عنوان آنتی ژن انجام شد. با توجه به اینکه بیشترین جذب نوری در غنی سازی چهارم به دست آمد (شکل 6) احتمال جداسازی نانو بادی هایی با تمایل و قدرت اتصال بیشتر به پپتید مورد نظر در کلون های حاصل از این غنی سازی بیشتر است.

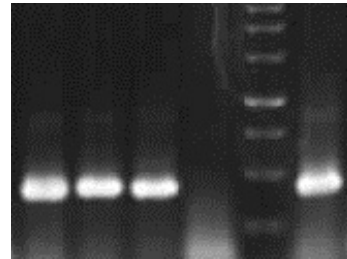
نتایج حاصل از کلونی PCR مرحله چهارم غنی سازی نیز تأییدی بر این انتخاب است (شکل 7).



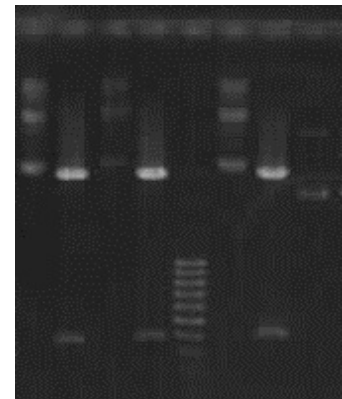
شکل 6 بررسی تمایل نانوبادی های جدا شده پس از هر مرحله غنی سازی. همان طور که در نمودار مشخص است مرحله چهارم غنی سازی بیشترین جذب نوری را دارد.

#### 4- انتخاب کلون های مناسب، حاوی نانوبادی هایی با بیشترین تمایل و قدرت اتصال

به منظور به دست آوردن نانوبادی هایی با بیشترین تمایل، به پپتید مورد نظر به طور تصادفی 18 کلون از مرحله چهارم غنی سازی انتخاب و تکثیر شد. با استفاده از فازهای تخلیص شده از تک کلون های مرحله چهارم غنی سازی، واکنش مونوفاژ الایزا انجام و کلون های دارای بیشترین جذب نوری انتخاب شدند. بر همین اساس، 11 کلونی که جذب نوری بالاتری داشتند انتخاب شدند (شکل 8).

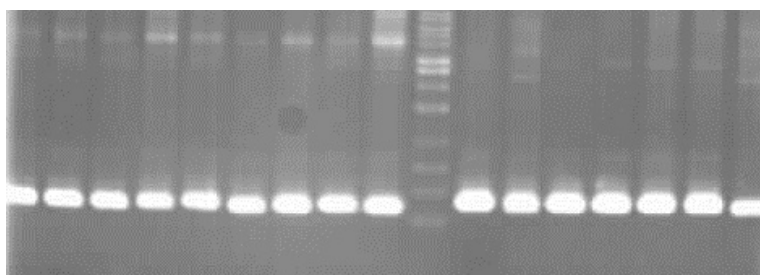


شکل 4 کلونی PCR مربوط به کلون شدن قطعات VHH (400 جفت بازی) در وکتور pComb3x. ستون 5 استاندارد وزن ملکولی DNA، ستون ۳، ۲، ۱ و 6 فازمیدهایی می باشند که VHH در آن کلون شده است. ستون 4 فازمید فاقد VHH کلون شده است.

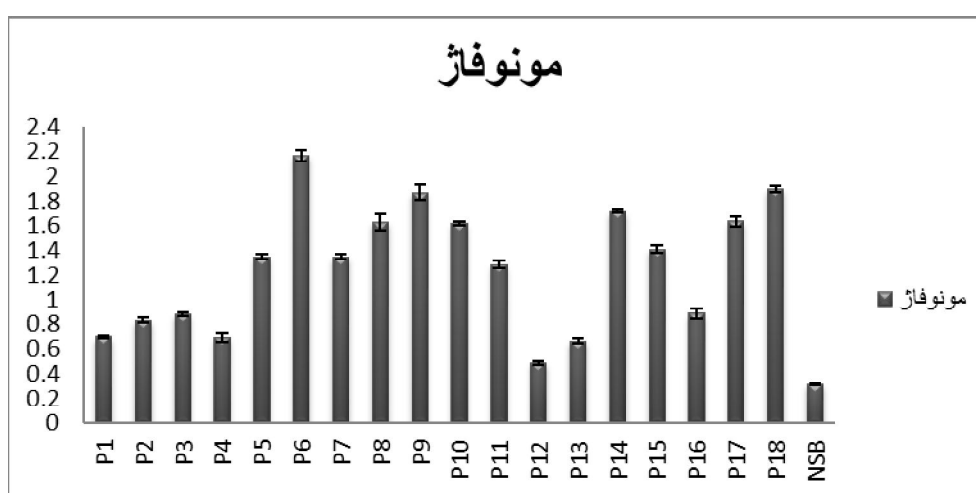


شکل 5 تأیید اتصال قطعات VHH به فازمید pComb3x، و هضم آنزیمی فازمیدهای نو ترکیب به وسیله آنزیم Sfi1 ستون 5 استاندارد وزن ملکولی، ستون ۴، ۲، ۱ و 7 نتیجه هضم آنزیمی فازمیدهای نو ترکیب است، جداسازی یک قطعه 400 جفت بازی از آنها تأیید کننده کلون شدن قطعات VHH در وکتور pComb3x است، ستون ۳، ۱ و 6 فازمیدهای نو ترکیب هضم نشده می باشد.

اگر مراحل غنی سازی به درستی انجام شود، باید جذب نوری به دست آمده در واکنش الایزا به صورت افزایشی باشد. در این تحقیق ابتدا بر روی محلول پلیکلونال فاژی به دست آمده بعد از هر مرحله غنی سازی، آزمایش الایزا با استفاده از پپتید متصل به BSA انجام شد. با سخت تر کردن شرایط شستشو با پیشرفت مراحل غنی سازی، فازهای دارای قدرت اتصال بیشتر پس از هر مرحله، جداسازی و تکثیر می شدند. آزمون الایزا بر روی فازهای



شکل 7 نتایج حاصل از کلونی PCR مرحله چهارم غنی سازی که تأیید می کند کلون هایی که از این مرحله غنی سازی انتخاب شده اند همگی واجد قطعه 400 جفت بازی اند (VHH). ستون 10 استاندارد وزن ملکولی، ستون های 9 تا 11 و 17 کلونی های مثبت واجد قطعه 400 جفت بازی را نشان می دهد.



شکل 8 جذب نوری کلون های انتخاب شده از مرحله چهارم غنی سازی در مونو فاز الیزا. فازها از کلون های مجزا تخلیص شده و تمایل آنها به پیتید مورد نظر با الیزا مورد بررسی قرار گرفت. از بین 18 کلون مورد آزمایش 11 کلون که نسبت به کنترل دارای جذب مناسبی بودند انتخاب شدند.

شروع آپوپتوز یا بازگشت آپوپتوز از طریق فعال سازی مسیر خارجی و داخلی آپوپتوز می شوند به عنوان یک راه کار درمانی مناسب محسوب می شوند. از جمله این موارد می توان به آنتی بادی های آگونیست علیه DR5 اشاره کرد که پتانسیل درمانی مناسبی دارند. DR4 و DR5 قادر به انتقال سیگنال های آپوپتوزند. فعال سازی DR4 و یا DR5 در سرطان های مختلف باعث مرگ سلولی از طریق فعال سازی مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز می شود.

عواملی مانند TRAIL که سبب فعال سازی DR4 و یا DR5 می باشند، توجه زیادی را به عنوان پتانسیل های درمانی ضد سرطان به خود جلب کرده اند؛

پس از استخراج فازمید کلون های انتخاب شده، تعیین توالی شدند. نتایج تعیین توالی نشان دهنده سه نوع توالی کلونی متفاوت علیه پیتید مورد نظر بود. سپس قطعه ژنی VHH سکانس شده به وسیله پایگاه <http://web.expasy.org/translate> به توالی آمینواسیدی ترجمه شد (شکل 9).

#### 4- بحث

اختلال در آپوپتوز، یک نقش کلیدی در پاتوژنز و پیشرفت سرطان بازی می کند. بررسی ترکیباتی که باعث

3p MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA QVQLQQSGGGSVQAGGSLRLACAASAS GYTESVKWWMG W 60  
 2P MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA QVQLQESGGDSVQAGGSLRLACAASAS GYTESVKWWMG W 60  
 1P MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA QVQLQESGGDSVQAGGSLRLACXASAS GYSVCGWVG W 60  
 \*\*\*\*\* \*\*.\*.\*\*\*.\*\*\*\*\* \*\*.\*.\*\*\*.\*\*\*.\*

3p FRQAPGQEREGVA VISIPGGSTYYDDDDVKG RFTISQDNAKNTVYPQMNSLKPEDTAMYYC 120  
 2P FRQAPGQEREGVA VISIPGGSTYYDDDDVKG RFTISQDNAKNTVYPQMNSLKPEDTAMYYC 120  
 1P FRPAPGRERGGVA VVSVPGGGSFFGGDVGG RFSLSPDHAQNTVYPQMNSLKPEDTAMYYC 120  
 \*\*\*\*\* \*\*.\*.\*\*\*.\*\*\*.\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*

3p AA RNAGGRFRPSAAGGYNY WGQGTQVTVSSHHHHHH 156  
 2P AA RNAGGRFRAWAGGGDNY WGQGTQVTVSSHHHHHH 156  
 1P AA RNAGGRFRPSANGGYNY WGQGTQVTVSSHHHHHH 156  
 \*\*\*\*\* \*\*.\*.\*\*\*.\*\*\*.\*

### شکل 9 توالی امینواسیدی سه نانوبادی منتخب (CDR3-FR3-CDR2-FR2-CDR1-FR1)

اسیدهای 62-90 و 99-105 می‌باشد که همپوشانی زیادی با جایگاه اتصال TRAIL دارد. از این‌رو اگر بتوان آنتی‌بادی داشت که جایگاه اتصال آن مستقل از اتصال TRAIL باشد، به علت احتمال اثر هم‌افزایی که با TRAIL می‌تواند داشته باشند، در القای آپوپتوز مؤثرتر خواهد بود. از این‌رو شناسایی اپی‌توپی جدید، با روش Peptide Array در ناحیه NTR گیرنده DR5 به وسیله yabin Guo و همکارانش، نگارندگان را بر این داشت که نانوبادی‌هایی علیه این اپی‌توپ تولید کنند. اپی‌توپی که به‌وسیله این آنتی‌بادی‌ها شناسایی می‌شوند، مستقل از جایگاه اتصال TRAIL است و رقابتی با TRAIL برای اتصال به DR5 ندارند. این نکته بیانگر این مطلب است که بخش‌های دیگری مستقل از جایگاه اتصال TRAIL در مولکول DR5 وجود دارد که می‌تواند در تعامل با ترکیبات آگونیستی سیگنال‌های مرگ برنامه‌ریزی سلولی را آغاز کند.

اتصال TRAIL و سایر ترکیبات آگونیست به DR باعث شروع مسیر آپوپتوز از طریق کاسپاز می‌شود. این مسیر را برای مشخص شدن پاسخ دهی به سیگنال‌های خارج سلولی گاهی اوقات مسیر خارجی می‌گویند که با بکارگیری کاسپاز 8 شروع کننده و کاسپاز 10 از طریق آداپتور FADD برای تولید کمپلکس القا کننده پیام مرگ (DISC) شروع می‌شود. کاسپازهای شروع کننده بعد از

اما در سال‌های اخیر سمیتی که به وسیله TRAIL برای سلول‌های کبدی انسان مشاهده شده، استفاده از آن را برای درمان سرطان محدود کرده است. از طرف دیگر با در نظر گرفتن این نکته که TRAIL، به عنوان یک سیتوکین با پنج گیرنده، در داخل بدن نقش‌های بسیار وسیعی را ایفا می‌کند و بسیاری از آنها هنوز شناخته نشده‌اند، لذا سایر ترکیبات آگونیست دیگر همانند آنتی‌بادی‌های منوکلونال علیه DR4 و DR5 به دلیل توانایی‌های بالقوه شان در مرگ سلولی سلول‌های سرطانی، همچنین داشتن مکانیزم عمل ساده‌تر که DR4 و DR5 نسبت به TRAIL دارند، می‌توانند کاندیدهای مناسبتری به عنوان عوامل درمانی جایگزین TRAIL نو ترکیب محسوب شوند. بر همین اساس چندین آنتی‌بادی منوکلونال انسانی یا انسانی شده علیه DR5 تولید شده است. از جمله این آنتی‌بادی‌ها می‌توان به Conatumumab (AMG 655), Tigatuzumab (CS1008), Lexatumumab (HGS-ETR2) و Apomab اشاره کرد. این آنتی‌بادی‌ها عملکرد مشخصی دارند و به تنهایی یا همراه با ترکیبات شیمی درمانی یا سایر ترکیبات دیگر استفاده می‌شوند. جایگاه اپی‌توپی که این آنتی‌بادی‌ها برای نشستن و فعال کردن DR5 اشغال می‌کنند تا حدی زیادی با جایگاه اتصال TRAIL همپوشانی دارد.

به‌طور مثال جایگاه اتصال Apomab روی DR5، آمینو

فعال شدن، کاسپازهای 3، 6 و 7 پایین دست مسیر را فعال می‌کنند [۳۲،۳۳]. در برخی سلول‌ها که نوع 1 نامیده می‌شوند مسیر خارجی شروع شده به وسیله DRها به تنهایی می‌تواند سیگنال‌های قوی برای شروع آپوپتوز را ایجاد کنند. اما در بیشتر سلول‌ها که نوع 2 نامیده می‌شوند سیگنال‌های ایجاد شده به وسیله DR احتیاج به یک مسیر اضافی برای تحریک آپوپتوز دارند که به مسیر داخلی معروف است. این مسیر از طریق Bcl-2 میتوکندری با مسیر خارجی ارتباط دارد. به این ترتیب که کاسپاز 8 از مسیر خارجی، BH3 را که یک ترکیب پروآپوپتوز است لیز می‌کند تا Bid فعال را تولید کند. Bid آنتاگونیست عملکرد ترکیبات خانواده Bcl-2 است که یک pro-survival می‌باشد. Bid همچنین ایجاد یک سری حوادث را باعث می‌شود، از جمله آزادسازی فاکتورهای آپوپتوز موجود در میتوکندری را به حداکثر می‌رساند. این فاکتورها، فعال‌سازی کاسپاز 9 را سبب می‌شوند. این فاکتورها همچنین آنتاگونیست فعالیت مهارکننده‌های آپوپتوزند که باعث سرکوب فعالیت کاسپاز می‌شود.

P53 به عنوان یک فاکتور حیاتی برای تنظیم مسیر داخلی است که در پاسخ به گروه وسیعی از استرس‌های سلولی مثل آسیب‌های DNA و هیپوکسی باعث بیان ژن‌های Bax, Puma, Noxa, Apaf-1 می‌شود. این ژن‌ها مسئول پاسخ‌دهی مسیر داخلی محسوب می‌شوند. درجه اهمیت p53 از این حقیقت ناشی می‌شود که در بیش از نیمی از سرطان‌های انسانی، P53 غیر فعال است. این گروه از سرطان‌ها به روش‌های مرسوم شیمی درمانی مقاوم‌اند. علاوه بر این، DR5 که یک پاسخ دهنده P53 است، باعث ایجاد مکانیسم‌های متقابلی برای ایجاد ارتباط بین مسیر داخلی و خارجی می‌شود. در این رابطه، به چند علت آنتی‌بادی‌های آگونیست DR برای درمان ترجیح داده می‌شوند از جمله: اگرچه DR5 و DR4 بر روی گروه وسیعی از سلول‌های نرمال و سلول‌های توموری بیان

می‌شود اما TRAIL قادر است فقط DRهای بیان شده در سلول‌های سرطانی را فعال کند [35]. توانایی آگونیست‌های DR برای شروع آپوپتوز مستقل از P53 است [36]، به علت اینکه P53 در بیشتر سرطان‌های انسانی غیر فعال شده و آگونیست‌های DR توانایی این را دارند که آپوپتوز را در تومورهایی که مقاومت جزئی یا کلی به علت غیر فعال شدن P53 نسبت به شیمی درمانی کسب کرده‌اند را القا کنند [37]. از سوی دیگر به علت اینکه بین مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوز وابستگی وجود دارد، آگونیست‌های DR هنگامی که با ترکیبات مرسوم شیمی درمانی ترکیب شوند، فعالیت‌شان افزایش می‌یابد و می‌توانند به عنوان هدف‌های درمانی که آنتاگونیست مسیرهای رشد و زنده ماندن سلول‌اند ایفای نقش کنند. همچنین DRهایی که مسیر آپوپتوز را القا می‌کنند در Lipid rafts قرار گرفته‌اند و این یک مزیت برای این دسته از رسپتورها محسوب می‌شود. از این رو آنتی‌بادی‌های موشی که در این راستا تولید شده‌اند، توانسته‌اند در القای آپوپتوز نقش مؤثری ایفا کنند. با وجود موفقیت‌هایی که این آنتی‌بادی‌ها در درمان داشته‌اند، کاربرد آنها محدودیت‌هایی از قبیل نیاز به سیستم بیان یوکاریوتی برای تولید انبوه، وزن ملکولی بالا و از همه مهمتر حساسیت‌زایی در کاربردهای درمانی را به دنبال دارد. برای رفع این محدودیت‌ها روش‌های مختلفی ارائه شده است که یکی از این جایگزین‌های مطرح، پپتیدهای مشتق از آنتی‌بادی از جمله نانوبادی‌های شتری است. روش نمایش فاژی یکی از مناسبترین گزینه‌ها برای تولید نانوبادی‌ها است. فناوری نمایش فاژی از جمله روش‌های ارتباط دهنده همزمان پروتئین با توالی DNA کد کننده آن است که به وسیله ذرات فاژی انجام می‌شود. در این روش، DNA کد کننده پروتئین مورد نظر، این پروتئین را به ژن یکی از پروتئین‌های پوششی فاژ متصل می‌کند. پروتئین مورد نظر به صورت متصل با پروتئین‌های

پایداری کمی منجر می‌شود. از طرفی فقدان زنجیره سبک در آنتی‌بادی‌های زنجیره‌ای سنگین شتری که با حضور یک CDR3 بزرگتر در VHH نسبت به VH، جبران شده است، یک معماری جدیدی را برای میانکشی بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی ایجاد کرده است. یک لوپ مقعر بیرون زده بزرگ متصل شونده به آنتی‌ژن فقط در VHHها قابل مشاهده است. در حالی که لوپ متصل شونده به آنتی‌ژن در VH-VL به صورت یک حفره کوچک و یا یک سطح صاف است. همین ویژگی در VHH باعث انتخاب پذیری بیشتر نسبت به آنتی‌ژن‌های کوچک است. از سوی دیگر، نانوبادی‌هایی که در شتر ایمن تولید می‌شود، به‌طور طبیعی در داخل بدن حیوان دچار جهش و بالغ شدن می‌شوند و منجر به تولید نانوبادی‌های با خاصیت شناسایی و تمایل خیلی بالا نسبت به آنتی‌ژن مورد نظر می‌شود. زیرا سیستم ایمنی بدن شترسانان به‌طور معمول آنتی‌بادی‌های بالغ با تمایل خیلی بالا در حد نانومولار تولید می‌کنند [39,38].

علاوه بر این، ثابت شده است که فازهای حاوی قطعات نانوبادی به آسانی قادرند مقادیر زیادی از متصل شونده‌های مونومری را به صورت محلول تولید کنند. بر همین اساس بدون شک می‌توان به نانوبادی‌هایی با تمایل بالا علیه پپتید مورد نظر در طی مراحل غنی‌سازی دست یافت. نتایج حاصل از مونوفاژ الیزا علیه آنتی‌ژن پپتیدی مورد نظر دلالت بر تولید و انتخاب نانوبادی‌های قوی با قدرت اتصال بالا علیه آنتی‌ژن مورد نظر دارد.

بررسی سکانس VHHهای تولید شده با VH انسانی نشان می‌دهد، در FR2، این نانوبادی‌ها اسیدهای آمینه کلیدی VHH مشاهده می‌شود -Phe/Tyr-42, Glu-49, Arg/Cys- (50, Gly-52) [39,38]. همچنین پیوند دی سولفیدی که بین سیستم‌های موجود در CDR1 و CDR3 بیشتر VHHهای شتری وجود دارد [40]. در این نانوبادی‌ها نیز مشاهده می‌شود. تعداد آمینو اسیدهایی که در CDR3

پوششی بر سطح فاز بیان می‌شود. بنابراین، این تکنیک روشی بسیار مؤثر برای ایجاد مجموعه‌های نانوبادی با تنوع بالغ بر  $10^{10}$ ، گزینش مولکول‌هایی با عملکرد خاص، مطالعه میانکشی‌های نانوبادی-لیگاند، بهبود یا تغییر میل پیوندی بخش‌های اتصال نانوبادی و انتخاب ژن‌های کمیاب کد کننده نانوبادی‌ها با فعالیت اتصال است.

جدا سازی انواع مختلف HCAb از سرم شتر، در پاسخ به آنتی‌ژن پپتیدی مورد نظر نشان می‌دهد که با وجود کوچک بودن آنتی‌ژن، حیوان پاسخ ایمنی مناسبی به آنتی‌ژن تزریق شده داشته است. قطعات متصل شونده به آنتی‌ژن از آنتی‌بادی‌های زنجیره‌ای سنگین شتر، برای به دست آوردن آنتی‌بادی‌های با تمایل بالا نسبت به آنتی‌ژن‌های کوچک (هاپتن) بسیار مناسب‌اند. بنابراین، خون شتر ایمن، یک منبع خوب برای کلون کردن قطعات متصل (نانوبادی‌ها) به این گونه آنتی‌ژن‌های کوچک است، که به طیف گسترده‌ای از آنتی‌ژن‌های متفاوت واکنش نشان می‌دهند، بخصوص به آنتی‌ژن‌هایی که ایمنوژن‌تر باشند. به همین دلیل ژن مربوط به نانوبادی‌ها از لئوسیت‌های شتر تکثیر و از آن برای ساخت یک کتابخانه ایمن بزرگ از نانوبادی‌ها در وکتور Pcomb3x استفاده شد. با آلوده‌سازی این کتابخانه با فازهای کمکی 7M13K0، قطعات نانوبادی در اتصال با N ترمینال پروتیین سه (PIII)، در سطح ذرات فاز بیان شدند.

افزایش راندمان غنی‌سازی طی مراحل متفاوت غنی‌سازی دال بر جدا سازی نانوبادی‌های با اتصال بالا و ویژه نسبت به آنتی‌ژن مورد نظر است. نانوبادی‌هایی که از این طریق تولید می‌شوند نسبت به سایر قطعات منومری آنتی‌بادی‌ها مثل scFv که به صورت مصنوعی از اتصال قطعات VH و VL به وجود می‌آید، برتری‌های زیادی دارند. دلیل این موضوع آن است که این ویرایش و اتصال مصنوعی انجام شده در خصوص اتصال قطعات VH و VL برای تولید scFv، به تولید متصل شونده‌هایی با تمایل پایین و

- وجود دارد بین 7 تا 18 (به‌طور متوسط 13/5) آمینو اسید است. تعداد آمینو اسیدهای موجود در CDR3 نانوبادی‌های تولید شده، بزرگتر (16) از متوسط (13/5) طول CDR3ها است. موارد ذکر شده دلالت بر این دارد که نانوبادی‌های علیه اپی‌توپ پپتیدی مورد نظر، از لایه زاینده زنجیره سنگین آنتی‌بادی‌های شتری مشتق شده‌اند. با توجه به تنوع ژنی که در کتابخانه فاژی سنتز شده وجود داشت و نتایجی که در طی مراحل غنی‌سازی حاصل شده بود، جداسازی نانوبادی‌هایی با تمایل بالای اتصال به آنتی‌ژن پپتیدی واقع در ناحیه NTR گیرنده DR5، با موفقیت انجام شد. با توجه به نقشی که برای این جایگاه اتصال در DR5 ذکر شد، این نانوبادی‌ها می‌توانند کاندیداهای مناسبی برای بررسی القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی باشند.
- 5- منابع**
- [1] Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C.-P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. Davis-Smith, C. Rauch, C. A. Smith, and R. G. Goodwin. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673.
- [2] Pan, G., K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, and V. M. Dixit. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276: 111.
- [3] Pan, G., J. Ni, Y.-F. Wei, G.-I. Yu, R. Gentz, and V. M. Dixit. (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277:815.
- [4] Sheridan, J. P., S. A. Marsters, P. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, et al. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277:818.
- [5] Walczak, H., M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin, and C. T. Rauch. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16:5386.
- [6] Griffith, T. S., Rauch, C. T., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Lynch, D. H., Smith, C. A., Goodwin, R. G., and Kubin, M. Z. (1999). Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 162, 2597–2605.
- [7] Chuntharapai, A., Dodge, K., Grimmer, K., Schroeder, K., Marsters, S. A., Koeppen, H., Ashkenazi, A., and Kim, K. J. (2001). Isotype-Dependent Inhibition of Tumor Growth In Vivo by Monoclonal Antibodies to Death Receptor 4. *J. Immunol.* 166, 4891–4898.
- [8] Marini, P., Denzinger, S., Schiller, D., Kauder, S., Welz, S., Humphreys, R., Daniel, P. T., Jendrossek, V., Budach, W., and Belka, C. (2006). Combined treatment of colorectal tumours with agonistic TRAIL receptor antibodies HGS-ETR1 and HGS-ETR2 and radiotherapy: enhanced effects in vitro and dose-dependent growth delay in vivo. *Oncogene* 25, 5145–5154.
- [9] Ichikawa, K., Liu, W., Zhao, L., Wang, Z., Liu, D., Ohtsuka, T., Zhang, H., Mountz, J.D., Koopman, W.J., Kimberly, R.P. and Zhou, T. (2001). Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med* 7: 954-960.
- [10] Yada, A., Yazawa, M., Ishida, S., Yoshida, H., Ichikawa, K., Kurakata, S., and Fujiwara, K. (2008). A novel humanized anti-human death receptor 5 antibody CS-1008 induces apoptosis in tumor cells without toxicity in hepatocytes. *Ann. Oncol.* 19, 1060–1067.
- [11] Rowinsky, E. K. (2005). Targeted induction of apoptosis in cancer management: The emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. *J Clin Oncol* 23:9394–9407.
- [12] Guo, Y., Chen, C., Zheng, Y., Zhang, J., Tao, X., Liu, S., Zheng, D., and Liu, Y. (2005). A Novel Anti-human DR5 Monoclonal Antibody with Tumoricidal Activity Induces Caspase-dependent and Caspase-independent Cell Death. *J. Biol. Chem.* 280, 41940–41952.
- [13] Han, J., Hou, W., Goldstein, L.A., Lu, C., Stolz, D.B., Yin, X.M., and Rabinowich, H. (2008). Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells. *J Biol Chem* 283, 19665–19677.
- [14] Park, K. J., Lee, S. H., Kim, T. I., Lee, H. W., Lee, C. H., Kim, E. H., Jang, J. Y., Choi, K. S., Kwon, M. H., and Kim, Y. S. (2007). A human scFv antibody against TRAIL receptor 2 induces autophagic cell death in both TRAIL-sensitive and TRAIL-resistant cancer cells. *Cancer Res.* 67, 7327–7334.
- [15] Sarah G. Hymowitz, Hans W. Christinger,

- H., (2008). A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol. Cell Proteomics*. 7, 282–289.
- [27] Saerens D., Pellis M., Loris R., Pardon E., Dumoulin M., Matagne A., Wyns L., Muyldermans S., Conrath K., (2005). Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies. *J. Mol. Biol.*, 352: 597–607.
- [28] Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J.A.R.G., Hamers, R., (1994). Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.* 7, 1129–1135.
- [29] Vu, K.B., Ghahroudi, M.A., Wyns, L., Muyldermans, S., (1997). Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol. Immunol.* 34, 1121–1131.
- [30] Harmsen, M.M., Ruuls, R.C., Nijman, I.J., Niewold, T.A., Frenken, L., de Geus, B., (2001). Llama heavy chain V-regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Molec. Immunol.* 37, 579–590.
- [31] Ce'cile, V., Remy, L., Dirk, S., Sergio, M.R., Muyldermans, S., and Katja, C., (2009). General Strategy to Humanize a Camelid Single-domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold. *JBC VOL.* 284, NO. 5, pp. 3273–3284, January 30.
- [32] Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG., (2008). Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J Clin Oncol*; 26:3621–30.
- [33] Ashkenazi A., (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumournecrosis factor superfamily. *Nat Rev*; 2: 420–30.
- [34] Vousden KH, Lu X., (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev*; 2: 594–604
- [35] Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, et al., (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*; 104: 155–62.
- [36] Ashkenazi A, Herbst RS., (2008). To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest*; 118: 1979–90.
- [37] Ravi R, Jain AJ, Schulick RD, et al., (2004). Elimination of hepatic metastases of colon cancer cells via p53-independent cross-talk between irinotecan and Apo2 ligand/TRAIL. *Cancer Res*; 64: 9105–14.
- [38] Conrath, K.E., Lauwereys, M., Galleni, M., Germaine Fuh, Mark Ultsch, Mark O'Connell, Robert F. Kelley, Avi Ashkenazi, and Abraham M. de Vos., (1999). Triggering Cell Death: The Crystal Structure of Apo2L/TRAIL in a Complex with Death Receptor 5. *Molecular Cell*, Vol. 4, 563–571.
- [16] Zheng, Z., Shilian, L., Yanxin L. Dexian P.Z., Yong, Z., Juan S., (2010). Targeting a Novel N-terminal Epitope of Death Receptor 5 Triggers Tumor Cell Death. *The journal of biological chemistry VOL.* 285, NO. 12, pp. 8953–8966.
- [17] Hudson, P. J., and Souriau, C. (2003). Engineered antibodies. *Nat. Med.* 9, 129–134
- [18] Smith, G. P., and Petrenko, V. A. (1997). Phage Display. *Chem. Rev.* 97, 391–410
- [19] Sieber, V., Pluckthun, A., and Schmid, F. X. (1998). Selecting proteins with improved stability by a phage-based method, *Nat. Biotechnol.* 16, 955–960.
- [20] Muyldermans S., Atarhouch T., Saldanha J., Barbosa J.A., Hamers R., (1994). Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.*, 7: 1129–1135.
- [21] Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, „Hamers, C., Bajyana Songa, E., Bendahman, N., Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446–448.
- [22] Nguyen V.K., Hamers R., Wyns L., Muyldermans S. (2000). Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J.*, 19: 921–930.
- [23] Baral T.N., Magez S., Stijlemans B., Conrath K., Vanhollebeke B., Pays E., Muyldermans S., De Baetselier P. (2006). Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat. Med.*, 12: 580–584.
- [24] Cortez-Retamozo V., Backmann N., Senter P.D., Wernery U., De Baetselier P., Muyldermans S., Revets H., (2004). Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res.*, 64: 2853–2857.
- [25] Huang, L., Reekmans, G., Saerens, D., Friedt, J. M., Frederix, F., Francis, L., Muyldermans, S., Campitelli, A., and Hoof, C. V., (2005). Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. *Biosens. Bioelectron.* 21, 483–490.
- [26] Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M. C., and Leonhardt,

- enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J.* 17: 3512–3520.
- [40] Conrath, K., Muyldermans, S., Nguyen, V.K., (2003). Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Comp Dev Immunol* 27, 87-103.
- Matagne, A., Frère, J.M., Kinne, J., Wyns, L., and Muyldermans, S., (2001).  $\beta$ -Lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in Camelidae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2807–2812.
- [39] Lauwereys, M., Ghahroudi, M.A., Desmyter, A., Kinne, J., Holzer, W., De Genst, E., Wyns, L., and Muyldermans, S., (1998). Potent