مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره پانزدهم، شمارهٔ ۳، اردیبهشت ۱۳۹۲، صفحه ۸۷-۷۹

جداسازی قطعات مناطق متغیر آنتی بادی تک زنجیره ای (scFv) علیه فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF-α) از کتابخانه آنتی بادی فاژی

جلال عبدالعلی زاده(PhD)[۱]، جعفر مجیدی ذوالبنین(PhD)* [۱]، محمد نوری(PhD)[۱]، بهزاد برادران(PhD)[۲]، ابوالفضل برزگری(MSc)[۱]، یداله امیدی(PhD)[۱]

۱- مرکز تحقیقات ریزفن آوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۲- مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۹۱/۲/۱۱، اصلاح: ۹۱/۴/۱۴، پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۷

خلاصه

سابقه و هدف: سایتوکاین تراپی، یکی از راهکارهای اصلی برای کنترل بیماری های التهابی شدید است. با توجه به اهمیت TNF-α در بسیاری از بیماری های التهابی و اتو ایمیون، این سایتوکاین یک هدف جذاب برای بسیاری از محققین بوده و بعنوان یکی از کاندیدهای مهم برای سایتوکاین تراپی مطرح است. یکی از راهکارهای مقابله با آثار زیانبار TNF-α استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال است. یکی از تکنیک های مهم برای تهیه و تولید آنتی بادی های مونوکلونال تکنیک فاژ دیسپلی می باشد. هدف از این مطالعه تهیه و تولید آنتی بادی مونوکلونال بر ضد TNF-α می باشد.

مواد و روشها: بمنظور جداسازی قطعات کوچک نواحی متغیر آنتی بادی (scFv) از کتابخانه فاژی Tomlinson تکنیک Biopanning با استفاده از پلیت های الایزا انجام شد. پس از کوت نمودن پروتئین TNF-α در ته چاهک ها، کتابخانه فاژی اضافه شد. پس از مرحله شستشو، فاژهای اختصاصی با استفاده از تریپسین جدا و در باکتری TG1 تکثیر گردید. این پروسه جهت بدست آوردن فاژهای نوترکیب بسیار اختصاصی تا پنج بار تکرار گردید. ارزیابی کلون های بدست آمده حاوی قطعات کوچک آنتی بادی بر ضد TNF-α با استفاده از تست های مونوکلونال فاژ الایزا، PCR، RFLP، توالی یابی و وسترن بلات انجام گرفت.

یافته ها: تجزیه و تحلیل توالی ها با استفاده از نرم افزار های بیوانفورماتیکی نشان داد که پلاسمیدهای جدا شده از کلون های واکنشگر با TNF-α حاوی اینسرت بودند. بعلاوه تفاوت این توالی ها بیشتر در سه منطقه دا،غ دیده می شود که می تواند در فعالیت پروتئین تاثیر گذارد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که با استفاده از تکنیک آنتی بادی فاژ دیسپلی آنتی بادی مونوکلونال نسل چهار بر ضد TNF-α با موفقیت تولید می شود.

واژه های کلیدی: فاژ دیسپلی، TNF-α، آنتی بادی مونوکلونال، قطعات مناطق متغیر آنتی بادی تک زنجیره ای (scFv).

مقدمه

دو دهه گذشته شاهد استفاده روزافزون درمانی از فرآورده های بیولوژیک بود که سایتوکاین ها و سلول های درگیر در التهاب موضعی و بیماری های اتوایمون را مورد هدف قرار می دادند. این عوامل گزینه های درمانی برای بیماران با بیماری های ناتوان کننده مزمن را که عملا سالها هیچ راهکار درمانی تازه ای نداشتند، فراهم نمودند. این راهکارهای نو، معالجه بیماری های مختلف در زمینه های هماتولوژی، درماتولوژی، نورولوژی و جهاز هاضمه را متحول کرد. ایمونومدولاتورها یا تعدیل کننده های بیولوژیک شامل اینترفرون ها، مهار کننده های فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF-α)، آنتاگونیست های رسپتورهای اینترلوکین۱، فاکتورهای رشد، مهارکننده های کمپلمان و دیگر عوامل متنوع تغییر دهنده سیستم ایمنی می باشند (۱). TNF-α سایتوکاین اصلی التهابی بوده و نقش مرکزی در دفاع میزبان، التهاب و عملکرد سیستم ایمنی دارد که با پاتوژنز، توسعه و پیشرفت انواع عفونت ها، بیماری های خود ایمنی، بیماریهای بدخیم و غیره ارتباط دارد (۲). مقادیر سرمی TNF-α برای هموستاز ایمنی مهم است، در حالیکه تولید نامناسب آن در پاتوژنز انواع بیماری های التهابی مزمن مانند آرتریت روماتوئید (۳و۴)، مالتیپل اسکلروز (MS)، بیماری روده ملتهب، بیماری کرون و غیره نقش دارد (۵). خنثی کردن مقادیر اضافی TNF-α استراتژی درمانی موثر برای این بیماری ها به شمار می رود (۶). بعلاوه TNF-α در آپوپتوز و بقای سلول ها نیز دخالت دارد (۷). مطالعات مختلف خواص پیش

▣ این مقاله حاصل پایان نامه جلال عبدالعلیزاده دانشجوی رشته دکتری بیوشیمی و طرح تحقیقاتی به شماره ۸۹۰۰۷ دانشگاه علوم پزشکی تبریز می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات ریزفن آوری دارویی، تلفن: ۳۳۶۴۶۶۵-۰۴۱۱
e-mail: jmajidiz@yahoo.com

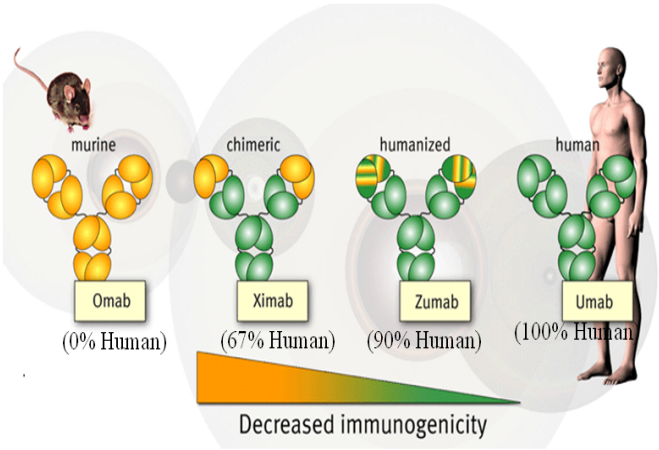
[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.11.8]

التهابی TNF-α (۸) و نقش آن در شوک اندوتوکسیک را نشان داده اند. TNF-α موجب القای التهاب شده و آثار کاتابولیک آن شامل تب، شوک، آسیب بافتی، کاشکسی، آنمی، بازجذب استخوان، تمایز و تکثیر سلول های خونی و القای پروتئین های فاز حاد کبدی می باشد (۹). با تولید آنتی بادی مونوکلونال (mAb) و افزایش دانش بشری در باره ارتباط ساختمان با عملکرد آنتی بادی و سازماندهی ژن های ایمونوگلوبولین ها، بحث تولید آنتی بادی های مونوکلونال ساده و جذاب تر شده است (۱۰).

اولین گروه آنتی بادی های درمانی، پروتئین های موشی بودند که با تکنیک هیبریدومای موشی تولید شدند (آنتی بادی های نسل اول) (۱۰). محدودیت اصلی در استفاده درمانی از این مولکول ها، ایمونوژنیسیتی آنها بود (۱۲و۱۱) از اینرو برای مرتفع کردن این مشکل، بحث آنتی بادی های Chimeric مطرح شد (آنتی بادی های نسل دوم). در این آنتی بادی ها بین قسمت V ژن آنتی بادی موشی و قسمت C ژن انسانی لینک ایجاد می شود (۱۳). با اینحال علیرغم کاهش ایمونوژنیسیتی، بعلت وجود قسمت V موشی، مقداری ایمونوژنیسیتی وجود دارد (۱۲و۱۱).

برای به حداقل رساندن ایمونوژنیسیتی مذکور، بحث انسانی کردن آنتی بادی ها مطرح گردید (آنتی بادی های نسل سوم) (۱۴). بالاخره آنتی بادی های تماما انسانی (آنتی بادی های نسل چهارم) (۱۷–۱۵). مطرح شد که یکی از روشهای مرسوم برای تهیه و تولید آنها تکنیک آنتی بادی فاژ دیسپلی (۱۸) است. شکل ۱ مراحل تکامل چهار نسل از آنتی بادی های مونوکلونال را نشان می دهد. تکنیک فاژ دیسپلی که برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ توسط Smith معرفی شد معمولا برای نمایش فاژی، تغلیظ و تمایل پروتئین ها و پپتیدهای مختلف از کتابخانه های بزرگ تا تنوع 10^{10} مورد استفاده قرار می گیرد. مزیت بالای این تکنیک، ارتباط مستقیم بین فنوتیپ و ژنوتیپ است چرا که پلی پپتید بیان شده و قطعه DNA کد کننده آن روی یک قطعه فاژ قرار دارند (۱۹).

هدف از این مطالعه تهیه و تولید آنتی بادی مونوکلونال از نوع scFv علیه پروتئین TNF-α انسانی با استفاده از تکنیک آنتی بادی فاژ دیسپلی می باشد.



شکل ۱. مراحل تکامل چهار نسل از آنتی بادی های مونوکلونال

آنتی بادی های موشی که توسط تکنیک هیبریدوما تولید می شوند، آنتی بادی های Chimeric، آنتی بادی های انسانی شده و آنتی بادی های تماما انسانی. با تکامل آنتی بادی ها (از چپ به راست) ایمونوژنیسیتی کاهش می یابد.

مواد و روشها

این مطالعه برای بومی سازی و Set up نمودن تکنیک فاژ دیسپلی و برای تولید آنتی بادی های مونوکلونال انسانی (نسل چهار) در دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد.

جداسازی قطعات اختصاصی بر علیه TNF-α: پس از خریداری کتابخانه Tomlinson I + J (MRC geneservice) ابتدا تیتر آن از نظر تعداد کلونهای باکتریایی ارزیابی گردید. این کتابخانه در محیط کشت 2xTY (۱۶ گرم Tryptone، ۱۰ گرم Yeast Extract و ۵ گرم NaCl در یک لیتر آب مقطر) کشت داده شد و یک حجم از آن برای تهیه کپی های متعدد از کتابخانه مورد استفاده قرار گرفت. بقیه در حجم های ۰/۵ میلی لیتر در بافر PBS تهیه و به عنوان کتابخانه فاژ نوترکیب در فریزر نگهداری گردید. برای جدا کردن فاژهای نوترکیب اختصاصی متصل شونده به TNF-α انسانی از تکنیک Biopanning با استفاده از پلیت های الایزا استفاده شد.

پس از کوت نمودن پروتئین TNF-α (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) در چاهک های مورد نظر و بلاکینگ آنها با محلول بلاکر (محلول ۳ درصد شیر بدون چربی در PBS)، محلول حاوی فاژ اضافه شد. پس از شستشو با PBST (PBS حاوی ۰/۱ درصد Tween-20)، فاژهای نوترکیب اختصاصی TNF-α بکمک تریپسین (SigmaChemical, St. Louis, MO, USA) جدا و در باکتری TG1 تکثیر و همزمان تعداد کلنی های حاصله نیز در پلیت های Trypton Yeast Extract حاوی ۱ درصد گلوکز و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین (TYE-AG) ارزیابی گردید. این پروسه جهت بدست آوردن فاژهای نوترکیب بسیار اختصاصی تا پنج بار تکرار گردید.

تکثیر فاژهای نوترکیب بعداز مراحل Biopanning: فاژهای نوترکیب جدا شده با تریپسین بعد از هر مرحله Biopanning به باکتری TG1 کشت یافته در 2xTY اضافه و بمدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم انکوبه گردید. باکتریهای آلوده به فاژ نوترکیب در پلیت های TYE-AG کشت داده شد. سپس باکتری ها از روی پلیت برداشته شد و مقدار بسیار کمی از آن در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت TYE-AG تا حصول OD_{600}=0.4 کشت داده شد. به مقدار ۱۰ میلی لیتر از این کشت فاژ کمکی (5×10^{11}) اضافه و ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم انکوبه شد.

بعد از اضافه نمودن ۵۰ میلی لیتر محیط کشت TYE-AKG (TYE حاوی ۱ درصد گلوکز، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی سیلین و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر کانامایسین) در ۳۰ درجه انکوبه گردید. روز بعد محیط کشت را سانتریفوژ کرده و مایه رویی حاوی فاژ را جدا و با PEG 6000/NaCl (Merck, St. Paul, USA) (به نسبت ¼) رسوب داده و مجددا" در بافر PBS بصورت سوسپانسیون درآورده و بعد از تیتر کردن فاژهای حاصله، برای مرحله بعدی Biopanning بکار گرفته شد.

پلی کلونال الایزا: فاژهای رسوب داده شده از پنج مرحله مختلف Biopanning جهت بررسی وجود قطعات کوچک نواحی متغیر آنتی بادی (scFv) اختصاصی بر ضد TNF-α با استفاده از پلی کلونال الایزا مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا پروتئین TNF-α در ته چاهک های الایزا کوت شد. همچنین چاهک هایی نیز بعنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از بلاکینگ آنها با

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.11.8]

محلول بلاکر، فاژهای بدست آمده از هر مرحله Biopanning اضافه شد. پس از شستشو با PBST مقدار ۱۰۰میکرولیتر از آنتی بادی Anti-M13 Monoclonal Antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) اضافه گردید. پس از اضافه نمودن آنتی بادی ضد IgG موش نشاندار با پراکسیداز (Invitrogen, USA)، سوبسترای 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) اضافه گردید و در نهایت با استفاده از ELISA Reader (Stat Fax, USA) جذب نوری واکنش قرائت گردید.

ارزیابی ویژگی کلون های جدا شده حاوی قطعات scFv بر ضد TNF-α از طریق مونوکلونال فاژالایزا: برای ارزیابی ویژگی کلون های جدا شده برضد TNF-α تست مونوکلونال الایزا طراحی گردید. بدین ترتیب که پروتئین TNF-α در ته چاهک های الایزا کوت شد و با بافرPBST بلوکه گردید. همچنین چاهک هایی نیز بعنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. کلونهای انتخابی از راند های مختلف Biopanning در پلیت های ۹۶ تایی حاوی محیط کشت 2xTY کشت داده شد. بعد از دو ساعت انکوباسیون، مقدار ۵۰ میکرو لیتر از سوپر ناتانت روی هر یک از چاهک ها اضافه شد. پس از انجام بقیه مراحل ذکر شده در بالا، در نهایت با استفاده از ELISA Reader جذب نوری واکنش قرائت گردید.

خالص سازی پلاسمید های فاژی از کلون های انتخاب شده: کلونهای انتخاب شده با مونوکلونال فاژ الایزا، در یک فالکون ۵۰ میلی لیتری کشت داده شدند. خالص سازی پلاسمید های فاژی با استفاده از کیت کیاژن (QIAprep Spin Miniprep) مطابق دستورالعمل آن انجام گرفت. سپس با استفاده از روش اسپکتروفتومتری از نظر کیفیت و کمیت ارزیابی شدند.

تایید وجود قطعات اینسرت شده با تکنیک واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): جهت انجام PCR از جفت پرایمر های LMB (با توالی CAG GAA ACA GCT ATG AC) و Phen (با توالی CTA TGC GGC CCC ATT CA) و با دستورالعمل دناتوراسیون اولیه ۹۴ °C بمدت ۴ دقیقه و به تعداد ۳۲ سیکل در شرایط ۹۴°C بمدت ۵۰ ثانیه، ۵۵ °C بمدت ۵۰ ثانیه، و ۷۲ °C بمدت ۴۵ ثانیه و نیز گسترش نهایی ۷۲ °C بمدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول تکثیر شده در آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

تعیین میزان تنوع اولیه با استفاده از تکنیک چند شکلی طول قطعه محدود (RFLP): به منظور ارزیابی تنوع اولیه، قطعات اینسرت شده با استفاده از PCR تکثیر شده و سپس توسط آنزیم های TaqI و MSPI (Fermentas, Hanover, MD, USA) برش یافته و در ژل اگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند.

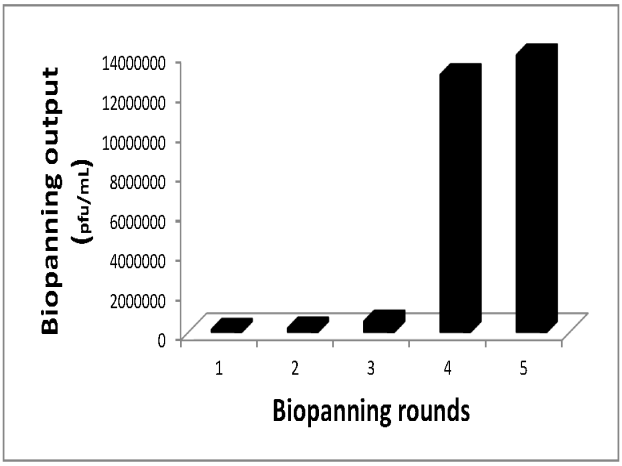
تعیین توالی قطعات اینسرت شده: جهت بررسی تنوع و تغییرات موجود در قطعات اینسرت شده در پلاسمید های فاژی، پلاسمید های مورد نظر پس از خالص سازی، توالی یابی ارسال شدند. نتایج توالی یابی با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی(Clustal W, chromaslite)و پس از بلاست در NCBI از نظر وجود نوکلئوتیدهای متفاوت مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ترجمه بیوانفورماتیکی با نرم افزار Edit Seq از نظر تغییرات اسیدهای آمینه نیز بررسی شدند.

ارزیابی وجود قطعه scFv اختصاصی TNF-α بوسیله وسترن بلات: برای تایید وجود قطعات scFv اختصاصی در کلون های انتخابی تست وسترن بلات طراحی شد. ابتدا تک کلونی های باکتری E.coli سویه HB_{2151} با IPTG به منظور تولید پروتئین scFv القا شدند. الکتروفورز SDS-PAGE از فراکسیون پری پلاسمیک انجام گرفت. این فراکسیون ها با بافر نمونه مخلوط شده و بعد از ۵ دقیقه جوشاندن در ته چاهک های تعبیه شده بارگذاری شد. الکتروفورز در شرایط احیا در ژل با غلظت ۱۳ در صد و در شرایط ولتاژ ثابت انجام شد. بعد از الکتروفورز SDS-PAGE و بلات این الگو روی غشای PVDF از یک سیستم نیمه خشک استفاده گردید (۲۲-۲۰)،

بعد از بلاکینگ غشای PVDF با بافرTBST آنتی بادی مونوکلونال ضد Myc (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA) اضافه شد. پس از شستشو و اضافه کردن آنتی بادی کونژوگه ضد IgG موش، باندهای پروتئینی با استفاده از سوبسترای Enhanced Chemiluminescence (ECL; Amersham Biosciences, Freiburg , Germany) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها

Biopanning بر علیه TNF-α: پروسه جدا کردن فاژهای نوترکیب متصل شونده به TNF-α تا پنج بار تکرار گردید. تیتر فاژهای جدا شده تا مرحله سوم Biopanning تا نزدیک شش برابر بالا رفته، در مرحله چهارم یک افزایش صد برابری در تیتر فاژ های جدا شده مشاهده شد و بالاخره در مرحله پنجم افزایش جزیی دیده شد که نشان دهنده تغلیظ کافی در تیتر فاژ های جدا شده، می باشد (شکل ۲).



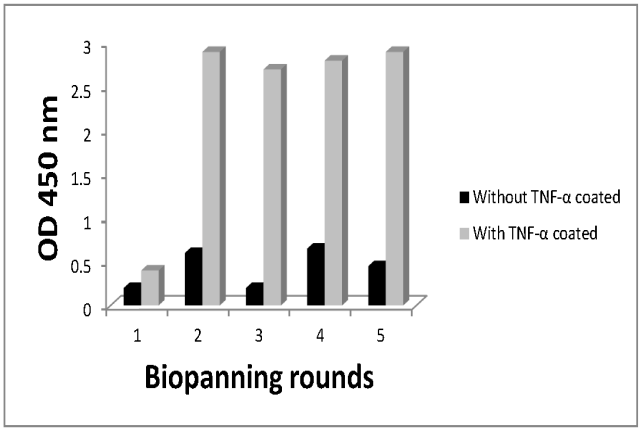
شکل۲: تیترهای Biopanning قطعات scFv بر ضد TNF-α با استفاده از Tomlinson I+J library

ستون ها تیتر فاژهای بدست آمده از پنج مرحله مختلف Biopanning را در طول موج ۴۵۰ نانومتر نشان می دهند. اعداد نشان داده شده در سمت چپ تیتر فاژ های جدا شده بر حسب Plaque-forming unit در میلی لیتر (pfu/ml) می باشد.

پلی کلونال فاژ الایزا: سیگنال های مثبت برای چاهک های کوت شده با TNF-α حداقل سه برابر سیگنال های منفی برای چاهک های کوت شده با محلول بلاکر است (بجز مرحله اول). نتایج نشان می دهند که فاژهای غیر

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.11.8]

اختصاصی موجود در مراحل یک و دو Biopanning با افزایش مراحل شستشو و نیز کاهش غلظت پروتئین TNF-α کوت شده در ته چاهک ها، شسته شده و در مراحل بعدی تغلیظ گردیدند. تست مونوکلونال الایزا نیز برای ارزیابی ویژگی کلون های جدا شده برضد TNF-α طراحی گردید. از حدود ۵۰۰ کلون ارزیابی شده حدود ۵۰ کلون دارای جذب نوری بالا بودند. این کلون ها برای ارزیابی بیشتر با روش های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۳).

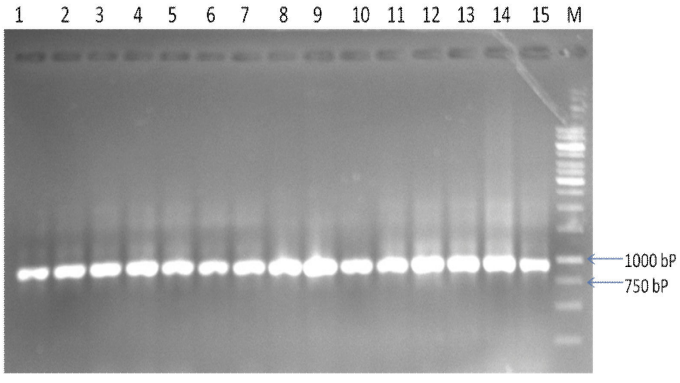


شکل ۳: آنالیز فاژهای بدست آمده از مراحل مختلف Biopanning با استفاده از پلی کلونال فاژ الایزا

ستون ها جذب نوری چاهک ها از پنج مرحله مختلف Biopanning را در طول موج ۴۵۰ نانومتر نشان می دهند. سیگنال های مثبت توسط ستون های خاکستری و سیگنالهای منفی توسط ستون های مشکی نمایش داده شده اند.

خالص سازی پلاسمید های فاژی از کلون های انتخاب شده: خالص سازی پلاسمید های فاژی بعد از کشت کلون های انتخاب شده با مونوکلونال فاژ الایزا انجام گرفت. الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. نتایج الکتروفورز وجود دو نوع تنوع را در پلاسمیدها نشان داد.

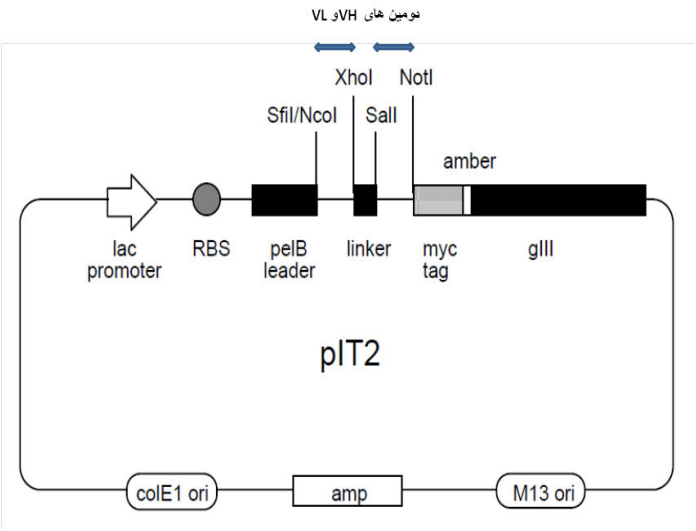
تایید وجود و عدم وجود قطعات اینسرت شده با تکنیک PCR:
وجود باند های در محدوده ۹۳۵ جفت باز (bp) نشان دهنده وجود اینسرت های مورد نظر scFv در فاژمید های استخراج شده می باشد (شکل ۴).



شکل ۴. الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪

با توجه به نقشه فاژمید حامل اینسرت (شکل ۵)، وجود دو نوع اینسرت قابل انتظار بود. وجود محصول PCR حدود ۹۳۵ نشان می دهد که هر دو قطعه اینسرت شده است. در نهایت از تعداد ۵۰ کلونی بررسی شده تعداد ۱۵ کلون انتخاب شدند.

سپس تعیین میزان تنوع اولیه با استفاده از تکنیک RFLP انجام شد. مقایسه الگوی هضم آنزیمی انجام شده با الگوی هضم آنزیمی حاصل از نرم افزار بیوانفورماتیکی نشان داد که توالی یابی پلاسمیدهای فاژی بخوبی انجام شده است.



شکل ۵. نقشه وکتور pIT2 و جایگاه دومین های VH و VL (دومین های نواحی متغیر زنجیره های سنگین و سبک) روی آن

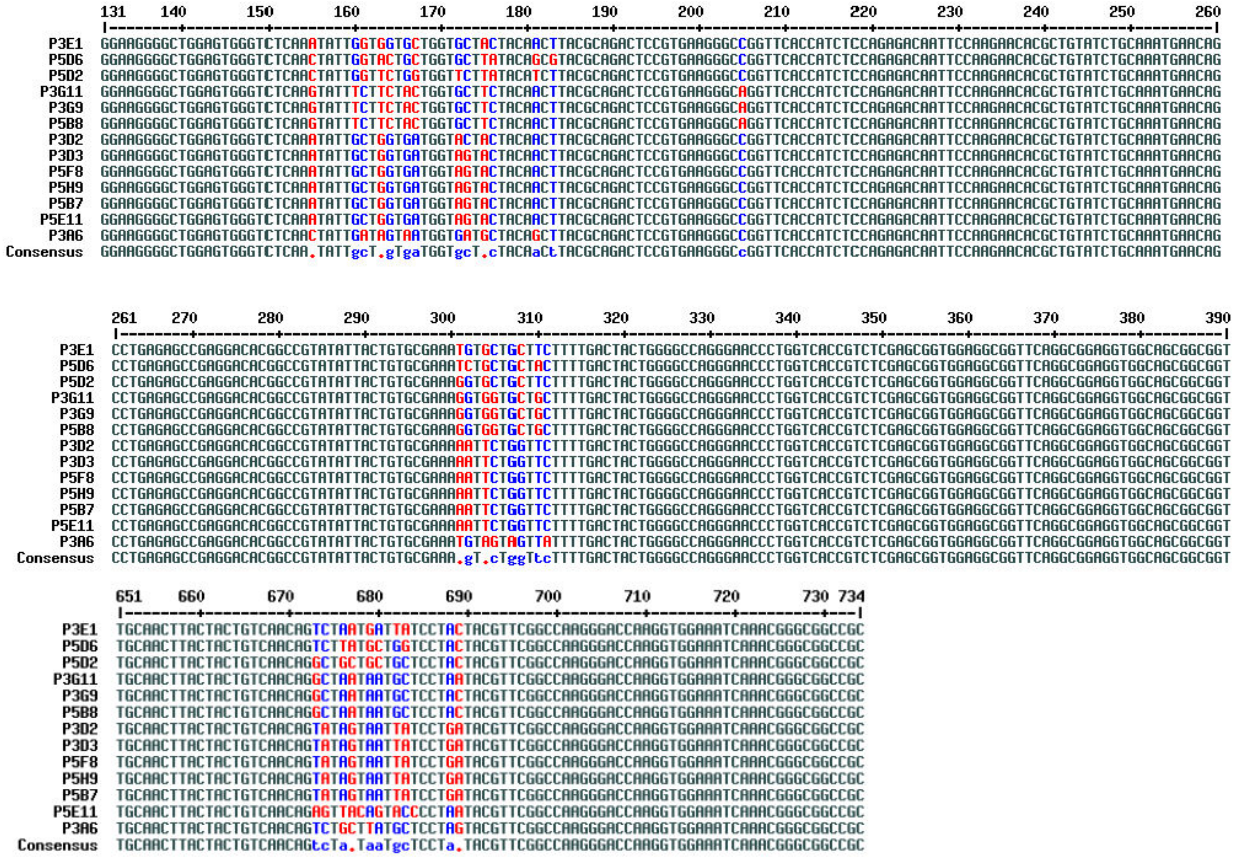
دومین های VH و VL در بالای شکل نشان داده شده است که توسط یک قطعه متصل کننده به یکدیگر متصل شده اند.

ارزیابی نتایج توالی یابی: توالی های بدست آمده با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی Clustal W الاین شد (شکل ۶). سپس نواحی حفظ شده و متغیر مورد بررسی قرار گرفته و تفاوت توالی ها مشخص شدند. همه توالی ها در سه منطقه دارای تفاوت بوده و در بقیه مناطق کاملا حفاظت شده می باشند. تفاوت در توالی ها می تواند از نظر عملکرد بیولوژیکی مهم باشد. پس از ترجمه بیوانفورماتیکی با نرم افزار Edit Seq، از نظر تغییرات اسید های آمینه نیز بررسی شدند.

همچنین توالی های بدست آمده پس از بلاست در NCBI از نظر درصد شباهت با scFv های ثبت شده در دیتا بیس NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین یکی از توالی های بدست امده با کد ۱۴۸۸۸۰۹ در NCBI ثبت شد. از حدود ۵۰ کلون ارزیابی شده، ۱۵ کلون با تنوع مختلف بدست آمد که عملکرد آنها با طرق مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

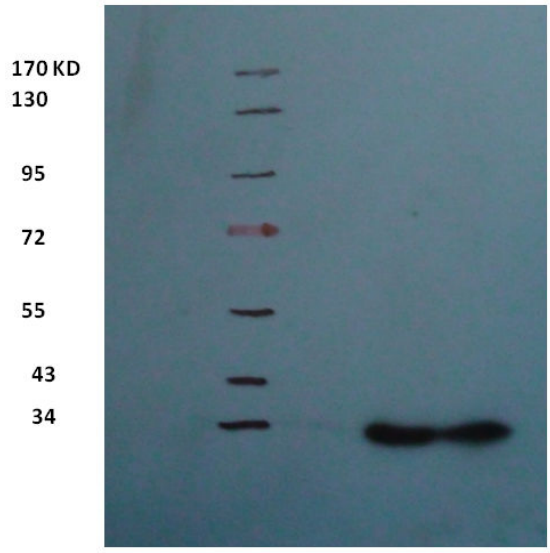
وسترن بلات: تست وسترن بلات برای تایید وجود قطعات scFv اختصاصی در کلون های انتخابی انجام شد. وجود باند حدود ۳۰ کیلو دالتون پس از انکوباسیون غشا با آنتی بادی Anti-myc وجود قطعات اختصاصی در کلونهای انتخابی را نشان می دهد (شکل ۷).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.11.8]



شکل ۶. الاینمنت توالی کلون های انتخابی با استفاده از نرم افزار بیوانفورماتیکی Clustal W

توالی کلون ها در سه منطقه دارای تفاوت بوده و در بقیه مناطق کاملا حفاظت شده می باشند.



شکل ۷. وسترن بلات پروتئین های scFv **بیان شده در کلونهای انتخابی.**

باکتری HB2151 توسط ۱ میلی مولار IPTG القا شد. پروتئین های فراکسیون پری پلاسمیک استخراج شده، پس از جدا سازی با الکتروفورزSDS-PAGE روی ژل ۱۲ درصد، روی غشای PVDF بلات شد. بعد از انکوباسیون با آنتی بادی مونوکلونال anti-myc tag باندهای پروتئینی با استفاده از سوبسترای ECL مشاهده شدند. باندهای حدود ۳۰ کیلو دالتونی مربوط به پروتئین های scFv می باشند. ستون های۱و۳ فراکسیون های پری پلاسمیک دو کلون مختلف قبل از القا هستند. ستون ۲ مارکر وزنی و ستون های ۴و۵ فراکسیون های پری پلاسمیک کلون ها بعد از القا را نشان می دهند.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.11.8]

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه برای تولید scFv بر علیه TNF-α با استفاده از تکنیک فاژ دیسپلی، پنج مرحله Biopanning انجام شد. با توجه به نتایج بدست آمده از این پنج مرحله، کلون های اختصاصی بر ضد TNF-α با موفقیت تغلیظ شدند. Chen و همکاران برای جداسازی آنتی بادی مونوکلونال بر ضد TNF-α از کتابخانه فاژی، تعداد چهار مرحله Biopanning انجام دادند. بنظر می رسد بر اساس یافته های این مطالعه و مطالعه Chen و همکاران مرحله چهارم Biopanning برای حصول فاژهای اختصاصی بر ضد TNF-α کافی باشد (۲۳). ارزیابی کلون های بدست آمده حاوی قطعات کوچک آنتی بادی بر ضد TNF-αبا استفاده از تست های مونوکلونال فاژ الایزا، PCR، RFLP، توالی یابی و وسترن بلات انجام گرفت. مونوکلونال فاژ الایزا نشان داد که حدود ۵۰ کلون دارای جذب بالایی بودند. پس از انتخاب کلون های حاوی فاژمید دارای قطعات اینسرت شده به منظور بررسی تفاوت توالی ها و نیز اختصاصیت قطعات scFv بدست آمده، واکنش زنجیره ای پلی مراز، RFLP و توالی یابی قطعات هدف انجام شد. تجزیه و تحلیل انجام شده بر روی توالی ها با استفاده از نرم افزار های بیوانفورماتیکی نشان داد که همه پلاسمید ها دارای اینسرت بودند. بعلاوه تفاوت این توالی ها بیشتر در سه منطقه داغ، دیده می شود که می تواند در فعالیت پروتئین تاثیر گذار باشد. این کلون های متفاوت، به منظور ارزیابی بیشتر از نظر فعالیت انتخاب شدند. تست وسترن بلات برای تایید وجود قطعات scFv اختصاصی بر ضد TNF-α طراحی شد. وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال بر ضد Myc tag روی فراکسیون پری پلاسمیک کلون های انتخابی سویه HB_{2151} باکتری E.coli بیان موفقیت آمیز قطعات scFv را نشان داد.

اخیرا هدف درمانی و درمان با خنثی سازی سایتوکاین ها با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال برای درمان سرطان و بیماری های التهابی بکار گرفته می شود. با توجه به نقش TNF-α در بیماری های مختلف مخصوصا بیماریهای اتوایمیون از قبیل آرتریت روماتوئید، کرون، مالتیپل اسکلروز، روده ملتهب، تیروئید اتوایمیون، گریوز و نیز بیماری های بدخیم (۲۵و۲۴و۴) و نیاز کشور برای درمان و تشخیص های پاراکلینیکی این بیماری ها که طبق اسناد وزارت بهداشت و درمان، سالانه بالغ بر میلیون ها دلار، صرف خرید آنتی بادی های مونوکلونال بر ضد TNF-α از خارج از کشور می شود، یکی از راهکارهای مقابله با آثار زیانبار TNF-α استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال است و تاثیر درمان علیه TNF-α در معالجه آرتریت روماتوئید کاملا اثبات شده است (۲۶). تا بحال چند تا از بلوکر های TNF-α توسط موسسه غذا و داروی آمریکا (FDA) برای معالجه انواع مختلفی از بیماری ها تایید شده است. از جمله می توان به adalimumab، etanercept،infliximab (در سال ۲۰۰۸ برای بیماری کرون و در سال ۲۰۰۹ برای RA)، certolizumab و golimumab (در سال ۲۰۰۹ برای آرتریت روماتوئید، آرتریت پسوریایی و ankylosing spondylitis (AS) اشاره کرد (۲۹-۲۷).

با اینحال برای هر چه بیشتر موثر تر واقع شدن این راهکار به چند نکته باید توجه داشت. نخست اینکه وزن مولکولی ایمونوگلوبولین مونوکلونال بزرگ است (۱۵۰ کیلو دالتون) که این مساله انتشار این مولکول و هدف گیری آنتی ژن هایی را که در اعماق بافت ها قرار دارند مشکل می کند. دوم اینکه تهیه و تولید آنتی بادی ها با استفاده از کشت سلول پستانداران مشکل و پر هزینه است. این مشکلات، توجه و علاقه شرکت های داروئی را از سمت آنتی بادی های مونوکلونال کامل بسمت قطعات کوچک آنتی بادی ها معطوف کرده است (۳۰). چرا که این قطعات کوچک دارای مزیت های خاصی می باشند، یکی از مزیتهای آنها اندازه و سایز کوچک آنهاست که این امکان را به آنها می دهد که راحت تر و عمیق تر از آنتی بادی های کامل به بافت ها و تومورها نفوذ کرده و نقش خود را ایفاد کنند (۳۱). بعلاوه اندازه کوچک آنها این امکان را به این قطعات می دهد که به اپی توپ های پنهانی که قابل دسترس به آنتی بادی های کامل نیستند از جمله گلیکوپروتئین های پاتوژن ایمن گریز و نیز محل های فعال پنهان آنزیمی متصل شوند. همچنین از آنجا که قطعات کوچک آنتی بادی ها، پروتئین های کوچک و غیر گلیکوزیله اند، امکان تولید آنها را در سیستم های بیانی باکتریال که سیستم های بیانی ساده، راحت و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه هستند، میسر می کند (۳۳و۳۲).

یکی از معایب قطعات کوچک آنتی بادی ها، کلیرانس کلیوی سریع آنهاست. امروزه برای اصلاح این مشکل، آنتی بادی های scFv را بهم متصل کرده و قطعات دیگری از آنتی بادی ها مانند دیابادی ها، تریابادی ها و تترا بادیها را مهندسی می کنند (۳۴). بعلاوه با استفاده از کلیرانس کلیوی سریع، این قطعات کوچک آنتی بادی ها را با مواد مختلف نشاندار کرده و در تصویر برداری های مختلف از نقاط بدن مورد استفاده قرار می دهند (۳۵). تکنیک فاژ دیسپلی یکی از تکنیک های مهم برای تهیه و تولید قطعات کوچک آنتی بادی های انسانی می باشد. تکنیکی که براحتی می تواند پاسخگوی نیاز جوامع در تهیه و تولید آنتی بادی های مونوکلونال باشد. امروزه چندین آنتی بادی مونوکلونال تولید شده با این تکنیک مجوز FDA را در یافت کرده و یا در مراحل مختلف کارآزمایی های بالینی هستند (۳۶).

این مطالعه یک مطالعه کاربردی برای پاسخگویی به یکی از نیازهای ضروری کشور بود که با انجام مطالعات تکمیلی، می تواند راه را برای انجام دیگر موفقیت ها هموار سازد. بنظر می رسد پرداختن به مطالعات و پژوهش های کاربردی یک ضرورت برای کشور باشد. چرا که این پژوهش ها می توانند هم مشکلات جامعه را مرتفع سازند و هم اینکه از واردات بی رویه بعضی اقلام و کالاها جلوگیری کنند که به تبع آن علاوه بر جلوگیری از مصرف ارز، قطع وابستگی کشور به خارج را نیز در پی خواهد داشت.

پس از بررسی های بیشتر، از آنتی بادی تولید شده بر علیه TNF-α با روش فوق می توان علاوه بر استفاده درمانی، در تشخیص های آزمایشگاهی در تست های مختلف ایمونواسی از قبیل الایزا، وسترن بلات، تست های ایمونوهیستوشیمی و فلوسیتومتری استفاده کرد. با انجام این مطالعه، آنتی بادی مونوکلونال نسل چهار بر ضد TNF-α با موفقیت تولید شد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مرکز تحقیقات ریز فن آوری دارویی تبریز که هزینه این طرح را تقبل نموده اند، همچنین از مرکز تحقیقات ایمونولوژی و مرکز تحقیقات کاربردی- دارویی تبریز بخاطر همکاری صمیمانه در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.11.8]

Isolation of Anti-Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-α) scFvs Antibody from Phage Antibody Library

J. Abdolalizadeh (PhD) [1], J. Majidi Zolbanin (PhD)[1*], M. Nouri (PhD)[1], B. Baradaran (PhD)[2], A. Barzegari (MSc)[1], Y. Omidi (PhD)[1]

1. Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
2. Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

J Babol Univ Med Sci; 15(3); May 2013; pp: 79-87

Received: Apr 30th 2012, Revised: Jul 4th 2012, Accepted: Jan 6th 2013.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Cytokine therapy is a fundamental step for the control of the most severe inflammatory diseases. Considering the importance of TNF-α in most of autoimmune and inflammatory diseases, it has been as an attractive target for many researchers and is an important candidate for cytokine therapy. Using monoclonal antibodies is a major approach in contrast to deleterious effects of TNF-α. Antibody phage display technology is a major technique for the preparation of monoclonal antibodies. Our goal in current study was production and preparation of monoclonal antibody against TNF-α.

METHODS: For Biopanning technique, we used ELISA plates for isolation of single chain variable fragments (scFv) from Tomlinson library. After coating of TNF-α protein in the wells, phage library was added. Specific phages were eluted using Trypsin after washing process and amplified in TG1 cells. Five rounds of panning were conducted for obtaining high specific phages. The evaluation of selected clones was done through monoclonal phage ELISA, PCR, RFLP and western blotting methods.

FINDINGS: Analysis of sequences using bioinformatic softwares showed that separated plasmids from TNF-α reactive clones contained insertions. Furthermore, most of variations are seen in three hot regions which can affect protein function.

CONCLUSION: The results of this study showed that forth generation of monoclonal antibodies against human TNF-α were successfully produced.

KEY WORDS: *Phage display, TNF-α, Monoclonal antibody, Single chain variable fragment.*

[*]**Corresponding Author;**
Address: Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
Tel: +98 411 3364665
E-mail: jmajidiz@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.11.8]

References

1.Wolf R, Matz H, Orion E, Ruocco V. Anti-TNF therapies—the hope of tomorrow. Clin Dermatol 2002;20(5):522-30.
2.Ware CF. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. Annu Rev Immunol 2005;23:787-819.
3.Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol 2008;214(2):149-60.
4.Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? Annu Rev Immunol 2001;19:163-96.
5.Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. Rheumatology (Oxford) 2010;49(7):1215-28.
6.Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. Nat Rev Drug Discov 2003;2(9):736-46.
7.Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell 2001;104(4):487-501.
8.Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. J Exp Med 1985;162(6):2163-8.
9.Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. J Exp Med 1988;167(3):1211-27.
10.Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975;256(5517):495-7.
11.Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan AC, Jr. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. Cancer Res 1985;45(2):879-85.
12.Shawler DL, Bartholomew RM, Smith LM, Dillman RO. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. J Immunol 1985;135(2):1530-5.
13.Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. Proc Natl Acad Sci U S A 1984;81(21):6851-5.
14.Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. Nature 1988;332(6162): 323-7.
15.Lonberg N, Huszar D. Human antibodies from transgenic mice. Int Rev Immunol 1995;13(1):65-93.
16.Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. Nature 1994;368(6474):856-9.
17.Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, et al. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. Nat Genet 1997;15(2):146-56.
18.McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature 1990;348(6301):552-4.
19.Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 1985;228(4705):1315-7.
20.Baradaran B, Majidi J, Hassan Z, Abdolalizadeh J. Large scale production and characterization of anti-human IgG monoclonal antibody in peritoneum of Balb/c mice. Am J Biochem Biotechnol 2006;1(4):186-192.
21.Mostafaie A, Abdolalizadeh J. Immunogens of Brucella abortus (S19) identified by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. Iran J Med Sci 2005;30(1):10-15.
22.Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76(9):4350-4.
23.Chen W, Zhang J, Zhang T, et al. Improved isolation of anti-rhTNF-alpha scFvs from phage display library by bioinformatics. Mol Biotechnol 2009;43(1):20-8.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.11.8]

24.Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor. Arthritis Rheum 1993;36(12):1681-90.
25.Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. Anti-TNF-alpha therapies: the next generation. Nat Rev Drug Discov 2003;2(9):736-46.
26.Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. Nat Rev Immunol 2010;10(5):301-16.
27.Dommasch E, Gelfand JM. Is there truly a risk of lymphoma from biologic therapies? Dermatol Ther 2009;22(5):418-30.
28.Ferrandiz C, Carrascosa JM, Boada A. A new era in the management of psoriasis? The biologics: facts and controversies. Clin Dermatol 2010;28(1):81-7.
29.Smolen JS, Weinblatt ME. When patients with rheumatoid arthritis fail tumour necrosis factor inhibitors: what is the next step? Ann Rheum Dis 2008;67(11):1497-8.
30.Nelson AL, Reichert JM. Development trends for therapeutic antibody fragments. Nat Biotechnol 2009;27(4):331-7.
31.Joosten V, Lokman C, Van Den Hondel CA, Punt PJ. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. Microb Cell Fact 2003;2(1):1.
32.Zhu Z, Zapata G, Shalaby R, Snedecor B, Chen H, Carter P. High level secretion of a humanized bispecific diabody from escherichia coli. Biotechnology (NY) 1996;14(2):192-6.
33.Le Gall F, Bove JM, Garnier M. Engineering of a single-chain variable-fragment (scFv) antibody specific for the stolbur phytoplasma (Mollicute) and its expression in escherichia coli and tobacco plants. Appl Environ Microbiol 1998;64(11):4566-72.
34.Hudson PJ, Kortt AA. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. J Immunol Methods 1999;231(1-2):177-89.
35.Colcher D, Pavlinkova G, Beresford G, Booth B, Choudhury A, Batra S. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. Q J Nucl Med 1998;42(4):225-41.
36.Thie H, Meyer T, Schirrmann T, Hust M, Dubel S. Phage display derived therapeutic antibodies. Curr Pharm Biotechnol 2008;9(6):439-46.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.11.8]