بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی تهران

دانشکده فنآوریهای نوین پزشکی

عنوان:

طراحی و ساخت نانو سازهای شبه فاژی نمایش دهنده میموتوپ EGFR و دومین L2 از ECD-EGFR و بررسی اثرات آن در شرایط In Vivo

پایان‌نامه برای دریافت درجه دکتری تخصصی PhD

در

رشته بیوتکنولوژی پزشکی

نگارنده:

مجید اسدی قعله نی

اساتید راهنما

دکتر اسماعیل صدرالدینی

دکتر محمدجواد رسایی

اساتید مشاور

دکتر معصومه رجبی بذل

دکتر مسعود خسروانی

سال ۱۳۹۴

شماره: .....

اظهارنامه دانشجو

موضوع پایان‌نامه: طراحی و ساخت نانو سازههای شبه فاژی نمایش دهنده پپتیدهای کاهش دهنده رشد تومورهای EGFR و بررسی اثرات درمانی آن در شرایط In Vivo

اینجانب مجید اسدی قلعهنی دانشجوی دوره دکترای تخصصی PhD دانشکده فنآوریهای نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران گواهی می‌نمایم که تحقیقات ارائه شده در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده و صحت و اصالت مطالب نگارش شده مورد تائید می‌باشد و در موارد استفاده از کار دیگر محققان به مرجع مورد استفاده اشاره شده است. بعلاوه گواهی می‌نمایم که مطالب مندرج در پایان‌نامه تاکنون برای دریافت مدرک توسط اینجانب یا فرد دیگری ارائه نشده است و هیچ بخش آن از کار سایر دانشجویان و محققین کپی نشده است. در تدوین متن پایان‌نامه دستورالعمل مصوب دانشگاه را به‌طور کامل رعایت کرده‌ام.

امضاء دانشجو:

تاریخ:

حق چاپ، نشر و مالکیت معنوی

۱. هر گونه کپی برداری از کل یا بخشی از پایان نامه فقط با اجازه استاد راهنما مجاز است.
۲. کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه علوم پزشکی تهران میباشد و بدون اجازه کتبی دانشگاه قابل واگذاری به غیر نیست.
۳. استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمیباشد.

تشکر و قدردانی

از **همسر** عزیزم که در این دوره تحصیلی با مهربانی و صبوری خود مرا یاری نمود...

از **خانواده** همیشه پشتیبانم که از ابتدا تا کنون حضور معنوی و عاطفیشان همواره حس میشد و میشود...

از **مادر بزرگوار همسرم** که حضورش قوت قلبم بود و هست ...

از جناب **آقای دکتر صدرالدینی**، استاد عزیز و محترم راهنما که مانند برادر بزرگتر و دوستی مشفق برای من بودند و هستند ...

از جناب **آقای پروفسور رسائی** استاد محترم راهنما که لطف و راهنمائی های ایشان هم در زندگی و هم در کار همانند پدری دلسوز و مشوقی عالی همواره شامل حال بنده بوده و هست ...

از سرکار خانم **دکتر رجبی و آقای دکتر خسروانی** که راهنمائی‌های ارزشمندشان در انجام این تحقیق همواره هدایتگر اینجانب بود ...

از دوستان و همکاران گرانقدرم، **آقای دکتر نامور** و آقایان خلیلی، آسیابانها، هدایتی، خداشناس، رنجبر، خوشطینت، جوانمردی، بنکدار و خانمها تویسرکانی، نافیان، سلیمی و جعفری که مرا در طول انجام پایان نامه همیاری نمودند...

و از کلیه کسانی که به نحوی در انجام این پروژه به من کمک نمودند...

سپاس و قدردانی نموده و کمال تشکر را دارم و از خداوند برا تمام این عزیزان کمال صحت و خوشبختی ابدی را خواستارم.

چکیده

نشان داده شده است که گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) نقش اساسی در رشد سلول توموری دارد و افزایش بیان آن در درصد قابل توجهی از تومورهای انسانی مشاهده شده است. تا به امروز روش‌های متعددی در درمان سرطان بر اساس هدف قرار دادن EGFR گسترش یافته است. در زمینه واکسن سرطان یکی از استراتژی‌ها ایمنی درمانی فعال علیه گیرنده می‌باشد. از طرف دیگر از آنجاییکه ذرات فاژی بسیار ایمونوژنیک میباشند در مطالعات سرطان به طور گستردهای در واکسیناسیون علیه تومور استفاده شدهاند. این ذرات می‌توانند به عنوان یک وسیله انتقال برای عرضه موثر آنتی‌ژن به سیستم ایمنی عمل کنند. همچنین نشان داده شده است که پپتید نمایش داده شده در سطح فاژ می‌تواند موجب القای پاسخ ایمنی در موش ایمن شده گردد. در این مطالعه پپتیدی نوترکیب متشکل از میموتوپ EGFR و دومین L2 طراحی شد (EM-L2) و اثرات پیشگیری و درمانی آن هم به صورت تنها و هم به صورت نمایش داده شده روی فاژ M13 ارزیابی گردید. برای این بررسی موش‌های C57BL/6 مدل توموری EGFR مثبت با استفاده از سلول‌های LL/2 ایجاد شدند. پپتید EM-L2 بیان و تخلیص شد و ذرات فاژی نوترکیب نمایش دهنده آن نیز تخلیص و تیتر سنجی گردیدند. در گروه درمانی ابتدا مدل توموری ایجاد شد و سپس موش‌ها با واکسن ایمنی‌زایی شدند در حالیکه در گروه پیش‌گیری، موش‌ها ابتدا ایمن گردیده و سپس تومور در آنها ایجاد شد. در هر دو گروه درمانی و پیش‌گیری از فاژ نمایش دهنده بتادومیکروگلوبولین موشی و PBS برای ایمنی‌زایی در گروههای کنترل استفاده شد. . پس از توموری شدن اندازه تومورها با کمک کولیس دیجیتال مورد سنجش قرار گرفت و همزمان میزان بقای گروهها نیز ارزیابی گردید. در گروه پیشگیری تفاوت معنادار در روند رشد تومور بین گروههای واکسن پپتیدی و فاژی با گروه PBS، و نیز بین واکسن پپتیدی با گروه فاژ کنترل مشاهده شد. در گروه درمانی تفاوت معنادار در روند رشد تومور بین گروههای واکسن پپتیدی و فاژی با گروههای کنترل مشاهده گردید. میتوان نتیجه گرفت که پپتید EM-L2 دارای خاصیت ضد توموری است.

کلمات‌کلیدی: سرطان، گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی، واکسن پپتیدی، واکسن فاژی، ایمنی درمانی

فهرست

۱) فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱) مقدمه ۱

۱-۲) معرفی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) ۱

۱-۲-۱) ژن EGFR ۱

۱-۲-۲) ویژگی های شیمیایی و ساختاری EGFR ۲

۱-۲-۳) لیگاندهای خانواده EGF ۴

۱-۳) پیام رسانی EGFR ۵

۱-۳-۱) مسیرهای پیام رسانی EGFR ۵

۱-۴) EGFR و سرطان ۹

۱-۵) اهداف ۱۰

۱-۵-۱) هدف اصلی: ۱۰

۱-۵-۲) اهداف فرعی ۱۰

۱-۶) ضرورت انجام پروژه ۱۰

۱-۷) فرضیات پایان نامه ۱۱

۱-۸) پرسشهای تحقیق ۱۱

۱-۹) پیشینه تحقیق و مطالعات انجام شده بر روی هموتوپ EGFR: ۱۲

۱-۱۰) نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده EM-L2 ..... ۱۳

۲) فصل دوم: مروری بر مطالعات ۱۷

۲-۱) انرژی درمانی سرطان ۱۷

۲-۲) واکسن‌های سرطانی ۱۷

۲-۲-۱) واکسن‌های پیش‌گیری کننده ۱۸
۲-۲-۲) واکسن‌های درمانی ۱۹
۲-۲-۳) واکسن‌های برپایه‌ی اسیدهای نوکلئیک ۱۹
۲-۲-۴) واکسن‌های برپایه‌ی وکتور ۲۱
۲-۲-۵) وکتورهای برپایه‌ی ویروس ۲۲
۲-۲-۶) وکتورهای باکتریایی ۲۲
۲-۲-۷) واکسنهایی با اساس پپتیدی یا پروتئین های نوترکیب: ۲۲
۲-۲-۸) واکسن‌های بر پایه‌ی سلول سرطانی ۲۴
۲-۲-۹) واکسن‌های بر پایه‌ی سلول‌های دندریتیک ۲۶
۲-۳) ICR61 و ICR62 ۲۸
۲-۴) نمایش فاژی ۲۸
۲-۴-۱) اساس نمایش فاژی ۲۸
۲-۴-۲) روشهای متنوع در نمایش فاژ ۲۹
۲-۵) فاژ M13 ۲۹
۲-۵-۱) پروتئین VIII ۳۱
۲-۵-۲) پروتئین III ۳۲
۲-۵-۳) روند آلوده شدن باکتری توسط فاژ ۳۲
۲-۵-۴) بسته بندی و خروج فاژ از باکتری ۳۳
۲-۶) فاژ کمکی ۳۴
۲-۷) بیان فاژی پروتئین و دومنهای پروتئینی ۳۵
۲-۷-۱) جداسازی آنتی بادیهای نوترکیب با تمایل بالا ۳۵
۲-۷-۲) تکامل جهت دار پروتئین ها ۳۶

۲-۷-۳) نمایش فاژی پپتید ۳۶
۲-۷-۳-۱) کتابخانه های نمایش پپتیدهای طبیعی ۳۷
۲-۷-۳-۲) کتابخانه های پپتیدی و پپتیدهای جایگزین آنتی بادیها ۳۷
۲-۷-۳-۳) کتابخانه های پتیدهای تصادفی و تعیین نقشه اپی توپی آنتی بادی های مونوکلونال، طراحی واکسن های پپتیدی ۳۸
۲-۸) استفاده از نمایش فاژی در ایمن سازی اختصاصی جایگاه ۳۸
۳) فصل سوم: مواد و روشها ۴۱
۳-۱) مواد ۴۱
۳-۱-۱) وکتور فاژمیدی ۴۱
۳-۱-۲) وکتور هلپر ۴۱
۳-۱-۴) سویه های باکتریایی ۴۲
۳-۱-۵) رده‌های سلول جانوری و انسانی ۴۲
۳-۱-۶) بافرها و محلول ها ۴۲
۳-۱-۶-۱) بافرهای الکتروفورز DNA ۴۲
۳-۱-۶-۲) بافرهای ELISA ۴۳
۳-۱-۶-۳) بافرهای SDS-PAGE ۴۳
۳-۱-۶-۴) محلول های رنگ آمیزی کوماسی بلو ۴۴
۳-۱-۶-۵) بافرهای وسترن بلات ۴۴
۳-۱-۷) آنتی بادیها ۴۴
۳-۱-۷-۱) ICR62 و ICR61 ..... ۴۴
۳-۱-۷-۲) IgG خرگوشی به دست آمده علیه مایموتوپ متصل به BSA: ۴۴
۳-۱-۸) محیط کشت های باکتری ۴۴

۳-۱-۹) محیط‌های کشت سلول جانوری ۴۵
۳-۱-۹-۱) محیط کشت DMEM ۴۵
۳-۱-۹-۲) روش تهیه تریپسین ۴۵
۳-۱-۹-۳) محیط انجماد ۴۶
۳-۱-۸) آنزیم‌ها ۴۶
۳-۱-۹) بافرهای لیز پروتیین ۴۶
۳-۱-۱۰) بافرهای مورد استفاده در تخلیص پروتیین ۴۶
۳-۱-۱۱) بافرهای ایمونوه یستوشیمی ۴۷
۳-۱-۱۲) وسایل ۴۸
۳-۱-۱۳) دستگاه‌ها ۴۸
۳-۲) روش‌ها ۴۸
۳-۲-۱) تهیه باکتری مستعد شده برای واکنش شیمیایی ۴۸
۳-۲-۲) انتقال فاژمید به باکتری با روش شیمیایی ۴۹
۳-۲-۳) تخلیص پلاسمید ۴۹
۳-۲-۴) ارزیابی کمی میزان پلاسمیدها ۵۰
الکتروفوزر پلاسمید تخلیص شده بر ژل آگازر ۵۰
۳-۲-۵) تایید وکتور فاژمیدی با استفاده از هضم آنزیمی ۵۰
۳-۲-۶) آماده کردن قطعه کلون شونده ۵۱
۳-۲-۷) بررسیهای In Silico ۵۱
۳-۲-۷-۱) بهینه سازی توالی ژن ۵۱
۳-۲-۷-۲) پیشبینی ساختار دوم mRNA ۵۱
۳-۲-۷-۳) بررسی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی پروتیین ۵۱

۳-۲-۷-۴) بررسی میزان آنتی‌ژن‌سرتیه ۵۲
۳-۲-۷-۵) پیش بینی اپیتوپ های سلول B در ECD-EGFR ۵۲
۳-۲-۷-۶) بررسی ساختار سوم ECD-EGFR در برهمکنش آن با آنتی‌بادی Cetuximab و پیش بینی ساختار سومEM-L2 ..... ۵۲
۳-۲-۸) سنتز شیمیایی ژن ۵۲
۳-۲-۹) پرایمرهای اختصاصی قطعه DNA کد کننده EM-L2 ..... ۵۳
۳-۲-۱۰) انتقال فاژمید M13-pAK8-VIII-EM.L2 به باکتری با روش شیمیایی و تایید سازه.. ۵۳
۳-۲-۱۰-۱) کلونی PCR ۵۳
۳-۲-۱۰-۲) PCR روی پلاسمید تخلیص شده از TG1 ترانسفورم شده ۵۴
۳-۲-۱۰-۳) هضم‌های آنزیمی روی سازه pAK8-GVO77.EM ۵۴
۳-۲-۱۰-۳-۱) هضم آنزیمی بوسیله Sfi1 ..... ۵۴
۳-۲-۱۰-۳-۲) هضم آنزیمی بوسیله Not1 ..... ۵۴
۳-۲-۱۰-۳) هضم دوگانه آنزیمی سازه ساخته شده با Sfi1/Not1 ..... ۵۴
۳-۲-۱۰-۴) تست تعیین توالی ۵۵
۳-۲-۱۱) گرفتن استوک از باکتری حاوی سازه pAK8-EM.L2-GVO ۵۵
۳-۲-۱۲) تکثیر و تخلیص فاژکمکی ۵۵
۳-۲-۱۳) تیتراسیون فاژکمکی ۵۶
۳-۲-۱۴) تکثیر و تخلیص نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده پپتید نوترکیب EM-L2 ..... ۵۷
۳-۲-۱۵) آلوده کردن باکتری E.coli TG1 با نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده پپتید نوترکیب EM-L2 تخلیص شده ۵۸
۳-۲-۱۶) تیتراسیون نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده میموتوپEGFR ۵۸
۳-۲-۱۷) اثبات نمایش میموتوپEGFR روی سطح نانوذرات شبه فاژی ۵۸
۳-۲-۱۷-۱) انجام تست الایزای فاژ ۵۸

۳-۲-۱۷-۲) انجام آزمون الایزا با آنتی‌بادی علیه تگ هیستیدینی روی فاژ نمایش دهنده پپتید EM-L2 ..... ۵۹
۳-۲-۱۸) سابکلونینگ ژن کد کننده پپتید EM-L2 در وکتور بیانی pET32a ۶۰
۳-۲-۱۸-۱) انجام واکنش PCR برای ژن EM-L2 ..... ۶۰
۳-۲-۱۸-۲) استخراج قطعه تکثیر شده از ژل آگارز ۶۰
۳-۲-۱۸-۳) هضم آنزیمی وکتور pET32a و آماده کردن آن برای کلونینگ ۶۱
۳-۲-۱۸-۴) انجام واکنش لیگاسیون بین وکتور pET32a خطی شده و ژن EM-L2 ..... ۶۱
۳-۲-۱۸-۵) ترانسفورماسیون محصول لیگاسیون به باکتری BL21 ..... ۶۲
۳-۲-۱۹) تایید ساب کلونینگ ژن مورد نظر در کلنی های ترانسفورم شده ۶۲
۳-۲-۱۹-۱) کلنی PCR ۶۲
۳-۲-۱۹-۲) تایید ساب کلونینگ با انجام واکنش هضم آنزیمی دوگانه به منظور خارج کردن قطعه مورد نظر ۶۲
۳-۲-۲۰) بیان ژن سنتتیک در میزبان E.coli و مشاهده آن در ژل SDS ۶۳
۳-۲-۲۰-۱) القای بیان ژن ۶۳
۳-۲-۲۰-۲) آماده سازی نمونه ۶۴
۳-۲-۲۰-۳) تعیین دمای بهینه برای القا ۶۴
۳-۲-۲۰-۴) تهیه ژل های SDS-PAGE ۶۵
۳-۲-۲۰-۵) رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو ۶۵
۳-۲-۲۰-۶) تخلیص پروتیین محلول با استفاده از ستون Ni-NTA ۶۵
۳-۲-۲۰-۶-۱) آماده سازی لیزات باکتری ۶۵
۳-۲-۲۰-۶-۲) متعادل سازی ستون ۶۶
۳-۲-۲۰-۶-۳) تخلیص پروتیین ۶۶
۳-۲-۲۰-۶-۴) شارژ مجدد ستون رزکل ۶۶

۳-۲-۲۰-۷) تخلیص پروتئین نامحلول با استفاده از ستون ژل ۶۷
۳-۲-۲۰-۷-۱) آماده سازی نمونه ۶۷
۳-۲-۲۰-۷-۲) محلول کردن پروتئین ۶۷
۳-۲-۲۰-۷-۳) رناتوراسیون و تخلیص ۶۸
۳-۲-۲۱) تایید پروتئین تخلیص شده پس از بیان در باکتری ۶۸
۳-۲-۲۱-۱) الایزا با آنتی‌بادی علیه تگ هیستیدینی روی پپتید EM-L2 بیان شده در باکتری ۶۸
۳-۲-۲۱-۲) وسترن بلات روی پروتئین تخلیص شده ۶۹
۳-۲-۲۲) ایمن‌سازی موش بمنظور بررسی پتانسیل ایمنی‌زایی آنتی‌ژن‌ها ۶۹
۳-۲-۲۳) جمع‌آوری سرم حیوانات ۷۰
۳-۲-۲۴) خونگیری از موشها و انجام الایزا جهت ایمن شدن موشهای BALB/cجهت بررسی پتانسیل ایمنی‌زایی آنتی‌ژنهای تزریق شده ۷۰
۳-۲-۲۵) بررسی وجود آنتی بادی علیه پپتید EM-L2 در موشهای BALB/C ایمن شده با فاژ نمایش دهنده EM-L2 ..... ۷۱
۳-۲-۲۶) کشت و آماده‌سازی سلول‌های LL/2 ..... ۷۱
۳-۲-۲۷) ایجاد مدل تومور EGFR در حیوانات ۷۲
۳-۲-۲۸) مارکتورینگ تومور ۷۳
۳-۲-۲۹) ایمن‌سازی موش‌های مدل توموری ۷۳
۳-۲-۲۹-۱) گروه پیش‌گیری ۷۳
۳-۲-۲۹-۲) گروه درمانی ۷۴
۳-۲-۳۰) بررسی نرخ بقا ۷۴
۳-۲-۳۱) ارزیابی وضعیت سیستم ایمنی موشهای C57BL/6 ..... ۷۵
۳-۲-۳۱-۱) آزمایش سنجش سایتوکاینی ۷۵
۳-۲-۳۲) تهیه بافت و رنگ آمیزی ۷۶

۳-۲-۳۳) ایمونوه یستوشیمی ۷۷
۳-۲-۳۳-۱) تهیه بافت در قالب پارافین ۷۷
۳-۲-۳۳-۲) تهیه بافت در OCT و تهیه Frozen section ۷۹
۳-۲-۳۴) آنالیز آماری ۷۹
۴) فصل چهارم: نتایج ۸۳
۴-۱) نتایج مربوط به مطالعات in silico ۸۳
۴-۱-۱) نتایج مربوط به‌نه سازی توالی ژن ۸۳
۴-۱-۲) پیش‌بینی ساختار دوم mRNA ۸۴
۴-۱-۳) بررسی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی پروتئین ۸۴
۴-۱-۴) بررسی میزان آنتی‌ژنسیته ۸۴
۴-۱-۵) بررسی ساختار سوم ECD-EGFR در برهمکنش آن با آنتی‌بادی Cetuximab و پیش بینی ساختار سوم EM-L2 ..... ۸۵
۴-۱-۶) پیش بینی اپیتوپ های سلول B در ECD-EGFR ۸۶
۴-۲) نتایج مربوط به تخلیص پلاسمید ۸۷
۴-۳) نتایج تایید وکتور فاژمیدی با استفاده از هضم آنزیمی ۸۷
۴-۳-۱) نتایج مربوط به هضم آنزیمی با EcoR1, Pst1 ، Pst1/EcoR1 ..... ۸۷
۴-۳-۲) نتایج مربوط به هضم آنزیمی با Sfi1 و Not1: ۸۸
۴-۴) نتیجه بررسی نرم‌افزاری مراحل کلونینگ و پیدا کردن ORF مربوطه پس از کلونینگ ۸۹
۴-۵) نتیجه انتقال فاژمید M13-pAK8-VIII-EM.L2 به باکتری با روش شیمیایی ۹۰
۴-۶) نتیجه کلنی PCR به منظور تایید فاژمید M13-pAK8-VIII-EM.L2: ۹۱
۴-۷) نتیجه PCR روی فاژمید M13-pAK8-VIII-EM.L2 تخلیص شده از TG1 ترانسفورم شده ۹۱
۴-۸) نتیجه هضم آنزیمی روی سازه M13-pAK8-VIII-EM.L2 با استفاده از آنزیمهای SfiI و NotI ۹۲

۴-۹) نتیجه مربوط به تعیین توالی..... ۹۲
۴-۱۰) نتیجه مربوط به الکتراسیون فاژکمکی..... ۹۳
۴-۱۲) نتیجه مربوط به الکتراسیون ذرات فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 و فاژ کنترل..... ۹۴
۴-۱۳) نتیجه مربوط به اثبات نمایش پپتید EM-L2 روی سطح نانوذرات شبه فاژی..... ۹۵
۴-۱۴) نتایج الایزا با آنتی‌بادی علیه تگ هیستیدین روی فاژ نمایش دهنده پپتید EM-L2..... ۹۵
۴-۱۵) نتایج مربوط به ساب‌کلون کردن ژن پپتید EM-L2 در وکتور بیانی به منظور تولید پپتید در باکتری ۹۶
۴-۱۵-۱) نتیجه واکنش PCR برای ژن EM-L2..... ۹۶
۴-۱۵-۲) نتیجه واکنش PCR روی کلونهای مثبت..... ۹۷
۴-۱۵-۳) نتیجه واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید کلونینگ ۹۹
۴-۱۶) القای بیان اولیه ژن ساب کلون شده در وکتور بیانی pET32a در میزبان باکتریایی..... ۱۰۰
۴-۱۷) نتایج مربوط به بهینه سازی دمای القا..... ۱۰۰
۴-۱۸) نتیجه مربوط به تخلیص پروتیین نو ترکیب با ستون Ni- NTA..... ۱۰۱
۴-۱۹) نتایج مربوط به تایید پپتید بیان شده شده در باکتری..... ۱۰۱
۴-۱۹-۱) نتیجه آزمون الایزا با استفاده از آنتی‌بادی علیه تگ هیستیدین روی پپتید EM-L2. ۱۰۲
۴-۱۹-۲) نتیجه آزمون وسترن بلات برای پپتید بیان شده..... ۱۰۲
۴-۲۰) نتایج مربوط به بررسی پتانسیل ایمنی‌زایی سازه‌های فاژی و پپتید تزریق شده..... ۱۰۴
۴-۲۱) نتایج مربوط به بررسی وجود آنتی بادی علیه پپتید EM-L2 در موشهای BALB/C ایمن شده با فاژ نمایش دهنده EM-L2..... ۱۰۴
۴-۲۲) نتایج حاصل از تومورزایی در موشهای C57BL/6..... ۱۰۵
۴-۲۳) نتایج حاصل از بررسی روند رشد تومور..... ۱۰۶
۴-۲۳-۱) نتایج مربوط به گروه پیش‌گیری..... ۱۰۶
۴-۲۳-۲) نتایج مربوط گروه درمانی..... ۱۰۷

۴-۲۴) نتایج بررسی نرخ بقا ۱۰۸
۴-۲۴-۱) نرخ بقا در گروه پیش‌گیری ۱۰۸
۴-۲۴-۲) نرخ بقا در گروه درمانی ۱۰۹
۴-۲۵) بررسی مقدار سایتوکاین‌های سرم موش‌ها در گروه درمانی و پیش‌گیری ۱۱۰
۴-۲۶) نتایج بررسی بافتی ۱۱۲
۴-۳۳) ایمونوهیستوشیمی به منظور بررسی $EGFR^+$ بودت تومور ۱۱۴
۵) فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۱۱۷
۵-۱) بحث ۱۱۷
۵-۲) نتیجه گیری ۱۳۰
۵-۳) پیشنهادات ۱۳۱
منابع ۱۳۲

فهرست جداول

جدول ۱-۱) لیگاندهای خانواده EGFR ۶

جدول ۱-۲) بیان EGFR در انواع سرطان ۱۰

جدول ۱-۳) توالیهای مرتبط با پپتید نوترکیب EM-L2 ..... ۱۴

جدول ۲-۱) برخی استراتژی‌های افزایش پتانسیل واکسن‌های DNA ۱۹

جدول ۲-۲) برخی از واکسن‌های RNA و پاسخ ایمنی آنها در فاز بالینی ۲۰

جدول ۲-۳) برخی واکسن‌های پپتیدی سرطان و فاز بالینی آنها ۲۳

جدول ۲-۴) واکسن‌های بر پایه‌ی سلول توموری و فاز بالینی آنها ۲۵

جدول۲-۵) مزایا و معایب بعخی از واکسنهای سرطان ۲۶

جدول ۲-۶) پروتئین‌های فاژ ۳۰

جدول ۳-۱) مقادیر مورد استفاده جهت انجام Colony PCR ۵۱

جدول ۳-۲) چرخه دمایی Colony PCR ۵۲

جدول ۳-۳) مقادیر واکنش هضم آنزیمی ژن بیانی ۵۹

جدول۳- ۴) مقادیر واکنش لیگاسیون ۶۰

جدول ۳-۵) مقادیر واکنش هضم آنزیمی تاییدی ۶۱

جدول ۳-۶) مقادیر مربوط به تهیه ژل تفکیک کننده ی SDS-PAGE ۶۳

جدول ۳-۷) مقادیر مربوط به تهیه ژل متراکم کننده ی SDS-PAGE ۶۳

جدول ۳-۸) تعداد موش‌ها و نحوه ایمن‌سازی آنها در گروه پیش‌گیری ۷۱

جدول ۳-۹) تعداد موش‌ها و نحوه ایمن‌سازی آنها در گروه درمانی ۷۲

فهرست شکلها

شکل ۱-۱) شکل شماتیک EGFR ۳

شکل ۱-۲) ساختار مونومر و دایمر دومن خارج سلولی EGFR ۳

شکل ۱-۳) لیگاندهای EGFR ۵

شکل ۱-۴) خلاصه ای از مسیرهای پیام رسانی EGFR ۹

شکل۱-۵) نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده EM-L2 ..... ۱۳

شکل ۲-۱) خلاصه‌ای از انواع روش‌های واکسیناسیون با استفاده از سلول‌های دندریتیک ۲۶

شکل ۲-۲) روش‌های متنوع در نمایش فاژ ۲۹

شکل ۲-۳) تصویر شماتیک فاژ M13 ..... ۲۹

شکل۲-۴) نحوه قرار گرفتن پروتئینهای ۸ در سطح فاژ ۳۱

شکل ۲-۵) وضعیت قرار گرفتن دومن‌های پروتئین ۳ ..... ۳۲

شکل۲-۶) نحوه اتصال فاژ به باکتری ۳۲

شکل۲-۷) ساختار شماتیک جایگاه بسته بندی فاژ در سطح باکتری ۳۳

شکل ۳-۱) فاژمید pAK8-GVO77 ..... ۳۹

شکل ۳-۲) وکتور بیانی pET32a ۴۰

شکل ۴-۱) بهینه سازی توالی قطعه DNA بیان کننده پپتیدEM-L2 ..... ۷۹

شکل ۴-۲) بررسی ساختار دوم mRNA ژن بهینه سازی شده با نرمافزار mfold ۸۰

شکل ۴-۳) ساختار دومین خارج سلولی EGFR ۸۱

شکل ۴-۴) ساختار پیش بینی شده ی پپتید EM-L2 ..... ۸۲

شکل ۴-۵) پیشبینی اپیتوپهای خطی قسمت خارج سلولی پروتئین EGFR ۸۲

شکل ۴-۶) الکتروفورز محصول تخلیص پلاسمید pAK8-GVO از باکتری ۸۳

شکل ۴-۷) نتایج الکتروفورز پس از هضم آنزیمی با Pst/EcoR1 ، EcoR1, Pst1 ..... ۸۴
شکل ۴-۸) نتایج الکتروفور مربوط به هضم آنزیمی با Sfi1 و Not1..... ۸۵
شکل ۴-۹) بررسی و صحت کلونینگ در وکتور pAK8-GVO..... ۸۵
شکل ۴-۱۰) سازه M13-pAK8-VIII-EM.L2..... ۸۶
شکل ۴-۱۱) کلنی های به دست آمده پس از ترانسفورمیشن..... ۸۶
شکل ۴-۱۲) نتیجه PCR روی M13-pAK8-VIII-EM.L2..... ۸۷
شکل ۴-۱۳) PCR روی M13-pAK8-VIII-EM.L2 تخلیص شده..... ۸۷
شکل ۴-۱۴) نتیجه هضم آنزیمی روی سازه M13-pAK8-VIII-EM.L2..... ۸۸
شکل ۴-۱۵) بررسی نتیجه تعیین توالی با نرم افزار DNAstar..... ۸۹
شکل ۴-۱۶) آلوده کردن باکتری E.coli TG1 با نانوذرات شبه فاژی..... ۹۰
شکل ۴-۱۷) تیتراسیون نانو ذرات شبه فاژی..... ۹۰
شکل ۴-۱۸) آزمون ELISA برای نشان دادن نمایش پپتید EM-L2 بر روی سطح ذرات فاژی..... ۹۱
شکل ۴-۱۹) جهت تایید وجود پپتید EM-L2 در سطح فاژ به کمک آنتیبادی علیه تگ هیستیدین..... ۹۲
شکل ۴-۲۰) تکثیر ژن یا DNA کد کننده پپتید EM-L2 با استفاده از PCR..... ۹۳
شکل ۴-۲۱) کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای استاندارد پروموتور T7..... ۹۴
شکل ۴-۲۲) کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن پپتید EM-L2..... ۹۴
شکل ۴-۲۳) هضم آنزیمی با استفاده از آنزیمهای BamHI و EcoRI..... ۹۵
شکل ۴-۲۴) بیان پروتیین نوترکیب..... ۹۶
شکل ۴-۲۵) بهینه سازی دمای القا..... ۹۷
شکل ۴-۲۶) تخلیص و تغلیظ پپتید EM-L2 بیان شده در باکتری..... ۹۸
شکل ۴-۲۷) آزمون الایزا با استفاده از آنتیبادی علیه تگ هیستیدین روی پپتید..... ۹۹

شکل ۴-۲۸) آزمون وسترن با استفاده از آنتیبادی علیه تگ هیستیدین روی پپتید ۹۹

شکل ۴-۲۹) نتایج تست الایزا در اثبات تولید آنتی‌بادی علیه نانوذرات شبه فاژی و پپتید..... ۱۰۰

شکل۴- ۳۰) الایزای مربوط به نتایج بررسی وجود آنتی بادی علیه پپتید..... ۱۰۱

شکل ۴-۳۱) نتایج توموزایی..... ۱۰۲

شکل ۴-۳۲) نمودارهای مربوط به روند رشد تومور در گروه پیش‌گیری..... ۱۰۳

شکل ۴-۳۳) نمودارهای مربوط به روند رشد تومور در گروه درمانی..... ۱۰۴

شکل۴-۳۴) بررسی نرخ بقا در گروه پیش‌گیری..... ۱۰۵

شکل ۴-۳۵) بررسی نرخ بقا در گروه درمانی..... ۱۰۶

شکل ۴-۳۶) اندازه‌گیری غلظت سایتوکاین‌های سرم در موش‌ها..... ۱۰۷

شکل ۴-۳۷) بررسی پاتولوژیک بافت تومور..... ۱۰۸

شکل ۴-۳۸) بررسی پاتولوژیک بافت‌های کبد و ریه در موش‌های گروه درمانی و پیش‌گیری..... ۱۰۹

شکل ۳-۳۷) ایمونوهیستوشیمی بافت تومور..... ۱۱۰

فصل اول

مقدمه

۱) فصل اول: مقدمه

۱-۱) مقدمه

سرطان بیماری‌ای است که در آن سلول‌های بدن در یک تومور بدخیم به طور غیر عادی تقسیم و تکثیر می‌شوند و بافت‌های سالم را نابود می‌کنند. سلول‌های سرطانی از سازوکارهای عادی تقسیم و رشد سلول‌ها جدا می‌افتند. علت دقیق این پدیده نامشخص است ولی عوامل ژنتیکی یا عوامل بیرونی هم‌چون ویروس و مواد سرطانزا در این امر موثر می‌باشد. در این بیماری سلولهای غیر طبیعی به صورت کنترل نشده تکثیر یافته و می توانند بافتهای مجاور را درگیر کنند. سلولهای سرطانی همچنین میتوانند از طریق جریان خون یا لنف به سایر نقاط بدن گسترش یابند. انواع سرطان شامل کارسینوم، سارکوم، لوسمی، لنفوم و سرطان دستگاه اعصاب مرکزی است[۱] .در یک جاندار سالم، همیشه بین میزان تقسیم سلول، مرگ طبیعی سلولی و تمایز، یک تعادل وجود دارد .سرطان شامل همه انواع تومورهای بدخیم می‌شود که در پزشکی آنها را بیشتر با نام نئوپلاسم می‌شناسند. احتمال بروز سرطان در سنین مختلف وجود دارد ولی احتمال بروز سرطان با افزایش سن زیاد می‌شود . سرطان باعث ۱۳٪ مرگ‌ها است و بر طبق گزارش انجمن بهداشت آمریکا ۷،۶ میلیون نفر بر اثر سرطان و در سال ۲۰۰۷ مرده‌اند[۲].

۱-۲) معرفی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR)

گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی[1] (EGFR/ErbB1/HER1) یک گیرنده تیروزین کینازی نوع ۱ می باشد. این گیرنده عضوی از خانوادی گیرنده های ErbB/HER می باشد که شامل ۳ عضو دیگر نیز هست: HER2 (HerbB2/neu)، HER3 (ErbB3) و HER4 (ErbB4) [۳-۵] این گیرنده ها از نظر توالی و عملکرد رابطه نزدیکی با یکدیگر دارند.

۱-۲-۱) ژن EGFR

ساختمان کامل اگزون و اینترون ژن EGFR انسانی توسط Haley و همکاران در سال ۱۹۸۷ گزارش شد. ژن گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی در روی کروموزوم 7p11-13 قرار داشته و از ۲۶ اگزون تشکیل شده است DNA این گیرنده دارای ۱۱۰ کیلوباز است. اگزون‌های ۱-۱۴ دومن خارج سلولی را کد کرده در حالیکه دومن موجود در عرض غشاء توسط اگزون ۱۵ کد می‌شود و اگزون‌های ۱۶-۲۶ کد کننده دومن داخل سلولی بوده که حاوی دومن تیروزین کینازی نیز می‌باشد. زیر دومن L1 (I) توسط

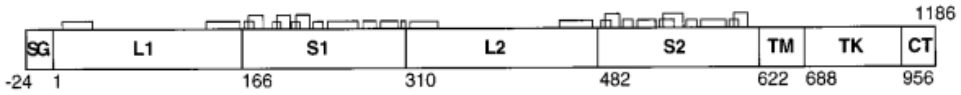
[1] Epidermal Growth Factor Receptor

اگزون‌های ۴-۱، S1 (II) بوسیله اگزون‌های ۷-۵، L2 (III) بوسیله اگزون‌های ۱۱-۸ و زیر دومن S2 (IV) بوسیله اگزون‌های ۱۴-۱۳ کد می‌گردد. نیمه اول ناحیه ´S اگزون ۱۵، دومن موجود در عرض غشاء را کد می‌کند. اگزون‌های ۲۲-۱۶ کد کننده ناحیه تیروزین کینازی داخلی گیرنده EGFR می‌باشند[۳]. ناحیه انتهایی دومن تیروزین کینازی که درگیر در نفوذ کلسیم و انترنالالیز شدن گیرنده است CAIN نامیده می‌شود. دومن CAIN از دو ناحیه کوچکتر تشکیل شده که توسط اگزون‌های ۲۴-۲۳ کد می‌شود. اگزون انتهایی یا اگزون ۲۶ حاوی یک ناحیه بزرگ ترجمه نشده با دو منطقه پلی آدینله شده فرعی می‌باشد[۳].

۱-۲-۲) ویژگی های شیمیایی و ساختاری EGFR

EGFR یک پروتئین با وزن مولکولی ۱۷۰ کیلودالتن است. پیش ساز آن دارای ۱۲۱۰ اسید آمینه می باشد که پس از حذف پپتید نشانه [2] (۲۴ اسید آمینه)، واجد ۱۱۸۶ اسید آمینه خواهد بود [۵]. این پروتئین حاوی بخش قندی زیادی با پیوند های N- و فاقد پیوند های O- می باشد. بخش کربوهیدراتی مولکول تقریبا ۲۰٪ از وزن مولکولی آن را شامل می شود. مطالعات اسپکترومتری وزنی[3] EGFR تخلیص شده از سلول های A431 نشان می دهد که از ۱۱ جایگاه بالقوه N-گلیکوزیلاسیون آن، ۸ جایگاه آن گلیکوزیله بوده و یک سایت به صورت نسبی گلیکوزیله بوده و دو جایگاه دیگر فاقد ترکیبات کربوهیدراتی می باشد [۶]. ناحیه خارج سلولی در EGFR به ۴ زیردومن تقسیم میشود که به صورت I-IV نمایش داده می شوند [۷] و (شکل ۱-۱). زیردومن های I و III که به ترتیب به صورت L1 و L2 نیز نمایش داده میشوند، از خانواده تکرارهای غنی از اسید آمینه لوسین بوده و شبیه به دومن های یافت شده در خانواده گیرنده انسولین می باشند. قبل از کریستالیزه کردن گیرنده، مشخص شده بود که زیردومن های I و III در اتصال لیگاند نقش ایفا میکنند. با این حال مشخص شده است که زیردومن III نقش اصلی را در این امر به عهده دارد چون این زیردومن به صورت جدا توانایی اتصال به EGFR را با تمایل مشابه به EGF و TGF-α داراست [۸]. زیردومن های II و IV که به ترتیب به صورت S1 و S2 نیز نمایش داده میشوند، غنی از ریشههای اسید آمینه سیستئین بوده و حاوی پیوندهای دی سولفیدی می باشند. در مولکول EGFR در مجموع ۲۵ پیوند دی سولفیدی دیده می شود که عمدتا در زیردومن های II و IV متمرکز هستند (شکل ۱-۱) [۸].

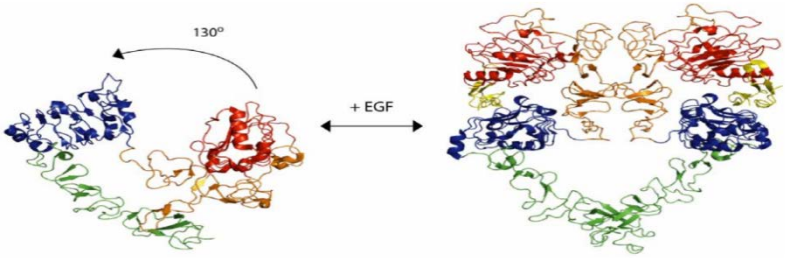
[2] Signal peptide
[3] Mass specterometery



شکل ۱-۱) شکل شماتیک EGFR. L1،S1، L2 و S2 زیردومن های دومن خارج سلولی. TM دومن عرض غشا، TK دومن تیروزین کینازی و CT دم انتهای C.

دومن خارج سلولی[4] EGFR در هر دو فرم مونومر و دایمر کریستالیزه شده که در مرجع [۹] مرور شده است. مونومر به فرم افسار شده یا خودمهارکننده وجود دارد [۱۰]. در این فرم زیردومن های II و IV با یکدیگر تماس داشته و پروتئین را به صورت مهار شده نگه می دارند(شکل ۱-۲ سمت چپ). با این حال در ساختار دایمر EGFR متصل به لیگاند EGF[5] و یا TGF-α[6] مشخص شده که برای اتصال لیگاند به گیرنده با یک چرخش ۱۳۰ درجه‌ای زیردومن‌های I و II زیردومن‌های I و III به یکدیگر نزدیک شده ومی‌توانند به لیگاند متصل شوند (شکل ۱-۲ سمت راست). ایجاد فرم دایمر صرفاً با تماس گیرنده و بدون دخالت لیگاند انجام می پذیرد که این امر از طریق تماس های مکرر بین دو بازوی دایمر کننده زیردومن II انجام می پذیرد. فرم دایمر به نسبت ۲:۲ گیرنده: لیگاند وجود دارد.

با بررسی کریستال‌های مونومر و دایمر EGFR یک مدل برای فعال سازی EGFR پیشنهاد شده است[۹]. در این مدل، مونومر ها عمدتا در فرم خودمهارکننده وجود دارند که در آن بازوی دایمر کننده زیردومن II پنهان شده و بنابراین از دایمر شدن گیرنده جلوگیری می شود. مونومر در تعادل بین دو حالت خودمهار کننده و فرم بازکه شبیه حالت دایمر می باشد است. با اتصال لیگاند بین زیردومن های I و III فرم باز پایدار شده و بازوی دایمر کننده زیردومن II را در معرض قرار می دهد و بنابراین امکان دایمر شدن به وجود می آید.



شکل ۱-۲) ساختار مونومر و دایمر دومن خارج سلولی EGFR. چپ: مونومر دومن خارج سلولی EGFR برای اتصال به EGF نیاز به یک چرخش ۱۳۰° زیردومن های I و II دارد. راست: ساختار دایمر در اتصال به EGF [۱۰].

[4] Extra cellular domain
[5] Epidermal Growth Factor
[6] Transformation Growth Factor α

در ساختمان EGFR یک دومن عرض غشایی، یک ناحیه تیروزین کینازی و یک دم انتهای C[7] نیز دیده می شود. به دنبال فعال شدن گیرنده و فعال شدن دومن تیروزین کینازی آن، چند ریشه تیروزین در ناحیه دم انتهای C- فسفریله می شوند. با بررسی کریستال دومن تیروزین کینازی مدلی برای فعال سازی آن پیشنهاد شده است. در این مدل، با دایمریزه شدن گیرنده لوب انتهای C- دومن تیروزین کینازی در یک گیرنده به دومن نامتقارن خود در گیرنده دیگر متصل شده و منجر به فعال سازی این دومن می شود.

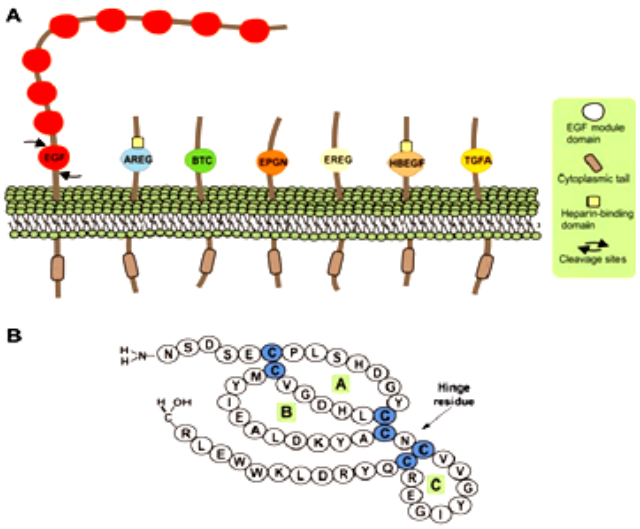
۱-۲-۳) لیگاندهای خانواده EGF

در مجموع ۹ لیگاند در خانواده EGF شناسایی شده است که مشتمل بر این موارد میباشد: فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد تغییر شکل دهنده آلفا (TGF-α)، فاکتور رشد شبیه به EGF متصل شونده به هپارین (HBEGF[8])، آمفیرگیولین (AREG[9])، بتاسلولین (BTC[10])، هیرگیولین (HREG[11])، نورگیولین (NREG[12])، اپی رگیولین (EREG[13]) و اپیژن (EPGN[14]). بعضی از این لیگاندها منحصر به یک عضو خانواده می باشند مانند EGF که منحصرا لیگاند EGFR می باشد و برخی نیز بین دو عضو خانواده مشترک می باشند مانند HB-EGF که به هر دوی EGFR و HER4 متصل می شود. تا کنون برای HER2 هیچ لیگاندی شناسایی نشده است[۱۱-۱۲].

شباهت توالی پروتئینی بین لیگاند های مذکور کم بوده و در حد ۲۵٪ می باشد. اما این لیگاند ها ویژگی های مشترکی دارند. همه این لیگاند ها به صورت پروتئین های عرض غشایی نوع ۱ سنتز می شوند که مشتمل بر یک ناحیه انتهای N-، واحد EGF، یک ناحیه مجاور غشا، یک دومن عرض غشایی و یک بخش انتهای C- می باشند. EGF از نظر داشتن ۹ واحد EGF منحصر به فرد می باشد. هر چند که تنها واحد مجاور به غشا از نظر عملکرد فعال است. HBEGF و AREG واجد یک دومن متصل شونده به هپارین نیز می باشد (شکل ۱-۳ A) [۱۳] . مهمترین وجه مشترک لیگاند های خانواده EGF واحد EGF است. این واحد مسئولیت اصلی برای اتصال به گیرنده را دارد و مشتمل بر ۴۰ اسید آمینه دارای ۶ اسید آمینه سیستئین است. سه پیوند دی سولفیدی به ترتیب بین سیستئین های ۱و۳،۲ و ۴ و ۵ و ۶ وجود دارد که منجر به تشکیل حلقه های A و B وC می شود. تک اسید

[7] Carbocyl terminal
[8] Heparin Binding EGF-Like Growth Factor
[9] Amphiregulin
[10] Betacellulin
[11] Heregulin
[12] Neuregulin
[13] Epiregulin
[14] Epigen

آمینه بین حلقه های B و C به عنوان ناحیه لولا شناخته می شود چرا که عقیده بر این است که دو بخش پروتئین می توانند در حول آن به عنوان یک لولا حرکت کنند (شکل ۱-۳ B) [۱۳].



شکل ۱-۳) لیگاندهای EGFR. A: پیش ساز لیگاندها در اتصال به غشا. B: واحد EGF [۱۳].

در جدول۱-۱ نیز انواع لیگاندهای خانواده EGFR آورده شده است.

۱-۳) پیام رسانی EGFR

در پی اتصال لیگاندهای مذکور به هر یک از گیرنده های عضو خانواده ، گیرنده با همتای خود و یا عضو دیگری از خانواده تشکیل هومودایمر و یا هترو دایمر می دهد. این امر منجر به فعال سازی دومن تیروزین کینازی در بخش درون سلولی EGFR شده که منجر به راه اندازی آبشارهای پیام رسانی سلولی می‌شود. نتیجه خالص این امر رشد، تمایز، تکثیر و مهاجرت سلولی خواهد بود.

۱-۳-۱) مسیرهای پیام رسانی EGFR

مسیرهای پیام رسانی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی مشابه دیگر گیرنده‌های تیروزین- کینازی می‌باشد. این مسیرها شامل آنهایی است که درگیر در فعال شدن فسفولیپاز C-γ و آبشارهای فرودست وابسته به PKC[15] و کلسیم، فعال شدن ras و بدنبال آن فعال شدن MAP Kinase[16] وسایر GTPaseهای کوچک مانند rac,rho، STAT[17] های چندگانه و پروتئین G هتروتریمریک و هم چنین موارد دیگر که کمتر توسعه یافته شامل فسفاتیدیل اینوزیتول کیناز و فسفولیپاز D و پروتوانکوژن

[15] Protein kinase C
[16] Mitoge activated protein kinase
[17] Signal of transducer and activator of transcription

سیتوپلاسمیک تیروزین کیناز proto-oncogen (cytoplasmic tyrosine kinase)src می‌باشد [۱۴-۱۵]. مشخص شده است که یکسری از این مسیرهای پیام رسانی لازم بوده ولی برای یک پاسخ ویژه و

جدول ۱-۱) لیگاندهای خانواده EGFR

Ligand	Receptors			
	ErbB-1	ErbB-2	ErbB-3	ErbB-4
EGF	+	-	-	-
TGF-α	+	-	-	-
HB-EGF	+	-	-	+
amphiregulin	+	-	-	-
betacellulin	+	-	-	+
epigen	+	-	-	-
epiregulin	+	-	-	+
neuregulin 1	-	-	+	+
neuregulin 2	-	-	+	+
neuregulin 3	-	-	-	+
neuregulin 4	-	-	-	+

اختصاصی کافی نمی‌باشند. فسفولیپاز C-γ موجب هیدرولیز فسفاتیدیل اینوزیتول ۲- فسفات گشته(فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ و ۵ بی فسفات) و هم چنین فعال شدن پروتئینهای actin-modifying برای تحریک با واسطه EGFR لازم بوده و اگر مسیر پیام رسانی MEK[18] متوقف گردد این حرکت متوقف می‌گردد. با اتصال لیگاند به گیرنده یکسری از مسیرهای پیام رسانی فعال می‌شود، اما برای تعدادی از این مسیرها که هنوز نتایج بیولوژیکی تعیین نشده است. فسفولیپاز C-γ نه تنها اثر مثبت بر روی حرکت سلول بواسطه آزاد شدن پروتئین‌هایی (مانند گلسولین، پروفیلین و کوفیلین) داشته بلکه هم چنین از طریق پروتئین کیناز C و حوادث وابسته به کلسیم و اثر فیدبک منفی تضعیف کننده EGFR نیز عمل می‌کند، PKC گیرنده EGF را در ترئونین ۶۵۴ فسفریله کرده بدین ترتیب موجب

[18] Mitogen-extracellular-signal regulated kinase kinase

قطع فعالیت محور ras-MAP kinase می‌شود. و در این زمان فعالیت متناوب Erk موجب حرکت در سلول گشته و اثر تکثیری آن کاهش پیدا می‌کند[۱۴-۱۶]

از جمله پاسخهای چندگانه مسیرهای erk MAP کینازها تکثیر و مهاجرت سلولی است. گیرنده فعال شده موجب، فعال شدن آبشارهای کینازی می‌گردد که در نهایت عضوهای خانواده MAP Kinase را فعال می‌کند. این MAP kinase ها به هسته منتقل گردیده و موجب فعال شدن فاکتورهای رونویسی گشته و بدین ترتیب روی پاسخ‌های رشد سلول اثر می‌گذارد. یک مسیر کاملاً مشخص که توسط گیرنده EGF فعال می‌شود مسیر Ras/extra cellular signal-regulated kinase می‌باشد. در محل تجمع کمپلکسهای Grb2-Sos-Ras در غشاء سلول یک آبشار پی در پی فسفریلاسیون Raf، MEK، و سپس Erk اتفاق می‌افتد. فعال شدن خانواده Erk از MAP kinase در نهایت می‌تواند موجب القاء سیکل رشد سلول گردد. چندین مسیر موازی این آبشار کینازی در پستانداران شناخته شده است که شامل مسیر C-Jun N-terminal kinase kinase که همچنین به نام Stress-artivated protein نیز نامیده می‌شود، می‌باشد.

فعال کننده‌های ضروری JNK بطور کلی به نام MAP kinase kinase شناخته می‌شود که MKK4 و MKK7 می‌باشند. اگرچه هر دو مسیر JNK و ERKs با یک الگو مشابه فعال می‌شوند ولی آنها مسیرهای مشخص و معین پاسخ دهی مثبت به تحریکات خارج سلولی دارند[۱۴-۱۵].

Erk بطور قابل توجه در مقابل میتوژنها فعال می‌گردد در حالیکه JNK بیشتر در مقابل سیتوکینها و استرسهای محیطی فعال می‌گردد. فعالیت JNK در پاسخ به استرس در ارتباط با ابقاء توقف سیکل سلولی و مرگ برنامه ریزی شده می‌باشد.

همانطور که ذکر شد در طی اتصال لیگاند به گیرنده، گیرنده دایمر گشته و نواحی دارای باقیمانده‌های تیروزین کینازی فسفریله می‌شود، که این نواحی به عنوان یک سری مناطق لنگری برای اتصال پروتئین‌هایی که حاوی دومنهای قابل اتصال به فسفوتیروزین هستند عمل می‌کند. دو نوع از این دومنها تشخیص داده شده است دومن SH2 و دومن PTB .

تعدادی از پروتئین های حاوی SH2 دومن که با گیرنده EGF واکنش می‌دهند شامل Shc، Grb2، فسفولیپاز $\gamma - c$، GAP، αSTAT1 ، STAT3 و فسفوتیروزین فسفاتاز SH-PTP2 می‌باشند

[19] Mitogen-activated protein Kinase
[20] Janus kinase
[21] Apoptosis
[22] Src homology 2
[23] Phosphotryrosine binding

پروتئین آداپتور shc4 هم چنین حاوی یک دومن PTB است که به نظر می‌رسد مسئول واکنش اصلی آن در تیروزین ۱۱۴۸ می‌باشد. مشخص شده است که هر دو پروتئین های shc و Grb2 برای فعالیت ras در محل فعال شدن رسپتور مورد نیاز می‌باشند. Grb2 می‌تواند مستقیماً به فسفوتیروزین حاضر در سکانس حفظ شده YLN متصل گردد یا بطور غیرمستقیم توسط shc فسفوریله شده متصل گردد[۱۴].

پروتئین‌های آداپتور که باعث تداخلات پروتئین- پروتئین از طریق موتیفهای اختصاصی می‌گردند، هم چنین موجب یک ارتباطی مابین مولکولها از طریق شبکه پیام رسانی و پروتئین های تیروزین کینازی می‌شوند. یکی از پروتئین‌های آداپتور Grb2 است که نقش اصلی در فعال کردن Ras small G prorein دارد. این آداپتور پروتئین‌ها اغلب حاوی یک تعدادی موتیف می‌باشند که تداخلات پروتئین- پروتئین را میانجیگری می‌کنند.

دومن SH2 از موتیفهای پروتئینی Grb2 است که به تیروزین فسفریله اختصاصی حاوی سکانسهای دیکته کننده الگوی اتصالی ویژه، متصل می‌گردد. دومن SH3 از Grb2 به سکانسهای غنی از پرولین متصل می‌گردد.

وقتی دو اسید آمینه سرین فسفریله می‌شود، MEK کاملاً فعال می‌گردد و وقتی یک اسید آمینه سرین فسفریله شود بطور نسبی فعال می‌شود. MEK که MAP kinase kinase نیز نامیده می‌شود دو ایزوفرم دارد که سکانسشان ۸۰٪ با هم مشابهت دارد. MEK وقتی فعال شد می‌تواند موجب فعال کردن MAP kinas یا Extra cellular-signal regulated kinase گردد. فعال شدن از طریق فسفریلاسیون پشت سر هم (Tandem) در باقیمانده‌های تیروزین و ترئونین اتفاق می‌افتد. دو ایزوفرم ۱ و ۲ بیشتر از Erk وجود دارد که پروتئینهایی بترتیب ۴۴ و ۴۲ کیلودالتون بود، و ۹۰٪ با هم مشابهت دارند.

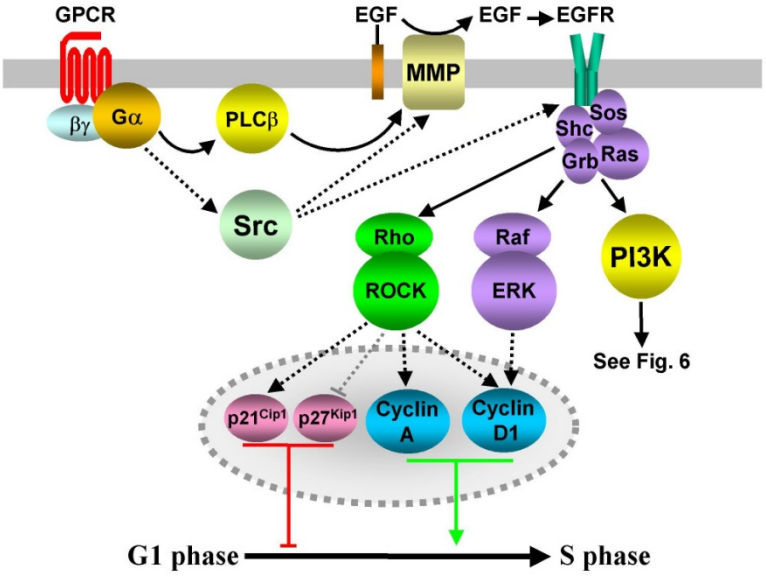
ERK بعنوبه خود باعث فعال شدن خانواده ETS[24] از فاکتورهای رونویسی گشته، و مشخص شده است که ظاهراً اینها توانایی فعال کردن ژنهای معین رونویسی را داشته باشند.

Transcription factor ETSها پروتئین‌های Helix-turn-helix می‌باشند. علاوه بر Erk، MAP kinase های دیگری نیز وجود دارد که متعلق به آبشار MAP kinase می‌باشد اما هر دو فعال کننده بالادست[25] و پذیرنده فرودست[26] آنها با Erk متفاوت می‌باشد از جمله اینها P38 MAP و Stress Activator Protein Kinase (SAPK) می‌باشند که ثابت شده که تنظیم کننده پاسخ سلولها به یک تعداد زیاد تحریکات خارج سلولی شامل میتوژنها، سیتوکینها و اشعه UV می‌باشند. انتهای

[24] E-twenty six
[25] Up stream activator
[26] Down stream effector

فعالیت JNK فسفریلاسیون فاکتورهای رونویسی اختصاصی c.jun c.fos است. دوتایی شدن c.jun, c.fos تشکیل فاکتور رونویسی AP-1[27] می‌دهد. این دوتایی شدن تحت اثر اشعه UV، استرسهای محیطی و فعال شدن PKC تشکیل می‌شود که به سکانس هدف خود متصل می‌گردد و باعث افزایش رونویسی از یکسری ژنهای خاص می‌گردد [۱۴-۱۵, ۱۷].

در شکل ۱-۴ خلاصه ای از مسیرهای پیام رسانی EGFR نمایش داده شده است.



شکل ۱-۴) خلاصه ای از مسیرهای پیام رسانی EGFR

۱-۴) EGFR و سرطان

فاکتورهای رشد و گیرنده‌های آن نقش مهمی در تنظیم رشد و روندهای نئوپلاستیک در سلول ایفا می‌کنند.

EGF یک هدف منطقی در درمان سرطان می باشد. فعال شدن EGFR روند های مورد نیاز برای رشد و پیشرفت سرطان را ارتقا می دهد که مشتمل بر تکثیر و بلوغ، رگ زایی تهاجم، متاستاز و ممانعت از آپوپتوز می باشد. بنابراین ممانعت از پیام رسانی EGFR می تواند منجر به ممانعت از رشد، تهاجم، رگ زایی و آپوپتوز شده و حتی آپوپتوز را نیز القا کند[۱۸-۲۱].

دیده شده است که گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی و لیگاندهای آن در تعدادی از انواع تومورها افزایش بیان داشته و یا درگیر در حلقه‌های رشد اتوکرین می‌باشند. EGFR در ۵۰٪-۳۰ تومورهای جامد بیان

[27] Activating protein1

می شود که مشتمل بر کارسینومای سر و گردن، کلیه، ریه، کولون،تخمدان، پروستات، گلیوما، پانکراس و مثانه می باشد (جدول ۱-۲) [۲۱].

جدول ۱-۲) بیان EGFR در انواع سرطان

Tumor Type	Percentage of Tumors Expressing EGFR
Head and neck	80 – 100
Renal	50 – 90
Lung	40 – 80
Breast	14 – 91
Colon	25 – 77
Ovarian	35 – 70
Prostate	39 – 47
Glioma	40 – 63
Pancreas	30 – 50
Bladder	31 – 48

Adapted from Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer.* 2002;94:1593-1611. Copyright © 2002 American Cancer Society. Reprinted by permission of Wiley-Liss, Inc, a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc.

چندین مکانیزم وجود دارد که بوسیله آن سلول های سرطانی می تواند پیام رسانی EGFR را از حالت کنترل شده خارج کنند که مشتمل بر حلقه اتوکرین[28]، افزایش بیان گیرنده و جهش های فعال کننده و گریز از تجزیه گیرنده بوسیله آندوسیتوز می باشد [۲۲].

این مطالعات نشان میدهد که EGFR یک گلیکوپروتئین مناسب جهت هدف گیری سرطانهایی می - باشد که در آنها این ملکول نقش ایفا میکند.

۱-۵) اهداف

۱-۵-۱) هدف اصلی:

طراحی و ساخت نانوسازههای شبه فاژی نوترکیب نمایش دهنده پپتیدهای موثر در درمان تومورهای EGFR+ و بررسی اثرات آن در شرایط In Vivo

۱-۵-۲) اهداف فرعی

۱. طراحی یک پلی پپتید فیوژن نوترکیب.

۲. نمایش دادن پلی پپتید فیوژن نوترکیب ساخته شده در سطح فاژ M13 با روش ۸+۸.

۳. ارزیابی اثرات فاژ ساخته شده در موشهای دارای تومور EGFR+

۱-۶) ضرورت انجام پروژه

[28] Autocrine

سرطان مهمترین علت مرگ در سراسر جهان بعد از بیماریهای قلبی و عروقی بوده و بار مسئولیت جهانی در مبارزه با آن همچنان در حال افزایش می‌باشد . از جمله راههای نسبتا جدید درمان این بیماری، پپتید درمانی و فاژ درمانی میباشد. در ادامه روند تحقیقات در مورد درمان سرطان در این پایان نامه قرار است اثر ایمنی درمانی فعال اختصاصی حاصل از نانوسازه فاژی ساخته شده بررسی گردد. سیستم ایمنی موش با استفاده از این سازه به گونه ای تحریک میشود که منجر به اثر روی تومور میگردد. آنتیبادیهای تولید شده علیه پپتیدهای نمایش داده شده در سطح فاژ میتوانند به EGFR متصل و مانع از اتصال لیگاند به آن شوند.

۱-۷) فرضیات پایان نامه

۱ -تزریق پلیپپتیدی که متشکل از میموتوپ EGFR و دومین L2 خارج سلولی EGFR باشد در ادجوانت فروند میتواند منجر به تولید آنتیبادی در موش گردد.

۲ -تزریق فاژ نمایشدهنده این پلیپپتید به موش نیز منجر به تولید آنتیبادی علیه پپتید و فاژ میگردد.

۳ -پلیپپتید و فاژ نمایش دهنده پلیپپتید مذکور در موشهای دارای تومور EGFR+ خاصیت مهارکنندگی (درمانی و پیشگیری کنندگی) خواهد داشت.

۴ -خاصیت ضد توموری فاژ نمایش دهنده پلیپپتید نسبت به پلیپپتید تنها بیشتر است.

۱-۸) پرسشهای تحقیق

۱ -آیا میتوان پلیپپتیدی طراحی کرد که برای تومورهای EGFR مثبت خاصیت مهار کنندگی داشته باشد؟

۲ -آیا تزریق این پلیپپتید به موش منجر به تولید آنتیبادی میشود؟

۳ -آیا این پلیپپتید میتواند دارای خاصیت پیشگیری کنندگی باشد؟

۴ -آیا این پلیپپتید میتواند دارای خاصیت درمانی باشد؟

۵ -آیا میتوان این پلیپپتید را در سطح فاژ M13 به همراه پروتئین VIII نمایش داد؟

۶ -آیا تزریق فاژ نمایشدهنده این پلیپپتید به موش منجر به تولید آنتیبادی علیه فاژ و پپتید میشود؟

۷ -آیا نمایش این پلیپپتید در سطح فاژ رشتهای میتواند اثرات فرضی ضد توموری فوق را افزایش دهد؟

۱-۹) پیشینه تحقیق و مطالعات انجام شده بر روی میموتوپ EGFR:

همان طور که از اسم آن پیداست، می‌موتوپ EGFR پپتیدی است که ساختاری از ملکول EGFR را تقلید میکند و آنتی‌بادی تولید شده علیه آن میتواند با EGFR واکنش دهد. این پپتید توسط تیم تحقیقاتی دکتر رسایی و در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به دست آمد. برای این کار با استفاده از کتابخانه پپتیدی تصادفی ۱۲ اسید آمینه‌ای پپتیدی به دست آمد که دارای خاصیت اتصالی به آنتی‌بادی ICR-62 بود ولی توالی آن در ساختمان EGFR وجود نداشت از این رو آن را می‌موتوپ EGFR نامید. توالی این پپتید در جدول ۱-۳ آمده است. سپس این پپتید به صورت شیمیایی سنتز و با BSA کونژوگه شد و از آن برای تولید آنتی بادی علیه EGFR استفاده شده است. نتایج نشان داد که آنتی بادی های خرگوشی حاصل از تزریق میموتوپ متصل به BSA با EGFR واکنش متقاطع دارد و رشد سلول‌های بیان کننده EGFR (A431) را در شرایط In Vitro مهار می‌کند. [۲۳].

در ادامه اسدی و همکاران ژن کد کننده این پپتید را در وکتور فاژمیدی pAK8-GVO77 کلون کرد و بر روی پروتئین ۸ فاژ M13 به نمایش در آورد و پس از تزریق به موش، پاسخ ایمنی ایجاد شده را بررسی کرد که نشان میداد به مقدار کمی آنتی‌بادی علیه می‌موتوپ ایجاد شده است. نتایج تزریق فاژ نمایش دهنده میموتوپ EGFR به مدل موشی نشان داد که این سازه اثر درمانی بهتری نسب به اثر پیشگیری کننده دارد [۲۴].

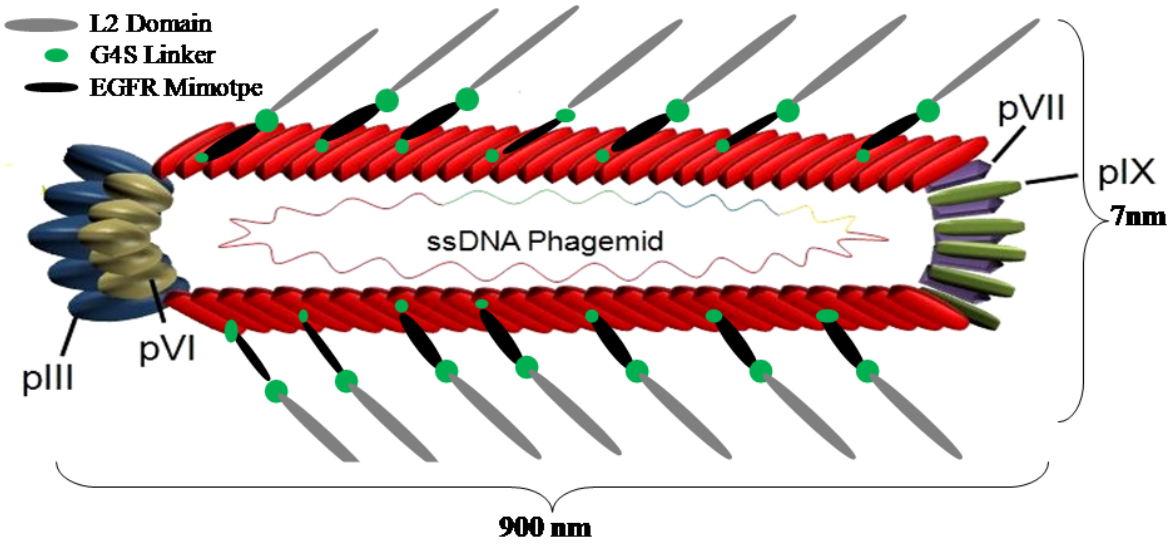
در ادامه به منظور مقایسه پتانسیل ذرات فاژی نمایش دهنده یک تکرار می‌موتوپ (1M)، با ذرات فاژ نمایش دهنده یک تکرار سه تایی پشت سرهم [29] از این می‌موتوپ EGFR (3M) در ایمنی‌زایی و همچنین اثر واکسن فاژی نمایش دهنده می‌موتوپ EGFR بر روی رشد تومور در شرایط In Vivo، فاژی توسط جوانمردی و همکاران طراحی شد که سه تکرار از میموتوپ را نمایش میداد. نتایج حاصل ار بررسی این سازه در In Vivo، برتری سازه دارای سه تکرار نسبت به سازه تک تکرار در مهار تومور $EGFR^{+}$ را نشان داد [۲۵].

در این مطالعه و با پیش فرض قویتر کردن خاصیت ضد توموری واکسن فاژی، دومین L2 قسمت خارج سلولی ملکول EGFR به واسطه لینکر G4S به میموتوپ EGFR فیوز شد تا پپتید نوترکیب EM-L2 حاصل شود. سپس این پپتید روی فاژ خطی M13 به هراه پروتئین ۸ فاژی نمایش داده شد تا یک واکسن جدید ساخته شود (شکل۱-۱۳).

[29]- triple tandem repeat

۱-۱۰) نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده EM-L2

در این پایان‌نامه با استفاده از سیستم ۸+۸ نمایش فاژی، پپتید EM-L2 به صورت فیوژن در انتهای آمینی پروتئین ۸ فاژی به نمایش درآمده است. قطر این ذرات حدود ۶/۵ نانومتر و طول آنها بسته به میزان ژنوم بسته‌بندی شده می‌تواند تا ۹۳۰ نانومتر امتداد یابد. (شکل۱-۵) لازم به ذکر است که ژنوم موجود در این ذرات متعلق به وکتور فاژمیدی بوده و ذرات توانایی آلوده کردن باکتری را دارند اما بدون کمک فاژ کمکی توانایی تکثیر و بسته‌بندی مستقل را ندارند، لذا نمی‌توان آنها را فاژهای کامل به حساب آورد.



شکل۱-۵) نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده EM-L2، قسمت سبز رنگ میموتوپ و قسمت بنفش رنگ ساب دومین L2 از EGFR است (عکس توسط نگارنده طراحی شده است).

جدول ۱-۳) توالیهای مرتبط با پپتید نوترکیب EM-L2

	Name	Sequence
1	Mimotpe	QHYNIVNTQSRV
2	L2 Domain of EGFR	CTAISGDLHILPVAFKGDSFTRTPPLDPRELEILKTVKEITGFL LIQAWPDNWTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVGLNITS LGLRSLKEISDGDVIISGNRNLCYANTINWKKLF
3	EM-L2 Peptide Sequence	NH2HHHHHHQHYNIVNTQSRVGGGGSCTAISGDLHILPVAF KGDSFTRTPPLDPRELEILKTVKEITGFLLIQAWPDNWTDLH AFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVGLNITSLGLRSLKEISDGDVI ISGNRNLCYANTINWKKLFGGGGS-COOH
4	Optimized DNA sequence of EM-L2 Peptide	CATCATCATCATCATCATCAGCACTATAACATCGTGAATA CCCAGTCTCGCGTGGCGGTGGCGGCAGTTGTACGGCAATC AGCGGTGATCTGCATATTCTGCCGGTCGCATTTAAAGGCG ATAGCTTTACCCGTACCCCGCCGCTGGACCCGCGTGACTG GAAATTCTGAAAACCGTGAAAGAAATTACGGGTTTTCTGC TGATCCAGGCGTGGCCGGATAACTGGACCGACCTGCATGC CTTCGAAAATCTGGAAATTATCCGTGGCCGCACGAAACAG CACGGTCAATTTTCCCTGGCGGTGGTTGGCCTGAACTTAC CAGCCTGGGTCTGCGTTCTCTGAAAGAAATCAGTGATGGC GACGTTATTATCAGCGGTAATCGCAATCTGTGCTACGCAA ATACGATCAACTGGAAAAAACTGTTCGGTGGTGGTGGCA GCGC

فصل دوم

مروری بر مطالعات

۲) فصل دوم: مروری بر مطالعات

۲-۱) ایمنی درمانی سرطان

با و جود اینکه روش های درمانی استاندارد مانند جراحی، پرتو درمانی و شیمی درمانی در دهه های اخیر منجر به افزایش طول عمر تعداد زیادی از بیماران سرطانی شده اند، ولی این روش ها در بسیاری از موارد، خصوصا در مواقعی که سرطان ایجاد متاستاز می کند، نا کار آمد می باشند. در نتیجه نیاز به ایجاد روش های جایگزین برای روش های درمانی فعلی، احساس می شود. یکی از این روش ها ایمنی درمانی سرطان می باشد. به کار گیری اجزاء سیستم ایمنی در راستای درمان سرطان، ایمنی درمانی سرطان نامیده می شود. این مبحث را ویلیام کولی [۳۰] در سال ۱۹۸۰ پایه ریزی کرد [۲۶].

از آن به بعد این شیوه درمانی گسترده تر شده و امروزه آن را به دونوع passive و active تقسیم مینمایند که می توان هرکدام از آنها را به دو زیر گروه اختصاصی و غیراختصاصی دسته بندی کرد.

ایمنی درمانی اختصاصی passive: در این روش بیشتر از آنتی بادیهای مونوکلونال که برعلیه آنتی ژن های سرطانی کمک گرفته میشود. این آنتی بادیها یا با کمک سیستم کمپلمان به روش complement dependent cytotoxicity و یا به کمک ماکروفاژ ها و NK cell ها به روش Antibody Dependent Cytotoxicity و یا با مهار کردن گیرنده های فاکتورهای رشد و تمایز باعث مرگ سلول های سرطانی می شوند [۲۷].

ایمنی درمانی غیراختصاصی passive: تعدادی از ادجوونت های باکتریایی مانند BCG بدین منظور استفاده می شوند. این ادجوونت ها را می توان بصورت سیستمیک و یا مستقیما به داخل تومور تزریق نمود. واکسن BCG در مورد درمان تعدادی از سارکوما ها موفقیت آمیز بوده است [۲۸].

ایمنی درمانی active اختصاصی: در این روش مستقیماً سیستم ایمنی فرد جهت درمان تحریک می - شود. هدف این نوع درمان القای پاسخ ایمنی پایدار علیه تومور میباشد در این رابطه از واکسنهای سرطانی بهره گرفته میشود

۲-۲) واکسن‌های سرطانی

شامل دسته‌ی وسیعی از روش‌ها و استراتژی‌های گوناگون می‌باشد و هدف آن ایجاد پاسخ ایمنی طولانی مدت و ایجاد خاطره‌ی ایمنی در بدن فرد دریافت کننده است. در واقع از برتری‌های

[30] William B. Coley

واکسیناسیون نسبت به سایر روش‌های درمانی هدفمند[31] ایجاد خاطره‌ی ایمنی طولانی مدت است که می‌تواند تا مدت‌ها باقی بماند [۲۹]

ازلحاظ تئوری شخص بیمار دریافت کننده‌ی واکسن پاسخ ایمنی را ایجاد می‌کند که قادر است تومور را درمان کرده و یا تحت کنترل خود در آورد و از پیشروی آن جلوگیری کند [۳۰]. به نوعی می‌توان واکسن‌های سرطانی را به دو گروه پیش‌گیری کننده[32] و درمانی[33] تقسیم نمود [۳۱].

۲-۲-۱) واکسن‌های پیش‌گیری کننده

واکسن‌های پیش‌گیری کننده به افراد سالم تجویز می‌شوند تا از ابتلا به سرطان جلوگیری کنند. از این نوع واکسن‌ها می‌توان به Ceravix و Gardrasil اشاره نمود که به منظور جلوگیری از ابتلا به سرطان رحم القا شده در اثر عفونت با ویروس پاپیلوما[34] تولید شده و مورد تایید FDA قرار گرفته‌اند. این واکسن‌ها به خوبی از ابتلا به عفونت پاپیلومایی جلوگیری می‌کنند اما در درمان عفونت از قبل ایجاد شده بی تاثیر هستند. واکسن HBV[35] که از ابتلا به بیماری کبدی القا شده با HBV جلوگیری می‌کند نیز از این قبیل واکسن‌ها به شمار می‌رود. با توجه به اینکه ۱۰-۲۰٪ سرطان‌ها در اثر عفونت به میکرو اورگانیسم‌ها ایجاد می‌شود امید است که بتوان در آینده برای سایر این سرطان‌ها نیز واکسن تولید شود[۳۱].

سرطان‌هایی که دارای پایه‌ی وراثتی قوی هستند نیز می‌توانند، موارد مناسبی جهت تحقیق در زمینه‌ی واکسن‌های پیش‌گیری کننده باشند . در یک مطالعه‌ی پیش بالینی مشاهده شده است که واکسیناسیون بوسیله‌ی سلول‌های دندریتیک فعال شده با آنتی‌ژن سرطانی Her2/Neu از رشد تومور بیان کننده‌ی Her2/Neu در موش ترانسژنیک Her2/Neu جلوگیری می‌کند. که نشان دهنده پتانسیل پیش‌گیری کنندگی این واکسن می‌باشد [۳۲].

مشاهده شده است که بسیاری از تومورهای سرطانی برای بقا نیازمند فعالیت آنزیم تلومراز هستند و بسیاری از تومورها نیز دچار افزایش بیان در آنتی‌ژنهای سرطانی جنینی می‌باشند. هم تلومراز و هم آنتی‌ژنهای سرطانی جنینی در بافت‌های طبیعی و بالغ به میزان کمی بیان میشوند، از این رو ممکن

31- Targetted therapy

32- Prophylactic

33- Therapeutic

34- Human papilloma virus (HPV)

35- Hepatitis B Virus

است بتوان علیه این آنتی‌ژنها پاسخ ایمنی بدون القا خود ایمنی [36] ایجاد نمود. دانستن این نکته که آیا می‌توان از این آنتی‌ژنها برای ایجاد واکسن‌های پیش‌گیری کننده استفاده نمود نیازمند مطالعه و آزمایش است. مطالعاتی در این زمینه صورت گرفته است که ممکن است بتواند در سالهای آینده نتایج مهمی را در بر داشته باشد [۳۱]

۲-۲-۲) واکسن‌های درمانی

اکثریت غالب واکسن‌هایی که در حال طی مراحل بالینی می‌باشند، به عنوان واکسن‌های درمانی در نظر گرفته می‌شوند. واکسن‌های درمانی با هدف درمان، به افرادمبتلا به سرطان تجویز می‌شود. تا کنون فقط واکسن درمانی سرطان پروستات به نام PROVENGE مورد تایید FDA قرار گرفته است [۳۳]. راه کارهای مختلفی برای واکسیناسیون سرطان وجود دارد که در ادامه به تعدادی از آن‌ها اشاره می‌شود.

۲-۲-۳) واکسن‌های برپایه‌ی اسیدهای نوکلئیک

این دسته از واکسن‌ها به دلیل سرعت زیاد توسعه امروزه در بسیاری از فازهای بالینی واکسن انسانی از جمله واکسن‌های سرطانی وارد شدهاند. ایده اولیه واکسن‌های DNA از مطالعات Wolff و همکارانش استخراج گردید. آنها مشاهده کردند که با تزریق مستقیم پلاسمید DNA به داخل عضله اسکلتی موش بیان طولانی مدت ژن مورد نظر را می‌توان مشاهده کرد[۳۴].

این نوع واکسن‌ها در شرایط In Vivo، سلول‌های فرد دریافت کننده را ترانسفکت [37] می‌کنند و اساس عملکرد آنها استفاده از سیستم رونویسی و ترجمه سلول میزبان است. DNA واکسن‌ها از یک پلاسمید باکتریایی تشکیل شده‌اند ژن آنتی‌ژن مورد نظر را تحت کنترل یک پروموتر یوکاریوتی (CMV promoter) کد می‌کنند. این پلا سمیدها با استفاده از مکانیسم‌های درون سلولی وارد هسته سلول‌های نزدیک محل تجویز و یا سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن می‌شود و پس از بیان ژن آنتی‌ژن مورد نظر تولید می‌شود که سبب تحریک سیستم ایمنی می‌شود

روش‌های متعددی به منظور مهندسی و بهبود واکسن‌های DNA بکار گرفته می‌شود که از جمله آنها می‌توان به عرضه همزمان با مولکول‌های ایمونومدولاتور، عرضه ایمن واکسن، استراتژی‌های شکستن شبکه سرکوبگر سیستم ایمنی، افزایش پتانسیل ایمنی‌زایی واکسن، انتخاب پروموتر قوی ویا بهینه‌سازی کدون‌های اسیدهای آمینه، بهینه‌سازی اپی توپ‌های سلول‌های T با استفاده تغییر توالی اسیدهای آمینه‌ی متصل شونده به MHC، تجویز همزمان با سایتوکاین‌ها و مولکول‌های

36- Autoimmunity

37- Transfect

کواستیمولاتور، قرار دادن توالی‌های CpG بر روی پلاسمید و... اشاره کرد. در جدول ۲-۱ به برخی از استراتژی‌های افزایش پتانسیل واکسن و سرطان مربوطه اشاره شده است.

جدول ۲-۱) برخی استراتژی‌های افزایش پتانسیل واکسن‌های DNA

Strategy	*Approach*	*Indication*
Routes of administration	intramuscular/EP	prostate cancer; B-cell lymphoma
	intradermal/EP	prostate cancer; colon cancer
	gene gun	cervical cancer
	tattoo perforating needle	melanoma
	intratumor	melanoma; renal carcinoma
	high-pressure liquid delivery	B-cell lymphoma; colon cancer
Genetic immunomodulators as Adjuvants	cytokine	liver cancer; prostate cancer; melanoma; B-cell lymphoma
	chemokine	B-cell lymphoma
	T cell helper epitopes	prostate cancer; follicular lymphoma; colon carcinoma
	Toll-receptor ligands	lung carcinoma
	heat shock proteins	cervical cancer
Prime-boost strategy	plasmid DNA/plasmid DNA+EP	prostate cancer; colon cancer
	plasmid DNA/recombinant protein	prostate carcinoma; breast cancer
	plasmid DNA/viral vector	liver cancer; melanoma; prostate carcinoma
	viral vector/plasmid DNA	prostate cancer

این واکسن‌ها داری مزایایی نسبت به سایر واکسن‌ها می‌باشند که شامل سادگی، هزینه‌ی کم تولید در مقیاس بالا، ایمن تر بودن نسبت به واکسن‌های ویروسی و پایداری بالا است [۳۵-۳۸] . از آنجایی که احتمال ادغام DNA در ژنوم میزبان زیاد است واکسن‌هایی بر پایه RNA توسعه یافتهاند چراکه احتمال ادغام RNA در ژنوم میزبان بسیار ضعیف است. برای تهیه‌ی این واکسن‌ها از پلاسمیدهایی که دارای پروموترهای فاژی هستند استفاده می‌شود. توالی cDNA کد کنندهی آنتی‌ژن مورد نظر در این نوع وکتورها کلون شده و پس از تکثیر در میزبان باکتریایی، RNA مورد نظر با استفاده از RNA پلیمراز باکترویوفاژ به صورت Invitro به مقدار زیاد رونویسی می‌شود و پس از عمل Invitro Capping و Poly adenylation، مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین می‌توان مستقیما از mRNA استخراج شده از تومور استفاده نمود [۳۸-۳۹] . در جدول ۲-۲ به برخی از واکسن‌های RNA که وارد فاز بالینی شدهاند اشاره شده است [۴۰] .

جدول ۲-۲) برخی از واکسن‌های RNA و پاسخ ایمنی آنها در فاز بالینی

Cancer type	RNA	Vaccination schedule	Number of study subjects	Immunological response	Clinical response
Melanoma	Total tumor	200 μg naked RNA intradermally, biweekly for 8 weeks, followed by monthly injections for 6 months. 150 μg GM-CSF subcutaneously 24 h after RNA injection.	15	NA	2/13 MR 3/13 NED
Melanoma	Melan-A, tyrosinase, gp100, Mage-A1, Mage-A3, survivin	Arm 1: 3.2–80 μg RNA per antigen + 128 μg protamine intradermally on days 1, 3, 5, weeks 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 15, 19. 200 μg GM-CSF subcutaneously 24 h after RNA injection. Arm 2: 3.2–80 μg RNA per antigen + 128 μg protamine + 4 mg KLH intradermally on days 1, 3, 5, weeks 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 15, 19. 200 μg GM-CSF subcutaneously 24 h after RNA injection.	21 Arm 1: 11 Arm 2: 10	Vaccine directed T cells: 2/4	Arm 1: 1/11 CR 4/11 NED Arm 2: 1/10 NED
RCC	MUC1, CEA, Her-2/neu, telomerase, surviving, MAGE-1	Arm 1: 20 μg naked RNA per antigen intradermally on days 0, 14, 28, 42, followed by monthly injections. 100 μg/m^2 GM-CSF subcutaneously 24 h after RNA injection. Arm 2: 50 μg naked RNA per antigen intradermally on days 0–3, 7–10, 28, 42, followed by monthly injections. 250 μg/m^2 GM-CSF subcutaneously 24 h after RNA injection.	30, Arm 1: 14 Arm 2: 16	CD4+ ELISpot: 3/7 CD8+ ELISpot: 8/9 CD8+ Cr-Release Assay: 7/11	Arm 1: 1/14 PR 6/14 SD Arm 2: 9/16 SD

CR: Complete response; MR: Mixed response; NA: Not applicable; NED: No evidence of disease; PR: Partial response; SD: Stable disease.

۲-۲-۴) واکسن‌های برپایه‌ی وکتور[38]

از این واکسن‌ها می‌توان برای بیان آنتی‌ژن‌های سرطانی، سایتوکاین‌ها، مولکول‌های کو-استیمولاتور ویا ترکیبی از این‌ها و هدایت آن‌ها به سمت سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن، استفاده نمود. واکسن‌های بر پایه‌ی وکتور می‌توانند منجر به پاسخ التهابی قوی شوند که این پاسخ التهابی باعث ایجاد پاسخ ایمنی قوی علیه آنتی‌ژن‌های توموری حمل شده توسط وکتور می‌شود. آنتی‌ژن توموری انتقال داده شده با این وکتورها بسیار ایمنی‌زا تر از تجویز همان آنتی‌ژن به همراه ادجوونت می‌باشد که این از مزایای این روش است. انتخاب نوع وکتور در این روش بسیار مهم است چرا که هرکدام از این وکتورها توانایی ایجاد پاسخ در گروه خاصی از سلول‌های سیستم ایمنی را دار ند. این وکتورها را می‌توان به سه گروه وکتورهای ویروسی[39]، وکتورهای باکتریایی[40] و وکتورهای مخمری[41] تقسیم نمود[۳۵].

38- Vector based vaccines
39- Viral vectors
40- Bacterial vectors
41- Yeast based vectors

۲-۲-۵) وکتورهای برپایه‌ی ویروس

استفاده از ویروسها برای درمان سرطان دارای قدمت تاریخی می‌باشد و گزارشهایی از بهبود سرطان در افرادی که به عفونت ویروسی مبتلا شدهاند وجود دارد. از نمونه‌های این وکتورها می‌توان به وکتورهای بر پایه‌ی آدنو ویروس[42]ها و واکسینیا[43] ویروس‌ها اشاره نمود. این وکتورها ظرفیت بالایی برای پذیرش قطعه‌ی کد کننده دارند و امکان کلون کردن ژن مربوط به آنتی‌ژن مورد نظر به همراه مولکول‌های کو استیمولاتور وجود دارد [۳۵, ۴۱]. همچنین می‌توان به وکتورهای بر پایهی پاکس ویروس پرندگان [44] اشاره کرد که چون در سلول‌های انسانی قادر به رشد و تکثیر نمیباشند از اهمیت برخوردارند. وکتورهای بر پایه ویروس فولپاکس[45] نیز قادر به تکثیر در سلول‌های پستانداران نمیباشند.

از وکتورهای RNA ویروسی نظیر وکتورهای بر پایه Alpha Virus (شامل SFV [46]، SIN [47]، VEE [48]) نیز برای این منظور استفاده می‌شود. این وکتورها بدلیل ایجاد التهاب و القای اپپتوز در سلول‌ها ایمونوژن‌های قویی هستند[۴۱-۴۲]. در این میان داروی ویروسی Imlygic اولین ویروسی بود که در اواخر نوامبر ۲۰۱۵مورد تایید FDA قرار گرفت [۴۳].

۲-۲-۶) وکتورهای باکتریایی

از باکتریهای درون سلولی مانند لیستریا مونوسایتوژنز [49] که ماکروفاژها را آلوده می‌کند استفاده می‌کنند. لیستریایی که برای بیان آنتی‌ژن‌های سرطانی مهندسی شده است، امکان در معرض قرارگرفتن آنتی‌ژن از هر دو مسیر MHC کلاس I و کلاس II را فراهم می‌سازد که می‌تواند پاسخ ایمنی سلولی قدرتمندی را القا کند [۴۴-۴۵] . همچنین از سالمونلا به دلیل مسیر بیماریزایی آن بهره میگیرند، این باکتری در طحال و غدد لنفاوی توسط ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک فاگوسیته شده و کشته می‌شود که مرگ باکتری باعث آزاد شدن پلاسمید با تعداد کپی بالا در داخل فاگوسیت‌ها می‌شود و به این ترتیب امکان بیان آنتی‌ژن سرطانی را در فاگوسیت‌ها فراهم می‌سازد که در نهایت منجر به القای سیستم ایمنی می‌شود [۴۵] .

۲-۲-۷) واکسنهایی با اساس پپتیدی یا پروتئین های نوترکیب:

42- Adenovirus
43- Vaccinia
44- Avian Poxvirus
45- Fowlpox
46- Semliki Forest virus
47- Sindbis virus
48- Venezuelan equine encephalitis virus
49- Listerai Monocytogenes

واکسن های مبتنی بر پپتید بر این فرض استوار هستند که در سلول های سرطانی برخی از آنتی ژن های مرتبط با تومور (TAAs) بیان میشوند که در بافت سالم یا وجود ندارند و در سطوح پایین بیان میشوند . از جمله آنتیژنهایی که در این رابطه مورد استفاده قرار گرفتهاند میتوان به دومین خارج سلولی EGFR، CEA و MUC-1 اشاره نمود [۴۶]. در ایمن سازی با استفاده از آنتی ژن های پروتئینی نوترکیب می توان از پروتئین کامل و یا دومین های خاصی از پروتئین ها استفاده نمود. به دلیل اینکه سیستم ایمنی به آنتی ژن های خودی تولرانس نشان می دهد معمولا از هومولوگ های حیوانی آن ها استفاده می شود و یا اینکه پروتئین های خودی به صورت فیوز شده با یک ایمونوژن قوی و یا به همراه ادجوونت به منظور از بین بردن تولرانس تجویز می شوند. در مورد آنتی ژن های سرطانی (خصوصا گیرنده های فاکتور های رشد و تمایز مانند EGFR) پاسخ سیستم ایمنی بر علیه اپی توپهای متفاوت آنتی ژن می تواند اثرات متفاوتی داشته باشد، و میتواند دارای خاصیتی مهار کنندگی و یا حتی تشدید کنندگی تومور باشد. از این رو استفاده از پپتید ها برای ایمن سازی به دلیل اینکه پاسخ ایمنی را محدود به اپی توپ های خاصی از آنتی ژن می کند می تواند مفید باشد [۴۷].

در مطالعه رامیرز و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داده شد که میتوان علیه قسمت خارج سلولی EGFR موشی (به عنوان کاندید واکسن پپتیدی) با استفاده از یک ادجوانت مناسب در بدن موش آنتی بادی تولید کرد. آنتی بادهای تولید شده با این روش توانسته بودند در موشهای توموری شده با سلولهای کارسینومای ریه لوییس اثرات ضد توموری از خود نشان دهند [۴۸].

در این میان میموتوپها [50] گروه‌ی دیگر از این واکسنها هستند. می‌موتوپ از لحاظ لفظی به معنای تقلید کننده اپی‌توپ است. این واژه در سال ۱۹۸۶، توسط گیسن[51] و همکارانش ابداع شد. اپی توپ و می‌موتوپ هر دو توسط یک پاراتوپ [52] مشترک از آنتی‌بادی شناسایی می‌شوند. تقریباً می‌توان گفت که می‌موتوپ ساختاری از اپی‌توپ حقیقی را تقلید می‌کند. با این وجود ممکن است هیچ شباهتی میان سکانس می‌موتوپ و اپی‌توپ آنتی‌ژن اصلی وجود نداشته باشد. این تقلید براساس شباهتها، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و یا آرایش فضایی دو سکانس به‌وجود می‌آید[۴۹].

میموتوپ ها مزایایی دارند که آنها را تبدیل به گزینه های مناسبی برای واکسیناسیون می کند:

[50] Mimotope
[51] Geysen
[52] Paratope

۱) دارای ساختمان شیمیایی تعریف شده هستند و سنتز آن ها در مقادیر بالا ساده و کم هزینه است.
۲) دارای پایداری شیمیایی هستند و نگهداری آنها برای طولانی مدت بصورت لیوفیلیزه امکان پذیر است.
۳) در هنگام سنتز آن ها از مواد سمی استفاده نمی شود.
۴) پاسخ ایمنی ایجاد شده بر علیه آن ها از پیش تعریف شده است در نتیجه آنتی بادی ناخواسته بر علیه آن ها ایجاد نمی شود.
۵) می توان با اتصال آن ها به پروتئین های ایمونوژن قوی بر ایمنی زایی آنها افزود.
۶) برای تهیه ی آن ها نیازی به داشتن اطلاعات در مورد آنتی ژن وجود ندارد و با استفاده از آنتی بادی های جدا شده از سرم بیمار میتوان عمل Panning را انجام داد.
۷) برای آنتی ژن های غیر پپتیدی مانند لیپیدها، کربوهیدرات ها و هاپتن ها نیز در صورتی که آنتی بادی بر علیه آن ها موجود باشد می توان میموتوپ تهیه کرد.

همچنین در مورد اپی توپ های وابسته به کونفورماسیون می توان به جای اپی توپ اصلی از میموتوپ متناظر استفاده نمود [۵۰-۵۱].

جدول ۲-۳) برخی واکسن‌های پپتیدی سرطان و فاز بالینی آنها

VACCINE	PHASE	TUMOR
Provenge	Aproved	Prostate
Oncophage	III	Melanoma
	III	Renal
gp100 : 209-217(210 M)	III	Melanoma
Stimuvax	IIB	Lung

۲-۲-۸) واکسن‌های بر پایه‌ی سلول سرطانی

واکسن‌های بر پایهی سلول توموری حداقل ۳ مزیت عمده نسبت به روش‌های تک هدفی ذکر شده در القای پاسخ ایمنی دارند: ۱- آنتی‌ژنهای مختلف و حتی ناشناخته به صورت همزمان می‌توانند هدفگیری شوند. ۲- پاسخ ایمنی محدود به HLA نمی‌باشد. ۳- پردازش طیف وسیعی از اپی توپهای

مختص MHC I و MHC II منجر به ایجاد هر دو پاسخ ایمنی ذاتی (شامل NK cells[53], macrophages, and eosinophils) و اختصاصی ($CD8^+$ and $CD4^+$ T cells) می‌شود [۴۷] . به دلیل اینکه تا مدت‌ها شناخت صحیح از ماهیت آنتی‌ژن‌های سرطانی وجود نداشت بسیاری از تلاش‌های اولیه جهت تهیه‌ی واکسن‌های سرطانی شامل استفاده از سلول کامل به عنوان منبع آنتی‌ژن‌های سرطانی می‌شد [۵۲] . این واکسن‌ها می‌توانند به صورت Autologous (مختص خود بیمار) و یا Allogeneic (مانند رده‌های سلولی سرطانی) باشند [۵۳].

همچنین این واکسن‌ها می‌توانند به صورت سلول‌های دستورزی نشده و یا دستورزی شده برای بیان سایتوکاین‌ها، مولکول‌های Co-stimulator، مولکول‌های MHC[54] و یا به صورت مخلوط با ادجوونت‌ها، سایتوکاین‌ها و یا سایر ترکیبات ایمونومودولاتور [55]، تجویز شوند. از راه‌های دیگر افزایش ایمنی‌زایی این سلول‌ها آلوده‌سازی و یا لیز کردن آنها با استفاده از ویروس‌ها و اتصال هاپتن‌ها به سطح این سلول‌ها می‌باشد [۵۳].

مکانیسم فعالسازی سلول‌های T در پاسخ به واکسیناسیون توسط سلول کامل یا لیز سلولی به طور کامل مشخص نیست، احتمالا آنتی‌ژنهای توموری توسط سلول‌های دندریتیک [56] فاگوسیته میشوند و توسط MHC I به سلول‌های T CD8+ عرضه میشوند. در برخی مدلها پاسخ سلول‌های T CD4+ برای مبارزه موثر علیه تومور ضروری به نظر میرسد [۳۲]. در ۲۰ سال اخیر چندین نوع از این واکسن‌های بر پایهی سلول کامل توموری و یا لیزات سلول توموری در مطالعات پیش بالینی و بالینی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند که در اینجا به تعدادی از آن‌ها اشاره می‌شود:

OncoVax از جمله واکسن‌های سلولی Autologous است که از سلول‌های توموری پرتودیده تشکیل شده است که بدون ادجوونت و یا همراه با واکسنBCG به عنوان ادجوونت، تجویز می‌شود[۵۴] .

Rinale (LipoNova) نوع دیگری از واکسن‌های Autologous است که بر پایه‌ی سلول‌های توموری لیز شده با روش‌های مکانیکی است که از قبل با اینترفرون گاما و توکوفرال در کشت انکوبه شده[۵۵].

53- Natural killer cells

54- Major Histocompatiblity Complex

55- Immunomodulator

56- Dendritc cell

GVAX از جمله واکسن‌های سلولی Allogeneic است که که از دو ردهی سلولی سرطان پروستات LNCaP و PC-3 تشکیل شده است که بوسیله‌ی یک وکتور AAV[57] که GM-CSF را کد می‌کند، دستورزی شده است [۵۶]. در جدول ۱-۶ به فاز بالینی و سرطان مربوطه هر یک از واکسن‌های فوق اشاره شده است [۴۷].

جدول ۲-۴) واکسن‌های بر پایه‌ی سلول توموری و فاز بالینی آنها

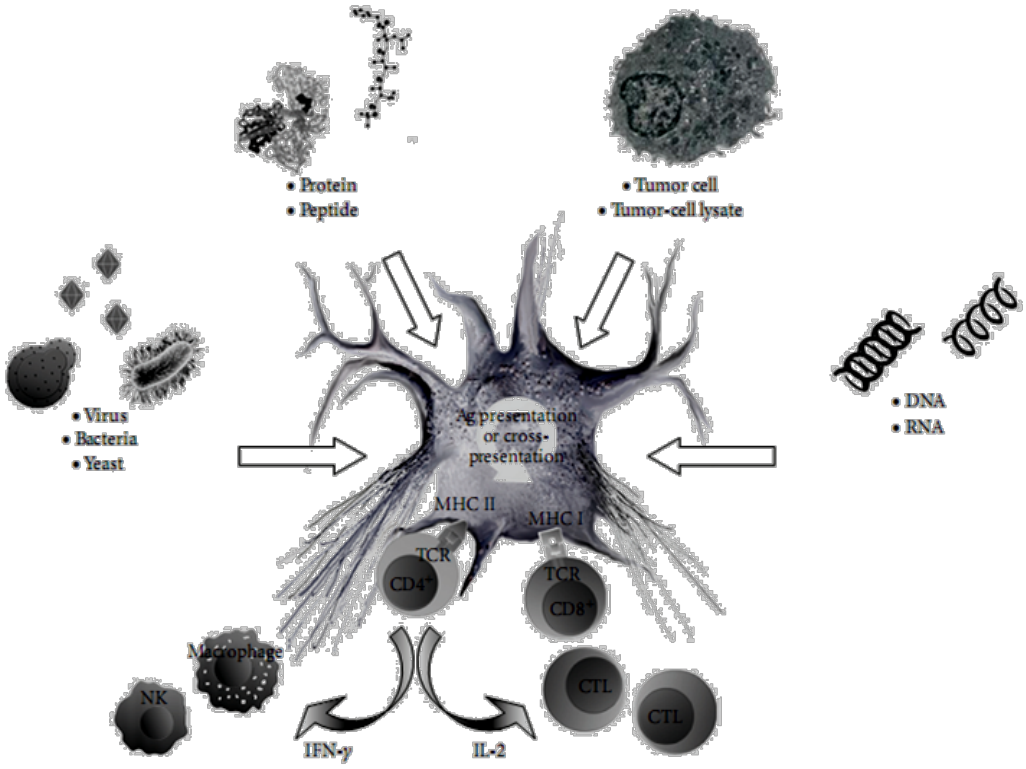
VACCINE	PHASE	TUMOR
OncoVAX	III	Colon
Reniale	III	Renal
GVAX	III	Prostate

۲-۲-۹) واکسن‌های بر پایه‌ی سلول‌های دندریتیک

سلول‌های دندریتیک قابل ترین سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن هستند که قابلیت تحریک طیف وسیعی از سلول‌های سیستم ایمنی شامل سلول‌های T کشنده، T کمکی و NK را دارند. این سلول‌ها از پیش سازهای خون ساز ایجاد شده و بیشتر در بافت‌های سطحی و فضاهای بین بافتی یافت می‌شوند. سلول‌های دندریتیک با کارایی بالا آنتی‌ژن را از محیط اطراف برداشت می‌کنند و در تعداد بالا در سطح خود در معرض قرار می‌دهند. این سلول‌ها در اثر تحریک کننده‌های بلوغ مانند سایتوکاین‌های التهابی بالغ می‌شوند که این فرایند همراه با افزایش بیان مولکول‌های کو-استیمولاتور و ترشح سایتوکاین‌های مختلف است که باعث تحریک لنفوسیت‌های T می‌شود. سلول‌های دندریتیک در آزمایشگاه از سلول‌های پیش ساز گرفته شده از بدن فرد بیمار، در حضور سایتوکاین‌هایی مثل GM-CSF و فاکتور Flt3-L ایجاد می‌شوند. سپس در محیط کشت در معرض آنتی‌ژن قرار می‌گیرند و سپس در حضور سایتوکاین‌های التهابی و LPS[58] بالغ می‌شوند و به بدن بیمار تزریق می‌شوند.
در این روش واکسیناسیون آنتی‌ژن می‌تواند به صورت سلول کامل سرطانی یا بقایای آن، پروتئین، پپتید، DNA، RNA و یا برپایه‌ی وکتورهای ویروسی باشد. در شکل ۲-۱ انواع روش‌های واکسناسیون با استفاده از سلول‌های دندریتیک خلاصه شده است [۳۵, ۵۷].

57- Adeno-Associated Virus

58- Lipopoly sacharide



شکل ۲-۱) خلاصه‌ای از انواع روش‌های واکسیناسیون با استفاده از سلول‌های دندریتیک

هرکدام از این نوع واکسنها دارای مزایا و معایبی است که به تعدادی از آنها در جدول ۲-۵ اشاره شده است.

جدول۲-۵) مزایا و معایب بعضی از واکسنهای سرطان

Vaccine	Pros	Cons
Dendritic cell	Has a broad immunologic compatibility (no HLA restriction) Offers more control over APC stimulation and antigen presentation	Is logistically difficult and most difficult to scale up Includes risk of leukapheresis
Viral-based	Can introduce target antigen into immune cells effectively Can be produced on larger scale	Immune response against priming virus requires different virus for a booster
Peptide-based	Can be produced with high purity in large amounts Has low toxicity of peptides	Needs multiple peptides to prevent immune escape Is restricted to certain HLA types
Whole cell-based	Represents a broad array of antigens Can more readily produce allogeneic cell lines on a larger scale Is not restricted by HLA type	Autologous cell vaccines are labor-intensive and difficult to standardize Requires cell manipulation to be immunogenic

ایمنی درمانی active غیر اختصاصی : در این شیوه از انواع سایتوکاینها به عنوان عامل درمانی و یا ادجوونت استفاده میشود. IL12 و IFNα از اولین سایتوکاین هایی بودند که مورد تأیید FDA قرارگرفتند و در درمان ملانوما مؤثرند. از دیگر سایتوکاین ها IL7, IL12 و IL21 که تحت آزمایشات

کلینیکال قرار دارند. GM-CSF نیز که در بلوغ سلول های دندریتیک و افزایش بیان ژن های MHC می شود نیز به همراه تومور واکسن ها مورد استفاده قرار می گیرد[۵۸-۵۹] .

۲-۳) ICR61 و ICR62

ICR61 و ICR62 دو آنتی بادی علیه EGFR هستند که توسط دکتر مجتهدی در رت تولید شده و توانایی واکنش با اپیتوپهای مختلف این ملکول را دارند. این انتس بادیها میتوانند با EGF در اتصال به EGFR رقابت کنند[۶۰].

۲-۴) نمایش فاژی[59]

نمایش فاژی روشی برای بررسی برهمکنش پروتئین با پروتئین، پروتئین با پپتید و پروتئین با DNA می‌باشد که در آن با استفاده از باکتریوفاژها[60] بین پروتئین و اطلاعات ژنتیکی آن ارتباط برقرار میکنند. این تکنیک در سال ۱۹۸۵ توسط شخصی به نام جرج اسمیت[61] ابداع شد. او نمایش پپتیدهای مورد نظر را به صورت ترکیب با پروتئین III روی فاژهای رشته‌ای ثابت کرد[۶۱].

سپس این تکنیک توسط افرادی مثل جان مک کافرتی[62]، برای نمایش دادن پروتئین‌هایی مثل آنتی‌بادی گسترش یافت. وجود رابطه بین ژنوتیپ و فنوتیپ در این تکنیک امکان غربالگری[63] کتابخانه‌های بزرگ پروتئینی به منظور پیدا کردن و تکثیر یک پروتئین خاص در شرایط آزمایشگاهی را می‌دهد . شایع‌ترین فاژی که در این تکنیک به کار می‌رود فاژ M13 و فاژهای رشته‌ای هستند [۶۲-۶۳] اگرچه در این زمینه فاژهای T4، T7 و فاژ λ نیز کاربرد دارند [۶۴].

۲-۴-۱) اساس نمایش فاژی

نمایش فاژی برای غربالگری پربازده برهمکنش‌های پروتئین به کار می‌رود. در مورد نمایش فاژی با فاژ M13، DNA کد کننده پپتید یا پروتئین مورد نظر در ژن پروتئین III و یا VIII، که به ترتیب پروتئین سه و هشت فاژ را کد می‌کنند، قرار می‌گیرد. سپس فاژ نوترکیب شده به داخل سلولهای باکتریE.coli مثل TG1، XL1-Blue، ER2738, SS320 ترانسفورم[64] می‌شود.

---

[59] Phage display
[60] Bacteriophage
[61] Georg Smith
[62] Jhon Mc Caferty
[63] screening
[64] transformation

اگر وکتور فاژمیدی مورد استفاده قرار بگیرد ذرات فاژی تا زمانی که باکتری E.coli با فاژ کمکی آلوده نشود از باکتری آزاد نخواهند شد. در این میان فاژ کمکی باعث بسته‌بندی DNA فاژمیدی با پروتئین‌های پوششی می‌شود. با قرار دادن تعداد زیادی از قطعات DNA در ژن‌های III یا VIII می‌توان کتابخانه‌ای ایجاد کرد که از آن پروتئین‌های مورد نظر قابل جداسازی خواهند بود. با ثابت نمودن DNA یا پروتئین‌های هدف روی سطح چاهک، فاژهایی که پروتئین نمایش داده شده روی آن با پروتئین ثابت شده روی سطح چاهک توانایی اتصال داشته باشند باقی مانده ، در حالیکه سایر فاژها با شستشو حذف خواهند شد. فاژهای باقی‌مانده را می‌توان استخراج و پس از الوده نمودن باکتری آنها را تکثیر کرد تا ترکیبی غنی شده از فاژهای مرتبط به دست آورد. با تکرار این چرخه، که panning نامیده می‌شود، می‌توان نمونه اصلی را باحذف مواد نامطلوب بیش از بیش غنی نمود. می‌توان با فاژ به دست آمده از مرحله آخر، یک باکتری مناسب را آلوده نمود و از آن فاژمیدها را جدا نموده و از توالی DNA برای شناسایی پروتئین یا قطعات پروتئینی مرتبط استفاده نمود[۶۵].

۲-۴-۲) روشهای متنوع در نمایش فاژ

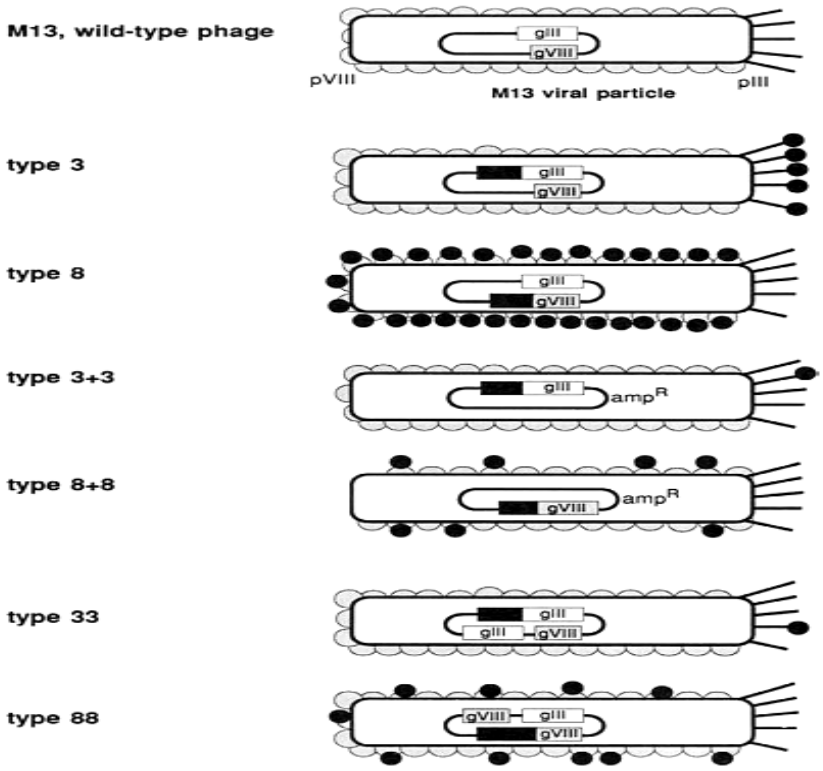
حدود بیست نوع نحوه نمایش فاژ داریم که مهمترین آنها را می‌توان به انواع ۳ ، ۳+۳ ، ۳۳ ، ۸ ، ۸+۸ و ۸۸ بسته به استفاده از PIII یا PVIII به‌عنوان حامل مولکول، تعداد مولکول‌های حاصل و وکتورهای به‌کار گرفته شده، دسته‌بندی کرد. در سیستم‌های مدل ۳ ، یک جایگاه کلونینگ در ژنوم فاژ، منجر به ادغام پپتید بر هر کپی از PIII می‌شود. در مدل ۳+۳ ، gIII نوترکیب از روی یک فاژمید (پلاسمید حاوی ناحیه همانندسازی Ff و علامت بسته‌بندی) کددهی می‌شود، در حالیکه در مرحله بعد یک فاژ کمکی هم به این مجموعه وارد می‌شود، فاژ کمکی □□ از نوع Ff از نظر بسته‌بندی ناقص است. محصول این مجموعه ذرات ویروسی است که هر دو نوع PIII نوترکیب و وحشی را در ساختمانش دارد. در مدل ۳۳ ، ژنوم یک فاژ هر دو نوع gIII نوترکیب و وحشی را کددهی می‌کند و gIII نوترکیب در جایگاه کلونینگ□□ (MCS) از یک وکتور کلونینگ M13 ، درج شده است. نمایش ۸ ، ۸+۸ و ۸۸ هم از اساس ذکر شده در مورد PIII را دارند با این تفاوت که پروتئین نمایش داده شده بر روی PVIII بیان می‌شود (شکل ۲-۲)[۶۶].

۲-۵) فاژ M13

مهمترین فاژی که در نمایش فاژی به کار می‌رود، فاژ رشته‌ای M13 می‌باشد که در ادامه راجع به این فاژ مطالب بیشتری جمع‌آوری شده است. قطر این فاژ ۶/۵ نانومتر بوده و طول آن متناسب با مقدار

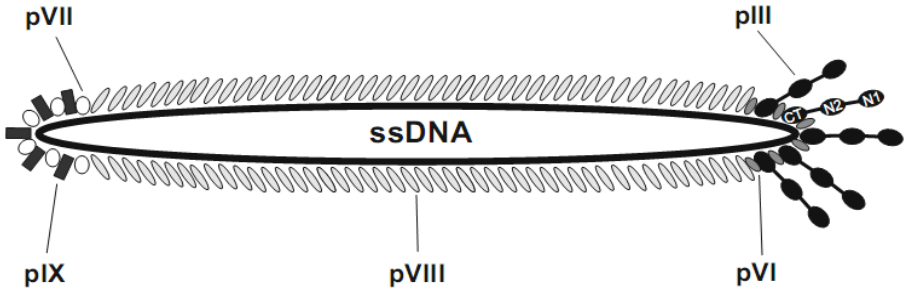
[65] Helper Phage
[66] Multiple Cloning Site

DNA آن از ۲۲۱ تا ۹۰۰ نانومتر متفاوت است [۶۷]. این فاژ در پوشش خود ۵ نوع پروتئین دارد. مهمترین آنها جهت پایداری فاژ پروتئین VIII است که حدود ۲۷۰۰ کپی از آن در سطح فاژ قرار دارد. این پروتئین نسبت به محور عمودی فاژ در یک زاویه ۲۰ درجه قرار می‌گیرد [۶۸] .



شکل ۲-۲) روش‌های متنوع در نمایش فاژ

این فاژ دارای دو انتها می‌باشد، انتهای صاف[67] که از پروتئین‌های ۷ و ۹ تشکیل شده و دیگری انتهای pointed که از پروتئین‌های ۳ و ۵ تشکیل شده است (شکل ۲-۳) [۶۹-۷۰] .



شکل ۲-۳) تصویر شماتیک فاژ M13

[67] Blunt

در جدول زیر اطلاعات مربوط به تمام پروتئین‌های فاژ به طور خلاصه جمع آوری شده است (جدول۲-6) [۷۱].

جدول ۲-۶) پروتئین‌های فاژ

Gene	Protein	Size (aa)	Function	Location	Used for display?
I	I	348	Assembly	Inner membrane	
	XI	108	Assembly	Inner membrane	
II	II	409	Replication (nickase)	Cytoplasm	
	X	111	Replication	Cytoplasm	
III	III	406[a]	Virion component	Virion tip (end)	Yes (N-term)
IV	IV	405[a]	Assembly (exit channel)	Outer membrane	
V	V	87	Replication (ssDNA bp)	Cytoplasm	
VI	VI	112	Virion component	Virion tip (end)	Yes (C-term)
VII	VII	33	Virion component	Virion tip (start)	Yes (N-term)
VIII	VIII	50*	Virion component	Virion filament	Yes (N- and C-term)
IX	IX	32	Virion component	Virion tip (start)	Yes (N-term)

از تمام پروتئین‌های پوششی فاژ می‌توان برای نمایش فاژی بهره جست، اما مهمترین پروتئین‌هایی که از آنها در نمایش فاژی استفاده می‌شود پروتئین‌های III وVIII هستند

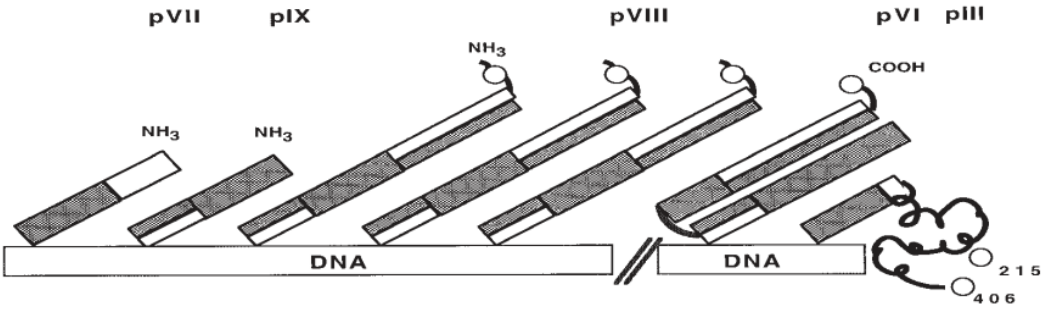
۲-۵-۱) پروتئین VIII

پروتئین ۸ یک پروتئین کوچک ۵۰ اسید آمینه‌ای است، که یک قطعه کوچک ۵ اسید آمینه‌ای از انتهای N آن به سمت بیرون قرار گرفته است در حالیکه مابقی آن ساختار مارپیچیی α داشته و از سه دومن تشکیل شده است:

- دومن اسیدی دو گانه دوست که ۱۴ اسید آمینه دارد.
- دومن آب گریز که از ۲۰ اسید آمنه تشکیل شده است.
- دومن بازی دوگانه دوست که از ۱۰ اسید آمینه تشکیل شده است.

این ساختار این امکان را به پروتئین ۸ می‌دهد تا ملکولهای آن روی هم سوار شوند و روی DNA فاژی ساختاری شبیه پولک ماهی[68] ایجاد نماید (شکل۲-۴) [۷۲].

[68] Fish scale



شکل۲-۴) نحوه قرار گرفتن پروتئینهای ۸ در سطح فاژ

جایگاهی که در آن پپتید خارجی را در این پروتئین قرار می‌دهند بین توالی نشانه و ابتدای توالی N آن می‌باشد. البته فقط قطعات کوچک ۶ تا ۸ اسیدآمینه‌ای را می‌توان در تمام پروتئین‌های ۸ نمایش داد و برای نمایش پپتیدهای بزرگتر باید از وکتورهای فاژمیدی استفاده کرد که به دنبال آن دو نوع پروتئین ۸، طبیعی و نوترکیب، خواهیم داشت [۷۳].

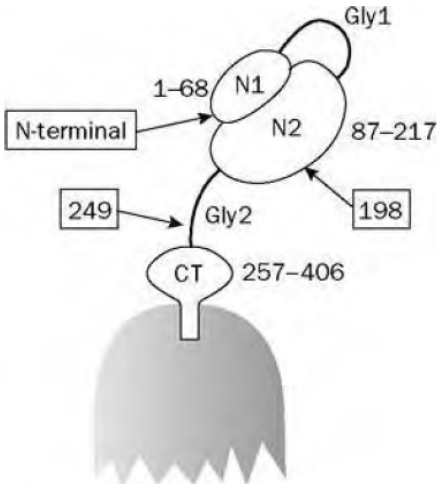
۲-۵-۲) پروتئین III

این پروتئین دارای سه دومن می‌باشد. دومن‌های N1 و N2 در انتهای آمینی قرار دارند و برای آلوده کردن باکتری ضروری هستند. دومن سوم CT[69] می‌باشد که در انتهای کربوکسیل پروتئین قرار داشته و برای قرار گرفتن پروتئین ۳ روی ذره فاژ، اتمام فرآیند بسته‌بندی شدن[70] و نیز رهایی فاژ از سطح باکتری ضروری و کافی است. دومن‌های پروتئین ۳ توسط دو رابط غنی از گلایسین از هم جدا شده‌اند (شکل۲-۵) [۷۴].

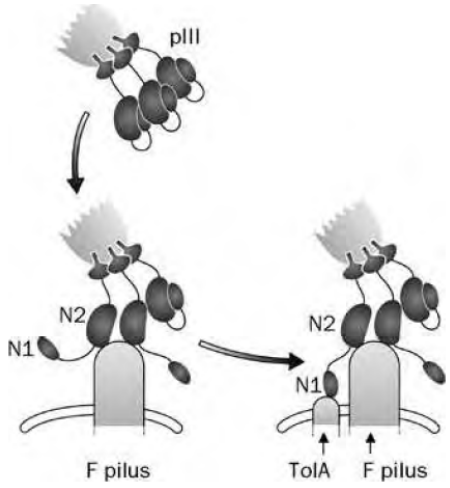
۲-۵-۳) روند آلوده شدن باکتری توسط فاژ

آلوده شدن فاژ با برهمکنش دومن N2 با پیلی F باکتری شروع می‌شود، تماس این دو با هم باعث رهاسازی دومن N1 می‌شود که بعد از آن این دومن به پروتئین TolA موجود در سطح باکتری متصل شده و طبق مراحلی ناشناخته ژنوم فاژ وارد باکتری می‌شود (شکل ۲-۶) [۷۵-۷۷].

[69] Carbocyl terminal
[70] Packaging



شکل ۲-۵) وضعیت قرار گرفتن دومن‌های پروتئین ۳



شکل۲-۶) نحوه اتصال فاژ به باکتری

۲-۵-۴) بسته بندی و خروج فاژ از باکتری

بعد از اینکه ژنوم فاژ وارد باکتری شد، تبدیل به فرم دو رشته‌ای می‌شود و پروتئین‌های خودش را ترجمه می‌کند. یکی از این و پروتئین‌ها، و پروتئین ۵ است که روی تمام ژنوم تک‌رشته‌ای فاژ به غیر از بخشی به نام PS[71] یا سیگنال بسته بندی را می‌پوشاند. این سیگنال در خروج فاژ از باکتری نقش دارد. به طور خلاصه خارج شدن فاژ از باکتری شامل مراحل زیر است:

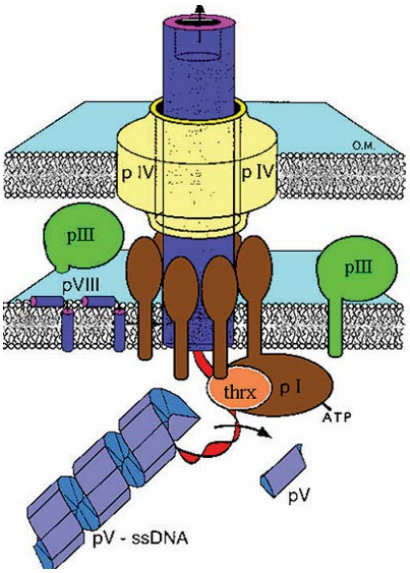
– مرحله پیش آغازی[72]: در این مرحله جایگاههای بسته بندی در سطح باکتری تشکیل می‌شوند. پروتئین‌های ۱، ۱۱ و ۴ در این ساختار نقش دارند (شکل۲-۷).

[71] Packaging signal
[72] Preinitiation

– مرحله شروع[73]: این مرحله با قرار گرفتن پروتئین‌های ۷، ۹ و ژنوم تک‌رشته‌ای فاژ آغاز می‌شود. در این حالت پروتئین‌های ۷ و ۹ با PS که از یک طرف کمپلکس DNA+PV بیرون زده برهمکنش کرده و باعث آغاز این مرحله می‌شود.

– مرحله طویل‌سازی[74]: از جایگزینی متوالی پروتئین‌های ۸ با ۵ تشکیل شده است.

– مرحله پیش‌خاتمه[75]: که در آن کمپلکس پروتئین‌های ۳ و ۶ در انتهای فاژ قرار می‌گیرند.



شکل۲-۷) ساختار شماتیک جایگاه بسته بندی فاژ در سطح باکتری

مرحله خاتمه[76]: که طی آن ساختار فضایی کمپلکس پروتئین‌های ۳ و ۶ تغییر کرده و به رها سازی فاژ از باکتری کمک می‌کند[۷۰, ۷۸-۸۰] .

۲-۶) فاژ کمکی

حاملهای فاژمیدی تنها دارای منشا همانند سازی باکتریوفاژخطی و فاقد ژنهای لازم برای تکثیر و بسته بندی ذرات فاژ می‌باشند، بنابراین برای غنی سازی و انتخاب کتابخانه فاژمیدی نیاز به فاژ کمکی می‌باشد. فاژکمکی تکثیر وبسته بندی را انجام داده و سبب رهایی فاژمید بصورت فاژ کامل از باکتری می‌گردد. فاژهای کمکی زیادی موجود می‌باشد که همه آنها دارای جهش‌هایی هستند که کارایی آنها را برای بسته بندی و رها شدن از باکتری می‌کاهد. M13K07 یکی از شایع‌ترین این فاژهای کمکی است که در منشا همانند سازی آن جهشی ایجاد شده تا تولید و تکثیر این فاژکمکی

[73] Initiation
[74] Elongation
[75] Pretermination
[76] Termination

با کارایی کمتری انجام پذیر می‌سازد. همچنینM13KO7 مقاوم به کانامایسین است و این مقاومت را به باکتری حامل نـاقل هم منتقل می‌کند، بنابراین انتخاب باکتری آلـوده به فـاژکمـکی و نـاقل فـاژمیدی آسان ترخواهد بود[۷۰, ۸۱].

۲-۷) بیان فاژی پروتئین و دومنهای پروتئینی

پروتئین‌ها و دومن‌های پروتئینی بسیاری بر سطح فاژ نمایش داده شده‌اند. در بیشتر این موارد پروتئین نمایش داده شده بر سطح فاژ توانایی اتصال یا آنزیمی خود را حفظ می کند. این نوع نمایش به منظور دو کاربرد عمده بوده است:

۱ -جداسازی آنتی بادی های نوترکیب با تمایل بالا.
۲ -تکامل جهت دار پروتئین ها[77].

۲-۷-۱) جداسازی آنتی بادیهای نوترکیب با تمایل بالا

پس از معرفی نمایش فاژی توسط اسمیت در سال ۱۹۹۱ دانشمندانی بنام مک‌کافرتی و گریفیس[78] اقدام به بکارگیری این روش در مورد آنتی بادی‌ها کردند. نشان دادن پروتئین‌ها بر روی سطح فاژ یک روش مطمئن برای انتخاب ژن های کم یابی است که کد کننده پروتئین‌ها با فعالیت اتصالی هستند. این تکنیک می‌تواند برای نشان دادن مولکول‌های آنتی بادی منوکلونال نیز استفاده گردد. مراحل این تکنیک در اصل تقلیدی از سیستم ایمنی هومورال بدن است. روند تکنیک به طور خلاصه شامل مراحل زیر است[۸۲-۸۵].

۱ -تولید مخازن ژنی قطعه مورد نظر.
۲ -کلون سازی این مخازن در وکتورهای فاژی یا فاژمیدی مناسب.
۳ -جداسازی فاژهایی که دارای آنتی بادی بر علیه آنتی ژن مورد نظر هستند.
٤ -تعیین خصوصیات آنتی بادی مختص به آنتی ژن.
۵ -این روش برای نمایش و جداسازس انواع آنتی بادی های نوترکیب مانند Fab، ScFv[79]، F(ab)2 و آنتی بادی شتری VHH مورد استفاده قرار گرفته است[۸۴-۸۵].

آنتی بادی های نوترکیبی نظیر ScFv و VHH[80]در مقایسه با آنتی بادی های منوکلونال به علت سایز کوچک و امکان نفوذ بیشتر در بافت به نسبت آنتی بادی های مونوکلونال، پایداری و حلالیت بالا،

[77] Directed Evolution of Proteins
[78] Griffiths
[79] Single chain fragment variable
[80] Variable heavy chain

نیمه عمر بالا در خون و امکان تولید در سیستم های پروکاریوتی در سالهای اخیر برای درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته اند. آنتی بادی های نوترکیب بر علیه مارکرهای مختلف سرطانی از کتابخانه های فاژی جدا شده اند. برای مثال Ahmadvand و همکاران در سال ۲۰۰۸ موفق به جداسازی VHH بر علیه اندوگلین شدند [۸۶]. Horak و همکاران تعداد قابل توجهی آنتی بادی انسانی ScFv بر علیه تمامی اعضای خانواده EGFR تولید کرده اند [۸۷].

۲-۷-۲) تکامل جهت دار پروتئین ها

هنگامی که یک جمعیت از پروتئین ها با ویژگی های دلخواه به دست آمد، می توان لایه های بیشتری از اصلاح و انتخاب را بر روی آن اعمال کرد تا پروتئینی با ویژگی های تمایل و یا آنزیمی مورد نظر به دست آید. البته می توان این روند را از یک پروتئین کاملا شناخته شده نیز شروع کرد و به یک کتابخانه با تنوع قابل توجه دست یافت. استراتژی سوق دادن یک جمعیت از پروتئین ها به سوی ویژگی های دلخواه با استفاده از تغییرات تصادفی در توالی ژن آن ها با عنوان تکامل جهت دار شناخته میشود. در مقایسه با روش های مرسوم برای دستکاری ویژگی های پروتئین مزیت این روش آن است که هیچ نیازی به دانستن ویژگی های ساختاری یا جزئیات واکنش در سطح مولکولی نیست. با این روش می توان برای مثال آنزیم هایی با قدرت بیشتر و یا آنتی بادی هایی با تمایل بالاتر را تولید کرد [۸۸-۸۹].

استراتژی کلی در این امر همانند سیستم های مرسوم در نمایش فاژی می باشد، با این تفاوت که در هر مرحله غنی سازی یک مرحله تنوع زایی نیز وجود دارد . این تنوع زایی با ایجاد جهش در ژنهای مربوطه انجام می پذیرد. برای این کار از تکنیک های مختلفی مانند PCR مستعد به خطا، بر زدن DNA و استفاده از گونه های باکتری مستعد به خطا در همانند سازی برای تکثیر فاژ استفاده می شود[۸۹].

مثال های این گونه استفاده از نمایش فاژی به وفور در مقالات به چشم می خورد. برای مثال Friedman و همکاران موفق به افزایش تمایل آنتی بادی نوترکیب Affibody با تمایل بالا برای EGFR از یک آنتی بادی با تمایل کم شدند [۹۰]. Li و همکاران موفق به تولید گیرنده های سلول T با تمایل بالا برای پپتید مربوط به ویروس HTLV-1 با استفاده از این فناوری شدند[۹۱].

۲-۷-۳) نمایش فاژی پپتید

نمایش فاژی برای نمایش پپتیدها به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. کتابخانه های پپتیدی به دو صورت وجود دارند:

۱ -کتابخانه های نمایش فاژی پپتیدهای طبیعی.

۲ -کتابخانه های نمایش پپتیدهای تصادفی.

۲-۷-۳-۱) کتابخانه های نمایش پپتیدهای طبیعی

این گونه کتابخانه ها به طور گسترده برای تعیین اپی توپ آنتی بادی های مونوکلونال مورد استفاده قرار گرفته اند.

۲-۷-۳-۲) کتابخانه های پپتیدی و پپتیدهای جایگزین آنتی بادیها

پس از معرفی فناوری تولید آنتی بادی های مونوکلونال و تولید این گونه آنتی بادی ها به سرعت امکان استفاده از آن ها به عنوان عوامل درمانی مطرح شد. برای مثال می توان به استفاده از آن ها به عنوان درمان سرطان اشاره کرد که در مباحث پیشین مطرح شد. آنتی بادی ها ویژگی های خاصی دارند که آن ها را به عنوان کاندیدای مناسب برای این منظور مطرح می کند: تمایل و ویژگی بالا برای مولکول هدف، امکان تولید در مقیاس بالا، سمیت پایین و عملکرد پایین به عنوان آنتی ژن.

امروزه با استفاد از فناوری نمایش فاژی می توان به پپتید هایی دست پیدا کرد که از لحاظ تمایل و ویژگی قابل مقایسه با آنتی بادی ها باشند. همانطور که قبلا ذکر شد کتابخانه های نمایش پپتیدهای تصادفی تا 10^{10} عضو مختلف را می توانند بیان کنند. با انجام غنی سازی بر روی مولکول هدف توسط چنین کتابخانه هایی می توان به هدف مذکور دست پیدا کرد. پپتید ها در مقایسه با آنتی بادی ها دارای مزیت هایی می باشند که به شرح زیر است[۹۲]:

۱ - هزینه تولید پایین تر.

۲ - فعالیت بالاتر در واحد وزن (مقایسه کنید وزن آنتی بادی های مونوکلونال ۱۵۰-۱۸۰ کیلودالتون را با یک پپتید دارای ۵۰-۱۰ اسید آمینه).

۳ - پایداری بالاتر

۴ - احتمال کمتر برهم کنش ناخواسته با سیستم ایمنی.

۵ - نفوذ بالاتر در ارگان یا تومور.

مثال های چنین پپتید هایی به وفور در مقالات به چشم می خورد. برای مثال Hetian و همکاران از یک کتابخانه پپتیدهای تصادفی نمایش داده شده بر سطح پروتئین pIII فاژ موفق به جداکردن پپتید

متصل شونده به دومن تیروزین کینازی گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی [81] (VEGFR) شدند [۹۳].

Karasseva و همکاران موفق به جداسازی چنین پپتیدی بر علیه HER2 شدند. پپتید به دست آمده که p6.1 نامیده شد هیچ واکنش متقاطعی با دیگر اعضای خانواده نداشت. مولفان پیشنهاد کرده اند که این پپتید می تواند به مقاصد عکس برداری و یا درمانی بر علیه HER2 استفاده شود [۹۴]. در همین راستا می‌توان به می‌موتوپ EGFR اشاره نمود که همان طور که ذکر شد، توسط خانم زارع در آزمایشگاه دکتر رسایی به دست آمده و توسط آقای نواری به BSA متصل شده و از آن برای تولید آنتی بادی علیه EGFR استفاده شده است [۲۳].

۲-۷-۳-۳) کتابخانه های پتیدهای تصادفی و تعیین نقشه اپی توپی آنتی بادی های مونوکلونال، طراحی واکسن های پپتیدی

همانطور که قبلا ذکر شد با نمایش قطعات یک آنتی ژن بر روی فاژ می توان نقشه اپی توپی یک آنتی‌بادی مونوکلونال را تعیین کرد و البته این روش با محدودیت هایی همچون عدم امکان شناسایی اپی توپ های فضایی و نیاز به ایجاد کتابخانه مستقل برای هر آنتی ژن همراه است. با استفاده از کتابخانه های پپتیدهای تصادفی این محدودیت ها رفع شده است. در ابتدا با بهره‌گیری از کتابخانه‌های پپتیدی تنها بررسی اپی‌توپ‌های خطی که با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال خاص واکنش می‌دادند، امکان‌پذیر بود. ولی کتابخانه‌هایی طراحی شدند که با قرار دادن اسیدآمینه‌های خاص در دو طرف سکانس تصادفی بیان پپتید با ساختار حلقه مانند یا Scaffold امکان‌پذیر شد. بدین ترتیب اپی‌توپ‌های فضایی هم مورد بررسی قرار گرفتند [۹۵].

۲-۸) استفاده از نمایش فاژی در ایمن سازی اختصاصی جایگاه[82]

یکی دیگر از کاربردهای نمایش فاژی، استفاده از آن در ایمن‌سازی اختصاصی جایگاه است. در این روش می‌توان ناحیه خاصی از پروتئین‌ها را به منظور ایمن کردن و هدایت پاسخ سیستم علیه همان ناحیه روی فاژ به نمایش گذاشت. در همین راستا لیدکویست [83] و همکاران پس از شناسایی اپی‌توپ پروتئین E7 ویروس پاپیلومای انسانی [84] تیپ ۱۶، آن را روی پروتئین ۸ فاژ به نمایش در آورده و بعد از ایمن ساختن حیوان با فاژهای نوترکیب، بر علیه همان ناحیه آنتی‌بادی منوکلونال تهیه نمودند [۹۶].

[81] Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
[82] Site specific immunization
[83] Lidqvist
[84] Human papillomavirus

فصل سوم

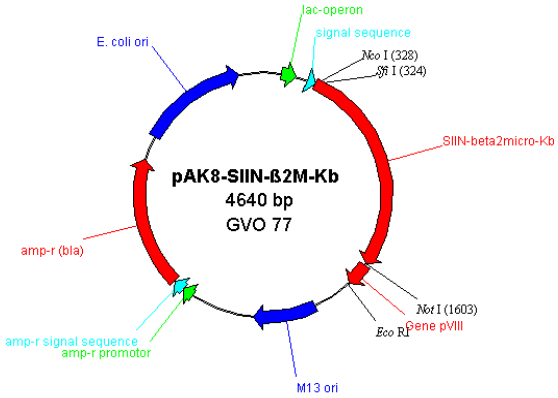
مواد و روشها

۳) فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱) مواد

۳-۱-۱) وکتور فاژمیدی

وکتوری که در این پایان‌نامه از آن استفاده شده است فاژمیدی به نام pAK8-GVO77 می‌باشد که توسط دکترالکساندر کلیمکا[85] هدیه شد. این وکتور توانایی نمایش دادن پپتیدهای دلخواه روی سطح فاژ به صورت فیوز شده با پروتئین ۸ را دارد. نقشه این وکتور را در شکل ۲-۱ مشاهده می‌کنید (همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، وکتور دارای قطعه خارجی بوده که می‌بایست از آن خارج شود.)



شکل ۳-۱) فاژمید pAK8-GVO77 اهدایی توسط دکتر کلیمکا (آلمان)

۳-۱-۲) وکتور بیانی

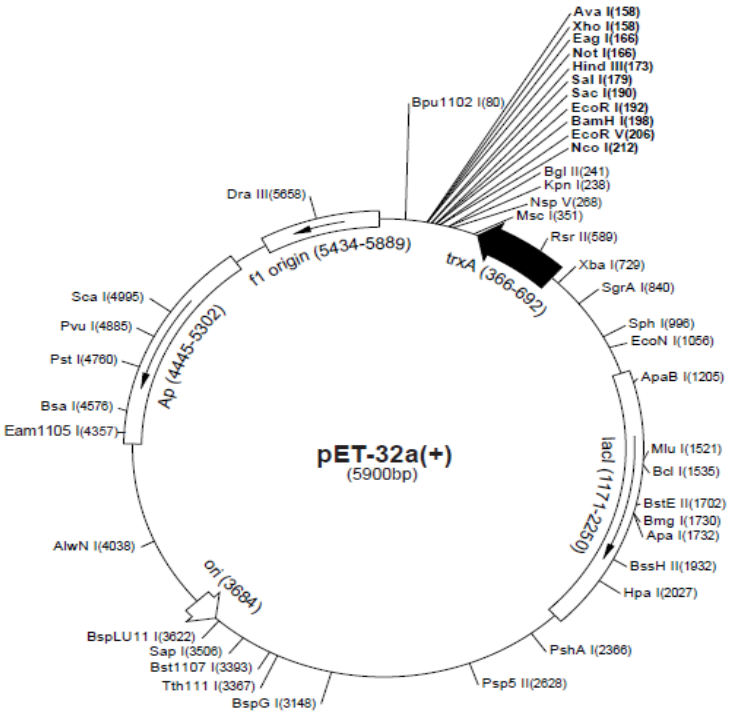
در این مطالعه از وکتور بیانی pET32a استفاده گردید. نقشه مربوط به این وکتور در شکل ۳-۲ نشان داده شده است.

۳-۱-۳) فاژ کمکی

فاژکمکی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت M13KO7 می‌باشد که در بخش منشا همانند سازی آن جهشی ایجاد شـده که تولید و تکثیر این فاژکـمکی را با کارایی کمتری انجام پذیر

[85] Alexander Klimka

می‌سازد. همچنین M13KO7 مقاوم به کانامایسین است و این مقاومت را به باکتری حامل آن هم منتقل می‌کند، بنابراین انتخاب باکتری آلوده به فاژکمکی و ناقل فاژمیدی آسان ترخواهد بود.



شکل ۳-۲) وکتور بیانی **pET32a**

۳-۱-۴) سویه های باکتریایی

از باکتری E.coli سویههای Top10به عنوان سویه کلونینگ و BL21-DE3 به عنوان میزبان باکتریایی، و سویه TG1 به عنوان میزبان فاژی به منظور پک کردن فاژ در این تحقیق استفاده شد.

۳-۱-۵) رده‌های سلول جانوری و انسانی

رده سلولی LL/2 که EGFR را در مقادیر بالا بیان می‌کند و توانایی تومور زایی در موش C57BL/6 را دارد. این رده سلولی بعنوان مدل برای بررسی متاستاز و همچنین مطالعهی مکانیسم داروهای شیمی درمانی کاربرد دارد.

۳-۱-۶) بافرها و محلول ها

۳-۱-۶-۱) بافرهای الکتروفورز DNA

۱) بافر TAE (۱۰۰X) ، روش تهیه:

Tris base ۴۸۴ gr, Acetic Acid ۱۴۴/۲ ml, EDTA (۰/۵M) ۲۰۰ml.

با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسد.

۲) بافر نمونه گذاری DNA ،روش تهیه:

glycerol ٪۵۰ V/V, Na2EDTA ۱mM (pH=۸/۰), Bromophenol blue ٪۰/۴ W/V

۳-۱-۶-۲) بافرهای ELISA

بافر بیکربنات (pH = ۸/۶) : NaHCO3 ۱۰۰ میلی مولار با اتوکلاو کردن استریل شده و در ۴ درجه نگهداری شد.

بافر TBS (pH = ۷/۵) : Tris-HCl ۵۰ میلی مولار ، NaCl ۱۵۰ میلی مولار اتوکلاو شده و در یخچال نگهداری شد.

بافر TBST: به ۱۰۰cc بافر TBS ۱۰۰ میکرولیتر Tween20 اضافه شد.

محلول بلاک کننده (بلاکر): بافر بیکربنات حاوی ٪۱/۵-٪۱ BSA و یا حاوی ٪۳ شیر خشک بدون چربی.

بافر PBS: ۱۰ گرم NaCl، ۱/۴۴ گرم Na2HPO4، ۰/۲۵ گرم KCl، ۰/۲۵ گرم KH2PO4 در یک لیتر آب مقطر pH= ۷/۲.

بافر PBST: بافر PBS حاوی ٪۰/۱ Tween 20.

بافر EIA: PBS حاوی ٪۰/۱ BSA.

محلول بلاک کننده (بلاکر): بافر PBS حاوی ٪۵ شیر خشک بدون چربی.

۳-۱-۶-۳) بافرهای SDS-PAGE

محلول استوک اکریل آمید: ۳۰ گرم اکریل آمید و ۰/۸ گرم بیس اکریل آمید در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و با کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱ صاف شد.

بافر ژل پایین: ۱۸/۲ گرم تریس باز و ۰/۴ گرم SDS در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر. pH=۸/۸.

بافر ژل بالا: ۶/۱ گرم تریس باز و ۰/۴ گرم SDS در ۱۰۰ میلی لیترآب مقطر. pH=۶/۸.

بافر مخزن: ۳ گرم تریس باز، ۱۴/۴ گرم گلیسین و ۱ گرم SDS ئر یک لیتر آب مقطر. pH=۸/۳.

بافر نمونه احیایی ۵X: ۱۰ میلی لیتر بافر ژل بالا ، ۵ میلی لیتر گلیسرول ، یک گرم SDS، ۰/۵ میلی لیتر محلول بروموفنل و ۱ میلی لیتر ۲-مرکاپتواتانل. حجم نهایی بوسیله آب مقطر به ۲۰ میلی لیتر رسانده شد.

محلول ٪۱۰ TEMED: ۱۰۰ میکرولیتر TEMED در ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر به صورت تازه آماده شد.

محلول ۱۰٪ آمونیوم پرسولفات: ۱۰۰ میلی گرم پودر آمونیوم پرسولفات در ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر به صورت تازه تهیه شد.

۳-۱-۶-۴) محلول های رنگ آمیزی کوماسی بلو

محلول رنگ آمیزی کوماسی بلو R۲۵۰: ۰/۲۵ گرم کوماسی R250 بلو در ۱۲۵ میلی لیتر اتانل حل شده و به آن ۲۵ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد.
محلول رنگ بر: ۱۰۰ میلی لیتر متانل، ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر.
محلول نگهداری ژل: ۷٪ استیک اسید در آب مقطر.

۳-۱-۶-۵) بافرهای وسترن بلات

بافر تانک: ۳ گرم تریس باز، ۱۴/۴ گرم گلیسین و ۱۵۰ میلی لیتر متانول با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد.
بافر TBSTT: تریس باز به میزان ۱۵ میلی مولار و NaCl به میزان ۱۵۰ میلی مولار حاوی ۰/۱ درصد Tween-20 و ۰/۱ درصد Triton X-100.
بافر EIA: PBS ۱۰۰ میلی مولار حاوی ۰/۱ BSA.
محلول بلاک کننده (بلاکر): بافر PBS حاوی ۵٪ شیر خشک بدون چربی

۳-۱-۷) آنتی بادیها

۳-۱-۷-۱) ICR62 و ICR61

دو آنتی‌بادی منوکلونال از کلاس IgG2b علیه بخش خارج سلولی EGFR می‌باشند که در موش صحرایی تهیه شده است.

۳-۱-۷-۲) IgG خرگوشی به دست آمده علیه می‌موتوپ متصل به BSA:

این آنتی‌بادی توسط آقای نواری بعد از تزریق می‌موتوپ متصل به BSA به خرگوش به دست آمده است.

۳-۱-۸) محیط کشت های باکتری

محیط کشت LB (pH = ۷) : ۱۰ گرم NaCl و ۵ گرم Yeast extract و ۱۰ گرم Triptone با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد.

محیط کشت LB-Agar : به محیط کشت LB مایع ۱۵ گرم در لیتر آگار اضافه شد.

محیط کشت 2XYT (PH:۷): ۵ گرم NaCl و ۱۰ گرم Yeast extract و ۱۶ گرم Triptone با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد.

محیط کشت 2XYT آگار: : به محیط کشت 2XYT مایع ۱۵ گرم در لیتر آگار اضافه شد.

- محیط ذخیره سازی باکتری

روش تهیه : گلیسرول اتوکلاو شده به میزان ۶۰٪ به محیط LB استریل اضافه می شود و برای هر ۵/۱ میلی لیتر کشت باکتری ، ۰/۵ میلی لیتر از این مخلوط می افزاییم.

استوک تتراسایکلین mg/ml ۱۰ : ۱۰ میلی گرم از پودر تتراسایکلین در یک میلی لیتر اتانل حل شد. غلظت نهایی مورد استفاده: ug/ml۱۰.

استوک کانامایسین mg/ml ۵۰: ۵۰ میلی‌گرم از پودر کانامایسین در یک میلی‌لیتر آب حل شد. غلظت نهایی مورد استفاده: ug/ml۵.

استوک آمپی سیلین mg/ml ۱۰۰: ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به یک گرم پودر آمپی‌سیلین اضافه شد. غلظت نهایی مورد استفاده در نمونه محیط کشت: ug/ml۱۰۰.

۳-۱-۹) محیط‌های کشت سلول جانوری

۳-۱-۹-۱) محیط کشت DMEM

جهت تهیه محیط کشت خام یا ناقص ۱۳/۳۸ گرم پودر DMEM را در یک لیتر آب مقطر چهار بار تقطیر حل نموده و به آن ۳/۷ گرم سدیم بیکربنات و ۱/۱ گرم سدیم پیروات اضافه شد. pH محیط فوق باید حدود ۷/۴ باشد و قبل از استفاده توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرون فیلتر شود. برای ایجاد محیط DMEM کامل ۱۰٪، به ۹۰ میلی‌لیتر محیط خام، ۱۰ میلی‌لیتر FBS[86]، ۶/۱ میلی گرم پنی سیلین، ۱۰ میلی گرم استرپتومایسین و ۰/۰۲ الی ۰/۰۶ گرم L -گلوتامین اضافه شد. لازم به ذکر است آنتی‌بیوتیک‌ها و گلوتامین بصورت ذخیره x ۱۰۰ تهیه و فیلتر می‌شوند و در حجم‌های یک میلی‌لیتر در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در صورتی که در پودر محیط کشت پیرووات و L-گلوتامین موجود باشد نیازی به اضافه کردن آن‌ها وجود ندارد.

۳-۱-۹-۲) روش تهیه تریپسین

۰/۰۵ ٪ تریپسین و EDTA ۵۳ mM را در آب مقطر تهیه نموده، با فیلتر ۰/۲ میکرون فیلتر کرده و پس از تقسیم در ویالهای ml ۱، در ۲۰- نگهداری میکنیم.

[86]- Fetal Bovine Serum

۳-۱-۹-۳) محیط انجماد[87]

FBS به همراه ۱۰٪ DMSO

۳-۱-۸) آنزیمها

آنزیمهای به کار رفته در این پایان‌نامه عبارت بودند ازSfi1, Not1, BamHI و EcoRI که در این میان از آنزیمهای Not1 و Sfi1 جهت کلونینگ در فاژمید و از BamHI و EcoRI جهت کلونینگ در سایر آنزیمها جهت تایید وکتور استفاده شد. برای کلون کردن قطعات نیز از آنزیم T_4 DNA Ligase از شرکت Jena Bioscience استفاده شد.

۳-۱-۹) بافرهای بیان پروتئین

محلول IPTG 1mM: با حل نمودن ۲۳۸ gr پودر IPTG در ۱lit آب مقطر اتوکلاو شده تهیه گردید.
محلول برادفورد: از رنگ کوماسی بلو G-250 به میزان ۵۰mg وزن شده و در ۵۰ml متانول حل گردید. سپس ۱۰۰ml از H3PO4 ۸۵٪ و ۵۰۰ml آب مقطر افزوده گردید. محلول فوق بعد از حل شدن کامل فیلتر شد. مجدداً ۳۵۰ml آب مقطر به محلول افزوده شد. این محلول بعد از تهیه بایست در دمای ۴ درجه نگهداری شود.

۳-۱-۱۰) بافرهای مورد استفاده در تخلیص پروتئین

برای تخلیص پروتئین ۴ بافر به صورت استوک تهیه گردید. سپس در مراحل بعدی بافرهای تخلیص از این چهار بافر استوک به صورت تازه و در همان روز تخلیص تهیه میشدند.

بافر 10x A : ۲۷/۶g از سدیم فسفات منوبازیک به همراه ۲۹۲/۲g از سدیم کلراید در آب مقطر به حجم نهایی ۱lit حل گردید.

بافر 10x B: ۲۸/۴ g سدیم فسفات دیبازیک به همراه ۲۹۲/۹ g سدیم کلراید در ۱lit آب مقطر حل گردید.

بافر تخلیص 5x: ۷g سدیم فسفات منوبازیک، ۲۹/۲g سدیم کلراید در ۱۵۰ml آب حل گردید و سپس pH محلول به ۸ رسانده شد. در نهایت حجم نهایی محلول به ۲۰۰ml رسانده شد.

87- Frezzing

بافر ایمیدازول ۳M ۲۰/۶g ایمیدازول، ۸/۷۷ml از محلول 10x A، ۱/۲۳ ml از محلول 10x B با هم مخلوط شده و pH روی ۶ تنظیم گردید. سپس حجم نهایی به ۱۰۰ ml رسانده شد.

همانگونه که ذکر شد از بافرهای فوق برای تهیه بافرهای تخلیص در همان روز به صورت زیر استفاده شد:

بافر اتصال در شرایط طبیعی: ۶ml از بافر تخلیص 5x، ۱۰۰µl از بافر ایمیدازول ۳M با هم مخلوط شده و pH روی ۸ تنظیم گردید. در نهایت حجم نهایی محلول به ۳۰ml رسانده شد.

بافر شستشوی ستون در شرایط طبیعی: ۱۰ml از بافر تخلیص 5x، ۳۳۵ µl از ایمیدازول ۳M با هم مخلوط شده و pH روی ۸ تنظیم گردید. حجم نهایی به ۵۰ml رسانده شد.

بافر خارجسازی در شرایط طبیعی: ۳ml از بافر تخلیص 5x، ۱/۲۵ml از بافر ایمیدازول ۳M با هم مخلوط شده و pH محلول روی ۸ تنظیم گردید. سپس حجم نهایی به ۱۵ml رسانده شد.

محلول لیز کننده در شرایط دناتوره کننده : ۴۸ g اوره، ۰/۵۸ml محلول 10x A، ۹/۴۲ ml محلول 10x B با هم مخلوط شده و pH روی ۷/۸ تنظیم گردید. سپس حجم نهایی به ۱۰۰ml رسانده شد.

بافر اتصال در شرایط دناتوره کننده: ۴۸/۱g اوره، ۰/۵۸ml محلول 10x A، ۹/۴۲ ml محلول 10x B با هم مخلوط شده و pH روی ۷/۸ تنظیم گردید. در نهایت حجم کلی به ۱۰۰ml رسانده شد.

بافر شستشو در شرایط دناتوره کننده: ۴۸/۱g اوره، ۷/۳۸mlمحلول 10x A، ۲/۶۲ ml محلول 10x B با هم مخلوط شده و pH روی ۶ تنظیم گردید. در نهایت حجم کلی به ۱۰۰ml رسانده شد.

بافر خارجسازی در شرایط دناتوره کننده ۴۸/۱g اوره، ۱۰ml از محلول 10x A با هم مخلوط نموده و pH روی ۴ تنظیم گردید. سپس حجم نهایی به ۱۰۰ml رسانده میشد.

۳-۱-۱۱) بافرهای ایمونوهیستوشیمی

بافر PBS: ۱۰ گرم NaCl، ۱/۴۴ گرم Na2HPO4، ۰/۲۵ گرم KCl، ۰/۲۵ گرم KH2PO4 در یک لیتر آب مقطر pH=۷/۴.

بافر غیر فعال کننده‌ی پراکسیداز داخلی: بافر PBS به همرا ۰/۳٪ H_2O_2

بافر بلاک کننده: PBS به همراه ۱٪ BSA

بافر رقیق کننده: PBS به همراه ۰/۱٪ BSA

محلول سوبسترای DAB

۳-۱-۱۲) وسایل

فلاسک کشت سلولی (25ml، 75ml)، پلیت کشت سلولی (96 well)، میکروتیوب (0.5, 0.2, 1.5, ml)، فالکون (15 ml، 50 ml)، پیپت پاستور، پیپت مدرج (1 ml، 2 ml، 5 ml)، بشر، استوانه مدرج، پلیت الایزا (از نوع Maxisorp محصول Nunc)، کاغذ صافی، فیلتر 0. 2mm مخصوص استریلیزاسیون، سرنگ انسولین، سر سمپلر (زرد، آبی، کریستالی) و ... .

۳-۱-۱۳) دستگاه‌ها

دستگاه سانتریفوژ (دوربالا و معمولی)، انکوباتور، اتوکلاو، ، یخچال، فریزر معمولی و ۷۰- درجه، بیوفتومتر، دستگاه الکتروفورز، سونیکاتور، دستگاه الکتروفور، شیکر، دستگاه قرائت گر الایزا و ...

۳-۲) روش‌ها

۳-۲-۱) تهیه باکتری مستعد شده برای واکنش شیمیایی

۱ - یک تک کلون از باکتری TG1 در ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB به مدت ۱۲ ساعت در $37^{o}C$ به همراه شیک کردن کشت داده شد.

۲ - ۰/۵ml از کشت شبانه فوق به ۵۰ ml محیط مایع LB اضافه شده و به مدت ۳ الی ۴ ساعت (تا زمانی که شدت جذب در ۶۰۰ OD نانومتر به ۰/۵ برسد) در شیکر انکوباتور $37^{o}C$ کشت داده شد.

۳ - کشت باکتری به یک فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد و در دمای $4^{o}C$ و دور ۳۵۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۴ - رسوب حاصل در ۵۰ میلی‌لیتر محلول سرد $CaCl_2$(50 mM) حل شده و ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد.

۵ - سانتریفیوژ مانند مرحله قبل انجام شد.

۶ - رسوب حاصل در ۲۵ میلی‌لیتر محلول سرد $CaCl_2$(50 mM) حل شده و ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد.

۷ - سانتریفیوژ مانند مرحله قبل انجام شد.

۸ - به رسوب حاصل ۱۲ میلی‌لیتر محلول سرد $CaCl_2$(50 mM) اضافه شده و سانتریفیوژ انجام شد.

۹ - رسوب حاصل در ۶۰۰ میلی‌لیتر محلول سرد $CaCl_2$(50 mM) حل شده و در حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری تقسیم شده و از یکی از آنها در همان روز استفاده شد.

به مابقی گلیسرول اضافه و در فریزر ۷۰- ذخیره شدند. برای اطمینان از عدم آلودگی میکروبی باکتری پذیرای (مستعد) تهیه شده ۵۰ µl از آن را روی پلیتهای جامد بدون آنتی بیوتیک و دارای آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین، کانامایسین و تتراسایکلین کشت داده و یک شب در انکوباتور ۳۷°C بطور ساکن قرار دادیم. باکـتری TG1 تنها باید روی پلیت بدون آنتی بیوتیک رشدکند چون ژن مقاومت به هیچ یک ازآنتی بیوتیکها را ندارد. با مشاهده هرگونه آلودگی در پلیتهای فوق، باید میکروتیوبهای حاوی سلولهای پذیرا دور ریخته و معدوم شوند.

۳-۲-۲) انتقال فاژمید به باکتری با روش شیمیایی

۱ - ابتدا باکتری مستعد روی یخ قرار داده شد تا کاملا ذوب گردد.
۲ - ۵ul از محلول حاوی فاژمید به باکتری اضافه شد و با تکانهای آرام مخلوط شد.
۳ - باکتریها به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند.
۴ - به باکتریها به مدت ۴۵ ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلافاصله به یخ منتقل شدند.
۵ - پس از دو دقیقه ۹۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع LB به آنها اضافه شده و به مدت یک ساعت در ۳۷°C به همراه شیک کردن کشت داده شد.
۶ - سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محیط حاوی باکتریها را روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک (آمپی‌سیلین) به مدت ۱۴ ساعت کشت داده می‌شوند. پس از گذشت این زمان باکتریهای دریافت کننده فاژمید روی محیط تشکیل کلونی خواهند داد.

۳-۲-۳) تخلیص پلاسمید

برای تخلیص پلاسمید از کیت شرکت MN استفاده شد. این سیستم بر اساس لیز قلیایی باکتری و اتصال پلاسمید به غشاء سیلیکاژل استوار است. دستور العمل تخلیص پلاسمید در زیر آورده شده است:

۱ - کشت شبانه باکتری به حجم ۵ ml در یک فالکون ۵۰ میلی‌لیتری بمدت ۱۵ دقیقه در rpm ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد.
۲ - پس از خارج نمودن محیط کشت بصورت کامل، رسوب باکتریها در ۲۵۰ µl محلول resuspension حل شده و به یک میکروتیوب منتقل شد.
۳ - ۲۵۰ µl محلول لیزکننده به میکروتیوب اضافه شده و ۶-۴ بار به آرامی بر گردانده شد تا بخوبی مخلوط شود.
۴ - میکروتیوب بمدت حداکثر ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد.

۵ - ۳۵۰ µl محلول خنثی کننده به میکروتیوب افزوده شده و ۱۰-۶ بار به آرامی بر گردانده شده تا به خوبی مخلوط شود.

۶ - در ۴۰۰۰ rpm و دمای ۴°C بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به آرامی به یک ستون تخلیص پلاسمید منتقل شده سپس در ۱۳۰۰۰ rpm بمدت ۶۰ ثانیه سانتویفوژ شده و مایع خارج شده دور ریخته شد.

۷ - به ستون ۷۰۰ µl الکل ۷۰٪ اضافه شده مانند مرحله قبل سانتریفوژ انجام شد.

۸ - ستون بمدت ۱ دقیقه جهت خارج شدن کامل الکل سانتریفوژ شد.

۹ - مقدار ۵۰ µl بافر elutionیا آب مقطر دو بار تقطیر به ستون اضافه شده و بمدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد ، پلاسمید تخلیص شده در مایع خارج شده قرار دارد..

۳-۲-۴) ارزیابی کمی میزان پلاسمیدها

میزان کمی پلاسمید استخراج شده با قرائت جذب نوری (OD) آن در ۲۶۰nm و محاسبه ضریب رقت و ضریب ثابت ۵۰ برای DNA دو رشته‌ای در بیوفوتومتر مشخص گردید.

الکتروفوزر پلاسمید تخلیص شده بر ژل آگازر

پس از اتمام مراحل تخلیص یک میکرولیتر از پلاسمید حاصل روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد.

۳-۲-۵) تایید وکتور فاژمیدی با استفاده از هضم آنزیمی

با توجه به بررسی توالی وکتور در نرم افزارهای کامپیوتری، به منظور تایید وکتور، با آنزیمهای محدود ساز SfiI, NotI, EcoRI, PstI به صورت زیر وکتور مورد تست هضم آنزیمی قرار گرفت:

الف) هضم دوگانه با آنزیمهای EcoR1 وPst1 در $37^{o}C$.

ب) هضم با EcoR1 در $37^{o}C$.

پ) هضم با Pst1 در $37^{o}C$.

ت) هضم با Not1 در $37^{o}C$.

ث) هضم با Sfi1 در $50^{o}C$.

پروتکل هضم آنزیمی در این تحقیق: ۳ میکرولیتر از محصول تخلیص پلاسمید شده ,۲۰ میکرولیتر آب مقطر , ۴ واحدآنزیم , ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم (۱۰X) در یک میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری مخلوط و سپس با توجه به نوع آنزیمها، میکروتیوب در دمای مربوطه در طی یک شب، انکوبه شد.

۳-۲-۶) آماده کردن قطعه کلون شونده

توالی مرجع ژن EGFR از NCBI و توالی پروتئن آن از Uniprot، به دست آمد و با توجه به مطالعات ژن زیر به شمارههای NC_000077.6 و Q01279 به عنوان Ref Seq انتخاب شد و از آن توالی L2 جدا گردید. این توالی با استفاده از لینکر G4S به میموتوپ وصل شد و یک توالی هیستسدین به انتهای آمینی آن اضافه شد. توالی کامل در جدول۱-۳ آمده است.

۳-۲-۷) بررسیهای In Silico

۳-۲-۷-۱) بهینه سازی توالی ژن

بهینه سازی توالی ژن توسط نرم افزار OptimumGeneTM Codon شرکت GeneScript صورت پذیرفت. این نرم افزار توالی نوکلئوتیدی را از نظر Codon Usage، محتوی GC، ساختار ثانویه mRNA، وجود جایگاههای آنزیمی مخل در کلونینگ و ... بررسی میکند.

۳-۲-۷-۲) پیشبینی ساختار دوم mRNA

بررسی ساختار دوم mRNA مربوط به ژن بهینه سازی شده، با استفاده از برنامهی mfold در سایت http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold انجام شد.

۳-۲-۷-۳) بررسی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی پروتیین

برای بررسی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی توالی پروتیئن طراحی شده در صورت بیان بر روی پروتئین ۸ فاژی از نرم افزار ProtParam در http://web.expasy.org/protparam استفاده گردید. توالی پروتئین طراحی شده به همراه توالی پروتئین ۸ فاژی (توالی ۱) و نیز به همراه تگ تیوردوکسین (توالی ۲) به عنوان input به نرم افزار ارائه گردید:

1- HHHHHHQHYNIVNTQSRVGGGGSCTAISGDLHILPVAFKGDSFTRTPPLDPR
ELEILKTVKEITGFLLIQAWPDNWTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVGLNI
TSLGLRSLKEISDGDVIISGNRNLCYANTINWKKLFGGGGSAAEGDDPAKAAFN
SLQASATEYIGYAWAMVVVIVGATIGIKLFKKFTSKA

2-MVKQIESKTA FQEALDAAGD KLVVVDFSAT WCGPCKMIKP VIFLEVDVD
IN DCQDVASECE VKCMPTFQFFKKGQKVGEFS GANKEKLEAT FFHSLSEKYS
ELVHHHHHHQHYNIVNTQSRVGGGGSCTAISGDLHILPVAFKGDSFTRTPPLDR
ELEILKTVKEITGFLLIQAWPDNWTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVGLNI
TSLGLRSLKEISDGDVIISGNRNLCYANTINWKKLF

۳-۲-۷-۴) بررسی میزان آنتیژنسیته

نرمافزار VaxiJen در http://www.darrenflower.info/VaxiJen/ برای محاسبهی میزان خاصیت آنتیژنی سازه به کار رفت.

۳-۲-۷-۵) پیش بینی اپیتوپ های سلول B در ECD-EGFR

برای پیش بینی وجود اپیتوپ های سلول B در توالی قسمت خارج سلولی پروتئین EGFR از نرم افزار (http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/) BCPREDS استفاده گردید. برای این کار کا توالی قسمت خارج سلولی پروتئین EGFR به نرم افزار داده شد م نتایج آنالیز گردید.

۳-۲-۷-۶) بررسی ساختار سوم ECD-EGFR در برهمکنش آن با آنتیبادی Cetuximab و پیش بینی ساختار سومEM-L2

ساختار سه بعدی کمپلکس بین Cetuximab و EGFR از سایت Protein Data Bank (PDB) (http://www.pdb.org/) تحت شماره ی شناسایی PDB ID: 1YY9 گرفته شد. جایگاه اتصال Cetuximab به EGFR با استفاده از نرم افزار Pymol نشان داده شد. توالی های مربوط به میموتوپ، L2 domain از ECD-EGFR و پپتید EM-L2 در جدول ۱-۳ نشان داده شده است. توالی EM-L2 سپس به پایگاه m4t (http://www.fiserlab.org/servers/m4t) برای تعیین ساختار سه بعدی ارائه گردید.

۳-۲-۸) سنتز شیمیایی ژن

نهایتا توالی ژنومی دومین L2 به همراه توالی ژن میموتوپ EGFR و HIS Tag با استفاده از لینکر G4S به هم فیوز و صحت کلونینگ در وکتور مذکور با استفاده از نرم افزار بررسی و جهت سنتز و ساب کلونینگ به شرکت BioMatik ارسال شد. جهت سهولت کار فاژمید نیز به مرکز فرستاده شد (Biomatik, Canada) تا قطعه در داخل وکتور کلون گردد و فاژمید M13-pAK8-VIII-EM.L2 ساخته شود . همزمان پرایمرهای آن نیز طراحی گردید.

۳-۲-۹) پرایمرهای اختصاصی قطعه DNA کد کننده EM-L2

پرایمرهایی که در این راستا انتخاب شدند مبتنی بر توالی قطعه کد کننده می‌موتوپ و توالی وکتور pAK8-GVO77 بودند، طوری که ۲۱ نوکلئوتید سمت ’5 و مکمل ۱۸ نوکلئوتید سمت ’3 به عنوان پرایمر انتخاب شدند. توالی و ویژگیهای آین پرایمرها در زیر آمده است:

Not 1 primer: 5’-ACCCTCTGCGGCCGCGCT-3’

Total number of the bases is 18

% A = 5.56	(1)
% G = 27.78	(5)
% T = 16.67	(3)
% C = 50.00	(9)
% Ambiguous = 0.00	(0)

Sfi1 primer: 5’-TCTATGCGGCCCAGCCGGCC-3’

Total number of the bases is 20

% A = 10.00	(2)
% G = 30.00	(6)
% T = 15.00	(3)
% C = 45.00	(9)

۳-۲-۱۰) انتقال فاژمید M13-pAK8-VIII-EM.L2 به باکتری با روش شیمیایی و تایید سازه

۳-۲-۱۰-۱) کلونی PCR

به منظور شناسایی کلونهای حاوی فاژمید نوترکیب pAK8-GVO77.EM با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه کلون شده واکنش colony PCR برای تایید کلون هایی که روی پلیت رشد کرده بودند، انجام شد. نحوه انجام این واکنش برای هر کلون بصورت زیر می‌باشد:

ابتدا میکس PCR طبق جدول زیر تهیه می شود، سپس تک کلون مورد نظر برداشته شده و به آرامی در میکس PCR حل می‌شود.

جدول ۳-۱) مقادیر مورد استفاده جهت انجام Colony PCR

مقدار (µl)	مواد
1	Forward primer (10 pmol)
1	Reverse primer (10 pmol)
10	Mastermix
13	di H_2o

جدول ۳-۲) چرخه دمایی Colony PCR

تکرار	زمان	دما (درجه سانتیگراد)
۱ سیکل	۵ دقیقه	۹۴
۳۰ سیکل	۳۰ ثانیه	۹۴
	۳۰ ثانیه	۶۲
	۶۰ ثانیه	۷۲
۱ سیکل	۱۰ دقیقه	۷۲

۳-۲-۱۰-۲) PCR روی پلاسمید تخلیص شده از TG1 ترانسفورم شده

پس از مشاهده نتایج Colony PCR یکی از کلونها به منظور تخلیص پلاسمید انتخاب شد. پس از جداسازی پلاسمید از آن به عنوان الگو در PCR استفاده گردید. پروتکل PCR مثل مراحل قبل می‌باشد.

۳-۲-۱۰-۳) هضم‌های آنزیمی روی سازه pAK8-GVO77.EM

پروتکل هضم آنزیمی در این تحقیق: ۳ میکرولیتر از محصول تخلیص پلاسمید شده ,۲۰ میکرولیتر آب مقطر , ۴ واحدآنزیم , ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم (۱۰X) در یک میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری مخلوط و سپس با توجه به نوع آنزیمها، میکروتیوب در دمای مربوطه در طی یک شب، انکوبه شد.

۳-۲-۱۰-۳-۱) هضم آنزیمی بوسیله Sfi1

به منظور بررسی محل برش آنزیم Sfi1، پلاسمید تخلیص شده با این آنزیم در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد بریده شد و محصول برش خورده روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد.

۳-۲-۱۰-۳-۲) هضم آنزیمی بوسیله Not1

به منظور بررسی محل برش آنزیم Not1 پلاسمید تخلیص شده با این آنزیم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بریده شد و محصول برش خورده روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد.

۳-۲-۱۰-۳) هضم دوگانه آنزیمی سازه ساخته شده با Sfi1/Not1

به منظور مشاهده قطعه کلون شده، روی پلاسمید تخلیص شده از همان کلنی طی دو شب با آنزیمهای مورد استفاده در کلونینگ، یعنی Sfi1/Not1 ،هضم دوگانه آنزیمی انجام شد.

۳-۲-۱۰-۴) تست تعیین توالی

پس از تأیید کلونینگ با روش clony PCR و هضم آنزیمی، نمونه پلاسمید تخلیص شده pAK8-GVO77.EM و پرایمرهای اختصاصی قطعه کلون شده برای تعیین توالی به صورت دو طرفه به شرکت DNAbiotech ارسال شد.

۳-۲-۱۱) گرفتن استوک از باکتری حاوی سازه pAK8-EM.L2-GVO

پس از محرز شدن صحت روند کار، از کلونهای انتخاب شده در محیط کشت مایه LB به همراه گلیسرول ۵۰ درصد استوک تهیه شد و در فریزر ۷۰- ذخیره گردید.

۳-۲-۱۲) تکثیر و تخلیص فاژکمکی

در ادامه جهت اجرای پایان نامه نیاز به فاژکمکی داشتیم که جهت تکثیر آن مطابق زیر عمل شد:

۱ - داخل ۵ میلی‌لیتر محیط کشت 2XYT باکتری E.coli TG1 را کشت و اجازه داده شد تا OD آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۹-۰/۷ برسد.

۲ - مقداری از باکتری رشد کرده در پلیت 2XYT آگاردار به عنوان کنترل منفی کشت داده شد.

۳ - ۵۰ میکرولیتر از استوک فاژ کمکی به آن اضافه شد.

۴ - فالکون حاوی باکتری ۳۰ دقیقه بدون شیک و ۳۰ دقیقه با شیک در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

۵ - محتویات فالکون به ارلن حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط 2XTY اضافه و به آن ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین افزوده شد.

۶ - ارلن حاوی محیط کشت۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد به همراه شیک انکوبه شد.

۷ - مجددا به آن ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین افزوده و سپس به مدت سه روز ارلن حاوی محیط کشت در ۳۷ درجه سانتیگراد به همراه شیک انکوبه شد.

۸ - پس از آن محتویات ارلن داخل فالکونهای ۵۰ میلی‌لیتری تقسیم و در دمای ۴ درجه سانتیگراد و سرعت rpm ۳۸۰۰ به مدت۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۹ - مایع رویی به فالکونهای استریل جدید منتقل و در حمام آب گرم ^{oc} ۷۰ به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شدند.

۱۰ -فالکونها و در دمای ۴ درجه سانتیگراد و سرعت rpm ۳۸۰۰ به مدت۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۱۱ -مایع رویی به فالکونهای استریل جدید منتقل و به آنها سدیم آزید (۰/۵ گرم به ازای هر لیتر) افزوده شد.

۱۲ -فالکونهای حاوی فاژ کمکی به عنوان استوک در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۳-۲-۱۳) تیتراسیون فاژکمکی

در این تحقیق از روش رقت سازی متوالی جهت تعیین تیتر فاژها استفاده شد:

۱ - ۸ عدد میکروتیوب استریل ۱/۵ میلی‌لیتری انتخاب و روی آنها به ترتیب از ۱ تا ۸ شماره گذاری شد.

۲ - در میکروتیوب شماره یک ۹۰۰ میکرولیتر و در بقیه ۹۹۰ میکرولیتر محیط 2XYT ریخته شد.

۳ - از استوک فاژی خوب ورتکس شده ۱۰۰ میکرولیتر به میکروتیوب شماره یک اضافه و پس از ورتکس کردن، از آن ۱۰ میکرولیتر به میکروتیوب شماره ۲ اضافه شد.این کار تا میکروتیوب شماره ۸ ادامه می‌یابد.

۴ - رقت‌هایی که بدین ترتیب حاصل می‌شوند بدین قرارند:

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
رقت	$۱۰^{-۱}$	$۱۰^{-۳}$	$۱۰^{-۵}$	$۱۰^{-۷}$	$۱۰^{-۹}$	$۱۰^{-۱۱}$	$۱۰^{-۱۳}$	$۱۰^{-۱۵}$

۵ - در سه میکروتیوب استریل دیگر ۹۰۰ میکرولیتر باکتری Ecoli.TG1 به OD ۰/۸ رسیده ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات لوله‌های ۴، ۶ و ۸ به آنها اضافه شد. رقت نهایی این لوله‌ها به ترتیب عبارتند از: $۱۰^{-۸}$، $۱۰^{-۱۲}$ و $۱۰^{-۱۶}$.

۶ - سپس این سه میکروتیوب ۳۰ دقیقه بدون شیک و ۳۰ دقیقه با شیک در دمای ۳۷^{o} C انکوبه شدند.

۷ - میکروتیوبها در ۴۰۰۰ rpm و دمای ۴^{o} C سانتریفیوژ شدند.

مایع رویی دور ریخته شده و رسوب آنها رو پلیت‌های حاوی 2XYT آگاردار آمپی‌سیلین، به صورت چمنی کشت و پلیت‌ها در دمای ۳۷^{o} C انکوبه شدند. در روز بعد با توجه به رشد باکتریها در پلیت‌ها تیتر فاژها محاسبه گردید.

۳-۲-۱۴) تکثیر و تخلیص نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده پپتید نوترکیب EM-L2

در این مرحله از باکتری حاوی فاژمید M13-pAK8-VIII-EM.L2 به عنوان عامل سازنده نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده پپتید نوترکیب EM-L2 استفاده شد و مابقی کارها روی آن انجام گرفت.

۱ - داخل ۵ میلی‌لیتر محیط کشت 2XYT حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ،باکتری E.coli TG1 حاوی فاژمید نوترکیب را کشت و اجازه داده شد تا OD آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۹-۰/۷ برسد.

۲ - به آن ۲۰۰ میکرولیتر فاژ کمکی اضافه شد.

۳ - سپس ۳۰ دقیقه بدون شیک و ۳۰ دقیقه با شیک در دمای $37^{o}C$ انکوبه شد.

۴ - ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm و دمای $4^{o}C$ سانتریفیوژ شد.

۵ - مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصله ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت 2XYT اضافه شد.

۶ - محتویات فالکون به ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط 2XTY اضافه و به آن ۵۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۷۵ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین افزوده شد.

۷ - ارلن حاوی محیط کشت۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد به همراه شیک انکوبه شد.

۸ - به آن مجدداً ۵۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۷۵ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین افزوده شد.

۹ - ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط 2XTY به مدت ۱۲ ساعت در 31^{oc} به همراه شیک کردن انکوبه شد.

۱۰ -محتویات ارلن به فالکونهای استریل ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و در ۴۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۱۱ -مایع رویی به فالکونهای استریل دیگری منتقل شد و یک پنجم حجمشان به آنها محلول PEG (20% Polyethylene glycol 6000, 2.5 M NaCl) اضافه و ۲ ساعت در دمای $4^{o}C$ انکوبه شد.

۱۲ -سانتریفیوژ در دور ۱۹۰۰۰ rpm و دمای $4^{o}C$ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد.

۱۳ -مایع رویی دور ریخته شده و رسوب فاژی به وسیله PBS استریل شسته شد.

۳-۲-۱۵) آلوده کردن باکتری E.coli TG1 با نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده پپتید نوترکیب EM-L2 تخلیص شده.

برای حصول اطمینان از وجود فاژ در رسوب به دست آمده پس از تخلیص نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده می‌موتوپ EGFR ، باکتری E.coli TG1 فاقد فاژمید با آنها آلوده شد و سپس باکتری ۳۰ دقیقه بدون شیک و ۳۰ دقیقه با شیک در دمای 37^{o} C انکوبه و از نظر مقاومت به آمپی‌سیلین بررسی شد.

۳-۲-۱۶) تیتراسیون نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده می‌موتوپ EGFR

تیتراسیون نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده می‌موتوپEGFR و نیز نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده قسمتی از پروتئین β2m به عنوان کنترل مطابق روش ۲-۲-۱۳-۲ انجام گرفت.

۳-۲-۱۷) اثبات نمایش می‌موتوپEGFR روی سطح نانوذرات شبه فاژی

در این مرحله از آنتی‌بادیهای ICR61، ICR62، IgG خرگوشی علیه می‌موتوپ متصل به BSA و آنتی بادی غیر مرتبط در تست الایزا استفاده شد.

۳-۲-۱۷-۱) انجام تست الایزای فاژ

۱ - دو میکروگرم از آنتی‌بادیهای ICR61، ICR62، IgG خرگوشی علیه می‌موتوپ متصل به BSA و ۵ میکروگرم از آنتی بادی غیر مرتبط در ۱۰۰ میکرولیتر بافر بیکربنات رقیق و در چاهک‌های الایزا به صورت دوبله در طی یک شب و در دمای 4^{o} C کت شد.

۲ - آنتی‌بادی اضافه همراه بافر بیرون ریخته و پلیت چندین بار محکم روی حوله تمیز تکانده شد.

۳ - چاهک‌ها با بافر بلاک کننده کاملاً پوشانده شده و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای 37^{o} C انکوبه شدند.

۴ - پلیت‌ها ۳ بار با TBST ۰/۵ درصد شستشو داده شدند.

۵ - فاژهای تازه تخلیص و تیتر شده موجود در ۱۰۰ میکرولیتر smPBS (skim milk) به آنتی‌بادیها اضافه شد. تیتر فاژهای اضافه شده 10^{14} pfu/ml در نظر گرفته شد.

۶ - به مدت یک ساعت به آرامی در دمای اتاق انکوبه شدند.

۷ - چاهک‌ها ۸ بار با ۰/۵٪ TBST و ۲ بار با TBS معمولی شسته شدند.

۸ - آنتی M13 متصل به HRP از شرکت Pharmacia با بافر EIA به میزان ۱:۱۰۰۰۰ رقیق شده و ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد.

۹ - یک ساعت در $37^{o}C$ همراه با تکان انکوبه شد.

۱۰ - ۸ بار شستشو با ۰/۵٪ TBST و ۲ بار با TBS انجام گرفت.

۱۱ - ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا TMB به هر چاهک اضافه شد.

۱۲ - ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در $37^{o}C$ انکوبه گردید (زمان انکوباسیون با توجه به مشاهده اختلاف رنگ حاصله از چاهک تست و شاهد می‌تواند متفاوت باشد).

۱۳ - با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر HCl ۴ نرمال واکنش متوقف شد.

۱۴ - قرائت OD با دستگاه قرائت‌گر الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر انجام شد.

۳-۲-۱۷-۲) انجام آزمون الایزا با آنتیبادی علیه تگ هیستیدین روی فاژ نمایش دهنده پپتید EM-L2

با توجه به وجود تگ هیستیدین در پپتید EM-L2، جهت تایید وجود پپتید EM-L2 در سطح فاژ میتوان از آنتیبادی علیه تگ هیستیدین در آزمون الایزا نیز بهره برد.

روش کار:

۱ - 10^{12} ذره فاژی در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر PBS حل و در چاهک‌های پلیت الایزا اضافه شد. پلیت یک شب در $37^{o}C$ نگهداری شد.

۲ - محتویات پلیت خشک شده، ۳ تا ۵ بار با PBS شست و شو داده شد.

۳ - باقی مانده محتویات چاهک ها با کوباندن بر روی دستمال کاغذی تمیز خالی شد(Tapping).

۴ - ۲۵۰ میکرولیتر بافر بلاک کننده (شیر خشک بدون چربی ۵٪) به چاهک ها اضافه شد به طوری که چاهک ها تقریباً پر شدند.

۵ - پلیت به مدت ۱/۵ ساعت در $37°C$ قرار داده شد.

۶ - مراحل ۲ و ۳ تکرار شد.

۷ - آنتی بادی کونژوگه با HRP (abcam) با رقت مورد نظر به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به صورت دوتایی (Duplicate) اضافه شد.

۸ - پلیت به مدت یک ساعت در $37°C$ قرار داده شد.

۹ - مراحل ۲ و ۳ تکرار شد.

۱۰ - سوبسترای TMB به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در $37°C$ نگهداری شد تا واکنش رنگی به میزان مناسب پیش رود.

۱۱ - واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از HCl ۴ نرمال به هر چاهک متوقف شد.

جذب نوری در 450nm قرائت شد.

۳-۲-۱۸) سابکلونینگ ژن کد کننده پپتید EM-L2 در وکتور بیانی pET32a

۳-۲-۱۸-۱) انجام واکنش PCR برای ژن EM-L2

به منظور خارج کردن ژن EM-L2 از وکتور M13-pAK8-VIII-EM.L2، با استفاده از پرایمر های اختصاصی این ژن که حاوی جایگاه برشی آنزیم های BamHI و EcoRI هستند واکنش PCR طبق مقادیر جدول ۲-۲ آماده شد. انتظار می رود محصول حدود ۴۶۵ جفت بازی تولید شود.

۳-۲-۱۸-۲) استخراج قطعه تکثیر شده از ژل آگارز

برای این کار از کیت DNA Fragment Clean up شرکت Intron Biotechnology استفاده شد که بر اتصال قطعات DNA به ستون سیلیکا استوار است.

برای تخلیص این قطعه از ژل به صورت زیر انجام شد:

۱. سه برابر وزن ژل بافر BNL بدان اضافه شد و برای ۱۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۵۵ قرار گرفت. هر ۲-۳ دقیقه مخلوط واکنش ورتکس شد تا ژل به طور کامل حل شود.

۲. به علت کوچکی قطعه ۱/۵ حجم از ایزو پروپانول نیز اضافه شد و با پیپتینگ به خوبی مخلوط شد.

۳. محصول به روی ستون سیلیکا منتقل شد.

۴. به منظور اتصال DNA به ستون سانتریفوژ در دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه انجام شد.

۷۰۰.۵ میکرولیتر از بافر Washing اضافه شد.

۶. سانتریفوژ مانند مرحله قبل انجام شد.

۷. به منظور خشک شدن ستون سانتریفوژ مانند مرحله قبل انجام شد.

۸. ستون در تیوب استریل قرار گرفت.

۴۰.۹ میکرولیتر از بافر Elution بدون تماس نوک سر سمپلر با ستون به مرکز آن اضافه شد و برای ۱ دقیقه در در دمای اتاق قرار گرفت.

۱۰.سانتریفوژ مانند مرحله قبل انجام شد.

۳-۲-۱۸-۳) هضم آنزیمی وکتور pET32a و آماده کردن آن برای کلونینگ

به منظور برش وکتور pET32a و ایجاد انتهاهای چسبنده از هضم آنزیمی با دو آنزیم EcoRI و BamHI استفاده شد و وکتور خطی شد. مخلوط واکنش با مقادیر زیر آماده شد و پس از انجام واکنش مانند مرحله قبل وکتور ران شده روی ژل آگارز با استفاده از کیت DNA Fragment Clean up استخراج گردید.

جدول ۳-۳) مقادیر واکنش هضم آنزیمی ژن بیانی

مواد	مقدار (ul)
DNA	۲۵
Buffer K	۴
EcoRI	۱/۵
BamHI	۱/۵
DDW	۸

۳-۲-۱۸-۴) انجام واکنش لیگاسیون بین وکتور pET32a خطی شده و ژن EM-L2

انتهاهای چسبنده دو سوی ژن و وکتور خطی شده سازگار بوده لذا شرایط لیگاسیون ژن به وکتور مهیا می باشد. برای انجام این واکنش از نسبت Insert 3: Vector 1 استفاده شد و طبق فرمول زیر غلظت قطعه کلون شونده محاسبه شد:

ng of vector × Kb of inser / Kb of vector × 3/1 = ng of vector

در ادامه مخلوط واکنش مطابق جدول۳-۴ آماده شد.

جدول۳- ۴) مقادیر واکنش لیگاسیون

مواد	مقدار (ul)
insert	۲۴
Vector	۸
Buffer	۴
T4 DNA Ligase	۲
DDW	۲

۳-۲-۱۸-۵) ترانسفورماسیون محصول لیگاسیون به باکتری BL21

تهیه باکتری مستعد و ترانسفورماسیون با محصول لیگاسیون طبق روند قبلی انجام شد و باکتری های ترانسفورم شده روی محیط حاوی آمپی سیلین کشت داده شدند.

۳-۲-۱۹) تایید ساب کلونینگ ژن مورد نظر در کلنی های ترانسفورم شده

۳-۲-۱۹-۱) کلنی PCR

مرحله اول تایید ساب کلونینگ قطعه به داخل وکتور pET32a از طریق انجام واکنش Colony PCR با استفاده از پرایمر های یونیورسال پروموتر T7 صورت می گیرد. برای انجام Colony PCR ابتدا مخلوط واکنش مطابق جدول ۲-۵ آماده شد و سپس با نوک سر سمپلر بخشی از هر کلون وارد واکنش شد. همچنین روی پلیت دارای آمپی سیلین از هر کلون Back up تهیه شد. واکنش طبق چرخه دمایی جدول ۲-۲ انجام شد. در کلون های مثبت پس از واکنش قطعه ای به طول حدود ۱۱۵۰ جفت باز حاصل خواهد شد.

۳-۲-۱۹-۲) تایید ساب کلونینگ با انجام واکنش هضم آنزیمی دوگانه به منظور خارج کردن قطعه مورد نظر

با استفاده از کیت شرکت Intron Biotechnology از یکی از کلون های مثبت (کلون شماره ۵)در Colony PCR تخلیص پلاسمید انجام شد و طبق روند قبلی برش آنزیمی دو گانه با آنزیم های EcoRI و BamHI انجام شد، انتظار می رود قطعه ۴۶۵ جفت بازی خارج شود.

جدول ۳-۵) مقادیر واکنش هضم آنزیمی تاییدی

مواد	مقدار (ul)
DNA	۲۰
Buffer K	۳
EcoRI	۱
BamHI	۱
DDW	۵

۳-۲-۲۰) بیان ژن سنتتیک در میزبان E.coli و مشاهده آن در ژل SDS

۳-۲-۲۰-۱) القای بیان ژن

برای بیان ژن مورد نظر در میزبان E.coli به صورت زیر عمل شد:

۱. ابتدا از کلونی که مثبت بودن آن در PCR و واکنش هضم آنزیمی تایید شده است، کشت ۵ میلی لیتری حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین به مدت ۸ ساعت در $37\ ^{o}C$ همراه با شیک انجام شد. در شرایط مشابه باکتری بدون وکتور نیز کشت داده شد.

۲. در ادامه مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از کشت اولیه به دو کشت ۵ میلی لیتری حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین منتقل شد و کشت در شرایط مشابه ادامه پیدا کرد. در محیط دیگری باکتری BL21 فاقد وکتور به عنوان کنترل منفی کشت داده شد.

۳. کشت مورد نظر تا رسیدن به OD حدود ۰/۶ ادامه پیدا کرد.

۴. پس از رسیدن به OD مورد نظر به یکی از دو کشت مقدار ۵۰ میکرولیتر از IPTG اضافه شد به طوری که غلظت نهایی آن در کشت ۱ میلی مولار باشد. سپس کشت به مدت ۴ ساعت در شرایط مشابه ادامه پیدا کرد.

۳-۲-۲۰-۲) آماده سازی نمونه

۱. پس از اتمام مدت زمان کشت، فالکون های کشت در یخ قرار گرفته و مقدار ۱ میلی لیتر از هرکدام به تیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. سپس سانتریفوژ ۳۵۰۰ r.p.m به مدت ۵ دقیقه در ^{o}C ۴ انجام شد.

۲. مایع رویی خارج شد و رسوب باکتری در ۵۰ میکرولیتر بافر سالین (pH 7.0) مجددا حل شد و سانتریفوژ مانند مرحله قبل انجام شد.

۳. رسوب باکتری در بافر لیز حل شد.

۴. سونیکاسیون در سه مرحله ۱ دقیقه ای با با فاصله زمانی ۲ دقیقه انجام شد.

۵. محلول به دست آمده مانند شرایط قبلی سانتریفوژ شده و محلول رویی که حاوی پروتئین های محلول است، جدا گردید.

۶. رسوب حاصل که حاوی پروتئین های انکلوزیونی می باشد، مجددا در بافر فسفات حل شده و تحت شرایط قبلی تحت سونیکاسیون قرار گرفت.

۷. محلول به دست آمده مانند شرایط قبلی سانتریفوژ شده و محلول رویی که در این مرحله حاوی پروتئین های نا محلول است، جدا گردید.

۸. سنجش مقادیر پروتئین موجود در نمونه به روش برادفورد انجام شد.

۹. مقدار ۲۰ میکروگرم از هر نمونه با ۵ میکرولیتر از بافر نمونه به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد.

تعیین مقادیر بهینه فاکتورهای مختلف برای القای بیان

۳-۲-۲۰-۳) تعیین دمای بهینه برای القا

ابتدا کشت اولیه از باکتری مورد نظر به روش قبلی آماده شد و ۲/۵ میلی لیتر از آن به ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط LB حاوی آمپی سیلین تلقیح شد. پس از رسیدن به OD مورد نظر IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار اضافه شد و محیط به سه فالکون منتقل شد. فالکون ها به ترتیب در دمای ۱۸، ۲۵ و ۳۰ سانتی گراد به مدت ۴ ساعت کشت داده شدند. از رسوب حاصله جهت تخلیص پروتئین و بررسی میزان بیان استفاده شد.

۳-۲-۲۰-۴) تهیه ژل های SDS-PAGE

برای تهیه ژل پایین مطابق جدول۳-۶ و برای تهیه ژل بالا مطابق جدول ۳-۷ عمل شد.

جدول ۳-۶) مقادیر مربوط به تهیه ژل تفکیک کننده ی SDS-PAGE

	بافر ژل پایین	محلول آکریل آمید	آب مقطر	محلول ٪۱۰TEMED	محلول آمونیوم پر سولفات ٪۱۰
ژل ٪ ۱۲/۵	۳ ml	ml ۴/۹	ml ۴/۱	ml ۰/۰۵	ml ۰/۰۵

جدول ۳-۷) مقادیر مربوط به تهیه ژل متراکم کننده ی SDS-PAGE

	بافر ژل بالا	محلول آکریل آمید	آب مقطر	محلول ٪۱۰TEMED	محلول آمونیوم پر سولفات ٪۱۰
ژل ٪ ۴	۱/۲۵ ml	ml ۰/۶۵	ml ۳/۰۵	ml ۰/۰۵	ml ۰/۰۱

۳-۲-۲۰-۵) رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو

ژل پس از شست و شو با آب مقطر به مدت ۳۰ دقیقه در محلول رنگ آمیزی قرار گرفت.

محلول رنگ آمیزی خارج شده و پس از شست و شوی مجدد با آب مقطر محلول رنگ بر اضافه شد.

۳-۲-۲۰-۶) تخلیص پروتئین محلول با استفاده از ستون Ni-NTA

۳-۲-۲۰-۶-۱) آماده سازی لیزات باکتری

۱. پلت باکتری به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت.

۲. پلت در حد اقل ۴ میلی لیتر بافر لیز حاوی ایمیدازول ۱۰ میلی مولار حل شد. (۲-۵ میلی لیتر به ازای هر گرم وزن خشک)

۳. لیزوزیم به مقدار mg/ml ۱ اضافه شد و لیزات به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت.

۴. لیزات برای ۴ مرتبه ۵ دقیقه ای با فاصله زمانی ۱ دقیقه تحت سونیکاسیون قرار گرفت.

۵. سانتریفوژ در دور g ۱۰۰۰ به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه در دمای $^{C^{\circ}}$ ۴ انجام شد.

۶. مایع رویی که حاوی پروتئین های محلول می باشد برای تخلیص پروتئین جدا شد. بخشی از آن برای مشاهده روی ژل SDS-PAGE نگه داری شد.

۳-۲-۲۰-۶-۲) متعادل سازی ستون

۱. ۱ میلی لیتر از ماده Ni-NTA (۰/۵ میلی لیتر حجم بستر) به فالکون ۱۵ میلی لیتری منتقل شد و پس از سانتریفوژ کوتاه مایع رویی دور ریخته شد.

۲. ۲ میلی لیتر از بافر لیز به بستر اضافه شده و پس از معکوس کردن آرام فالکون سانتریفوژ مجدد انجام شده و مایع رویی دور ریخته شد.

۳-۲-۲۰-۶-۳) تخلیص پروتئین

۱. چهار میلی لیتر از لیزات به بستر اضافه شد و به آرامی با شیک در دمای $^{\circ}C$ ۴ به مدت ۱ ساعت مخلوط شد.

۲. مخلوط روی ستون لود شد. بخشی از خروجی ستون برای بررسی در ژل SDS-PAGE جمع آوری شد.

۳. بستر دو بار هر بار با ۲/۵ میلی لیتر از بافر شست و شو شسته شد. بخشی از خروجی ستون برای بررسی در ژل SDS-PAGE جمع آوری شد.

۴. پروتئین مورد نظر چهار بار هر بار با ۰/۵ میلی لیتر از بافر elution خارج شد و برای بررسی در ژل SDS-PAGE نگه داری شد.

۳-۲-۲۰-۶-۴) شارژ مجدد ستون نیکل

۱. رزین با ۱۰ برابر حجم بستر با آب مقطر شسته شد.

۲. رزین با ۱۰ برابر حجم بستر با محلول EDTA ۱۰۰ میلی مولار شسته شد.

۳. رزین با ۱۰ برابر حجم بستر با آب مقطر شسته شد.

۴. رزین با ۱۰ برابر حجم بستر با بافر شست و شو شسته شد.

۵. رزین با ۱۰ برابر حجم بستر با آب مقطر شسته شد.

۶. رزین با ۱۰ برابر حجم بستر با محلول NiSO4 ۱۰۰ میلی مولار اضافه شد.

۷. رزین با ۱۰ برابر حجم بستر با آب مقطر اضافه شد.

۸. ده برابر حجم بستر اتانول ۲۰٪ به رزین اضافه شد. برای نگه داری رزین اجازه می دهیم قبل از خروج کامل کمی از اتانول روی رزین باقی بماند.

۳-۲-۲۰-۷) تخلیص پروتئین نامحلول با استفاده از ستون نیکل

۳-۲-۲۰-۷-۱) آماده سازی نمونه

۱.رسوب سلولی از ۱۰۰ میلی لیتر کشت در ۴ml بافر Resuspension حل شد.

۲. سونیکاسیون سه مرتبه هر بار به مدت ۵ دقیقه با فواصل زمانی ۱ دقیقه روی یخ انجام شد.

۳. سانتریفوژ دور بالا به مدت ۱۰ دقیقه در ^{o}C ۴ انجام شد.

۴. پلت در ۳ml بافر جداسازی سرد حل شد.

۵. سونیکاسیون مانند مراحل قبل انجام شد.

۶. سانتریفوژ دور بالا به مدت ۱۰ دقیقه در ^{o}C ۴ انجام شد.

۷. مراحل ۶-۴ تکرار شد.

۳-۲-۲۰-۷-۲) محلول کردن پروتئین

۱.پلت در ۵ml بافر محلول سازی حل شد.

۲. نمونه ۶۰-۳۰ دقیقه در دمای اتاق حل زده می شود.

۳. سانتریفوژ دور بالا به مدت ۱۰ دقیقه در ^{o}C ۴ انجام شد.

۴. ذرات اضافی با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی حذف گردید.

۳-۲-۲۰-۷-۳) رناتوراسیون و تخلیص

۱. میلی لیتر رزین رزین نیکل با ml ۵ آب مقطر شسته شد.

۲. ۵۰۰ میکرولیتر نیکل سولفات ۰/۱M اضافه شد.

۳. ستون با ۵ml آب مقطر شسته شد.

۴. ستون با ۱۰-۵ میلی لیتر بافر محلول سازی متعادل شد.

۵. نمونه لود شده و ستون با ml ۱۰ بافر محلول سازی شسته شد.

۶. ستون با ۱۰ml بافر رناتوراسیون شسته شد.

۷. ستون با شیب غلظتی اوره ۰-۶ با حجم ۳۰-۱۰ میلی لیتر شسته شد.

۸. پس از پایان یافتن شیب اوره ۵ml بافر شست و شو اضافه شد.

۹. شست وشوی ستون با ۲۰-۱۰ میلی لیتر از بافر شست و شو انجام شد.

۱۰. جداسازی پروتئین از ستون با اضافه کردن ۲۰-۱۰ میلی لیتر از بافر Elution انجام شد.

۳-۲-۲۱) تایید پروتئین تخلیص شده پس از بیان در باکتری

با توجه به اینکه پپتید نوترکیب EM-L2 دارای تگ هیستسدین است برای تایید پروتئین تخلیص شده پس از بیان در باکتری از دو آزمون الایزا و وسترن بلات استفاده گردید.

۳-۲-۲۱-۱) الایزا با آنتیبادی علیه تگ هیستیدین روی پپتید EM-L2 بیان شده در باکتری

روش کار:

۱ - دو میکروگرم از پپتید تخلیص شده در ۱۰۰ میکرولیتر از بافر PBS حل و در چاهک‌های پلیت الایزا اضافه شد. پلیت یک شب در 37^{o} C نگهداری شد. از BSA به عنوان کنترل استفاده گردید.

۲ - محتویات پلیت خشک شده، ۳ تا ۵ بار با PBS شست و شو داده شد.

۳ - باقی مانده محتویات چاهک ها با کوباندن بر روی دستمال کاغذی تمیز خالی شد(Tapping).

۴ - ۲۵۰ میکرولیتر بافر بلاک کننده (شیر خشک بدون چربی ۵٪) به چاهک ها اضافه شد به طوری که چاهک ها تقریباً پر شدند.

۵ - پلیت به مدت ۱/۵ ساعت در ۳۷°C قرار داده شد.

۶ - مراحل ۲ و ۳ تکرار شد.

۷ - آنتی بادی کونژوگه با HRP (abcam) با رقت مورد نظر به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به صورت دوتایی (Duplicate) اضافه شد.

۸ - پلیت به مدت یک ساعت در ۳۷°C قرار داده شد.

۹ - مراحل ۲ و ۳ تکرار شد.

۱۰ - سوبسترای TMB به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷°C نگهداری شد تا واکنش رنگی به میزان مناسب پیش رود.

۱۱ - واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از HCl ۴ نرمال به هر چاهک متوقف شد. جذب نوری در 450nm قرائت شد.

۳-۲-۲۱-۲) وسترن بلات روی پروتئین تخلیص شده

برای انجام وسترن بلات ابتدا طبق روند قبلی ژل SDS تهیه و پروتئین ها روی آن تفکیک شدند، ولی این بار رنگ آمیزی انجام نمی شود تا روی ژل وسترن بلات انجام شود.

۱. پروتئین های تفکیک شده بر روی ژل در شدت جریان ۰/۵ آمپر به مدت ۱/۵ ساعت به کاغذ نیترو سلولز منتقل شدند.

۲. کاغذ نیترو سلولز به مدت ۱۶ ساعت در محلول بلاک کننده قرار گرفت.

۳. کاغذ یک بار با PBST شست و شو داده شد.

۴. کاغذ به مدت ۱/۵ ساعت در بافر EIA حاوی آنتی بادی علیه His-tag همراه با شیک قرار داده شد.

۵. کاغذ دوبار با TBST و یک بار با PBS انجام شد.

۶. کاغذ در محلول سوبسترای TMB قرار داده شد تا زمانی که باند ها ظاهر شدند. ختم واکنش با اضافه کردن آب مقطر انجام شد.

۳-۲-۲۲) ایمن‌سازی موش بمنظور بررسی پتانسیل ایمنی‌زایی آنتیژن‌ها

۱۲ سر موش BALB/c به ۴ گروه ۲ تایی برای تزریق تقسیم شدند.

۱- به گروه EM-L2 فاژ نمایش دهنده پپتید EM-L2 را با تیتر 10^{12}pfu در 150µl PBS تزریق شد.
۲- به گروه C (کنترل) فاژ نمایش دهنده پپتید β2m (غیر مرتبط) را با تیتر 10^{12}pfu در 150µl PBS تزریق شد.
۳- به گروه peptid-L2، ۱۰۰ میکروگرم پپتید EM-L2 بیان شده در باکتری در 150µl PBS تزریق شد.
۴- به گروه PBS، 150µl PBS تزریق شد.
تزریقات به صورت زیر پوستی و به مدت یک ماه و در روزهای ۱، ۱۰، ۱۷، ۲۴ و ۳۰ صورت گرفت. تزریقات برای فاژها بدون ادجوانت و برای پپتید EM-L2 با ادجوانت کامل و ناقص فروند انام پذیرفت.

۳-۲-۲۳) جمع‌آوری سرم حیوانات

یک هفته پس از آخرین تزریق حیوانات را بیهوش کرده و سپس خونگیری مستقیما از چشم انجام شد. میکروتیوب‌های حاوی خون حیوانات در دمای ۳۷°C به مدت یک ساعت نگهداری شده و سپس با سانتریفوژ دور ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سرم جدا شد. سرمهای جداسازی شده در 20°C- نگهداری شد.

۳-۲-۲۴) خونگیری از موشها و انجام الایزا جهت ایمن شدن موشهای BALB/c جهت بررسی پتانسیل ایمنی‌زایی آنتیژنهای تزریق شده

بمنظور بررسی پتانسیل ایمنی‌زایی ذرات مختلف فاژی تست ELISA با استفاده از سرم حیوانات ایمن شده و آنتیژن تزریقی به آنها انجام شد. پروتکل الایزا که در این بخش توضیح داده می شود اساس کلی این تست در این تحقیق است و در هر بخشی جزئیات متفاوت توضیح داده می‌شود.
روش کار:
۱ -دو میکروگرم از آنتی ژن و یا $۱۰^{۱۲}$ ذره فاژی در۱۰۰ میکرولیتر از بافر PBS حل و در چاهک‌های پلیت الایزا اضافه شد. پلیت یک شب در ۳۷^{o} C نگهداری شد.
۲ -محتویات پلیت خشک شده، ۳ تا ۵ بار با PBS شست و شو داده شد.
۳ -باقی مانده محتویات چاهک ها با کوباندن بر روی دستمال کاغذی تمیز خالی شد(Tapping).
۴ -۲۵۰ میکرولیتر بافر بلاک کننده (شیر خشک بدون چربی ۵٪) به چاهک ها اضافه شد به طوری که چاهک ها تقریباً پر شدند.
۵ -پلیت به مدت یک ساعت در ۳۷°C قرار داده شد.
۶ -مراحل ۲ و ۳ تکرار شد.

۷ -آنتی بادی اولیه با رقت مورد نظر به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به صورت دوتایی (Duplicate) اضافه شد.

۸ -پلیت به مدت نیم ساعت با شیک و نیم ساعت بدون شیک در ۳۷°C قرار داده شد.

۹ -مراحل ۲ و ۳ تکرار شد.

۱۰ - آنتی بادی ثانویه (آنتی‌بادی ضد آنتی‌بادی موشی) متصل به HRP با رقت‌های ۱/۱۵۰۰۰، ۱/۲۰۰۰۰ و ۱/۳۰۰۰۰ تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد.

۱۱ - پلیت به مدت نیم ساعت با شیک و نیم ساعت بدون شیک در ۳۷°C قرار داده شد.

۱۲ - سوبسترای TMB به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷°C نگهداری شد تا واکنش رنگی به میزان مناسب پیش رود.

۱۳ - واکنش با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از HCl ۴ نرمال به هر چاهک متوقف شد.

۱۴ - جذب نوری در 450nm قرائت شد.

۳-۲-۲۵) بررسی وجود آنتی بادی علیه پپتید EM-L2 در موشهای BALB/C ایمن شده با فاژ نمایش دهنده EM-L2

جهت بررسی تولید آنتی بادی علیه پپتید، دو رقت ۱/۱۰۰۰ و ۱/۴۰۰۰ سرم موشها در تست الایزا به کار گرفته شد. پپتید EM-L2 بیان شده در باکتری E.Coli به عنوان آنتیژن و سرم موشهای گروه PBS و C به عنوان کنترل به کار رفتند. پروتکل الایزای پپتید این بخش مشابه مرحله قبل است.

۳-۲-۲۶) کشت و آماده‌سازی سلول‌های LL/2

۱- پس از خروج سلول‌ها از تانک ازت به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM+10% FBS منتقل شد و برای ۶ دقیقه در 1000rpm سانتریفوژ شد. سپس رسوب سلولی به یک فلاسک T-25 حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM+12. 5% FBS منتقل شد و در انکوباتور قرار گرفت. به منظور آماده‌سازی سلول‌ها به مقدار کافی برای ایجاد تومور در حیوان، ابتدا سلول‌های LL/2 به منظور تهیه استوک‌های منجمد از سلول‌های LL/2، کشت داده شد که در موقع نیاز این استوک‌ها احیا شده و برای تولید و آماده‌سازی سلول به مقدار کافی مورد استفاده قرار گیرند.

۲-سلول‌های LL/2 تا رسیدن به تراکم ۹۰٪ کشت داده شدند.

۳- سلول‌ها تریپسینه شده و شمارش شدند.

۴- سلول‌ها بمدت ۶ دقیقه در 1000rpm سانتریفوژ شدند.

۵- به رسوب سلولی به ازای هر یک میلیون سلول یک میلی‌لیتر محیط انجماد (FBS + 10% DMSO) اضافه شد.

۶- سلول‌ها به کرایوتیوب منتقل شدند و ۲ ساعت در 20°C-، ۲ ساعت در 70°C- نگهداری شدند و سپس به تانک ازت منتقل شدند.

۳-۲-۲۷) ایجاد مدل تومور EGFR در حیوانات

این کار در مورد حیوانات گروه پیش‌گیری کنندگی ۲ هفته بعد از آخرین تزریق واکسن فاژی و برای حیوانات گروه درمانی قبل از ایمن‌سازی انجام شد.

۱-سلول‌های LL/2 در فلاسک‌های T-75در محیط کشت کامل (DMEM+10% FBS) تا تجمع ۸۰٪ کشت داده شدند.

۲- محیط کشت فلاسک‌های کاملا خالی شد و سلول‌ها با 5ml محیط کشت DMEM خام شستشو داده شدند.

۳- به لایه سلولی 2ml محلول Trypsine 0.25%/ EDTA 2mM اضافه شد و فلاسک‌ها به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفتند.

۴- به فلاسک‌های تریپسینه شده 5ml محیط کشت کامل اضافه شد و با پیپتینگ سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند.

۵- سلول‌ها شمارش شدند.

۶- سلول‌ها به فالکون‌های 50ml منتقل شدند و در 1200rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شدند.

۷- محیط کشت دور ریخته شد و رسوب سلولی دو بار، هربار با 10ml محیط کشت خام سرد شسته شدند.

۸- پس از طی مراحل شستشو به رسوب سلولی به مقداری DMEM خام اضافه شد که در هر 100µl حجم سوسپانسیون سلولی $۱۰^۶$ سلول وجود داشته باشد.

۹- سلول‌ها با استفاده از سوزن 18G داخل سرنگ‌های انسولین به حجم‌های 100µl کشیده شد، و سرنگ روی یخ قرار داده شد.

۱۰ -سوسپانسیون سلولی به حجم 100µl معادل $۱۰^۶$ سلول به پهلوی چپ هر موش C57BL/6 به صورت زیر جلدی تزریق شد.

۳-۲-۲۸) مانیتورینگ تومور[88]

بعد از تشکیل تومور در موش‌ها، روند رشد تومور در حیوانات مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور اندازه تومور در هر موش در تمام گروهها هفتهای دو بار اندازه‌گیری گردید. اندازه گیری توسط کالیپر دیجیتال[89] صورت گرفت و حجم تومور با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۹۷]:

$$\text{Tumor volume } (mm^3) = ½ \text{ A } (mm) \times B^2 \ (mm^2)$$

با استفاده از این فرمول حجم تومور بر حسب میلیمتر مکعب (mm^3) برابر است با: حاصل بزرگترین قطر طولی (A) × توان ۲ بزرگترین قطر عرضی (B) تقسیم بر ۲.

۳-۲-۲۹) ایمن‌سازی موش‌های مدل توموری

تعداد ۳۲ سر موش C57BL/6 ۶ هفتهای ماده به دو گروه درمانی و پیش‌گیری کنندگی تقسیم شدند که مجددا هرکدام از این دو گروه به چهار گروه ۴ تایی تقسیم شدند.

۳-۲-۲۹-۱) گروه پیش‌گیری

در جدول ۲-۸ تعداد موش‌ها در هر گروه و ماده تزریقی به آنها مربوط به گروه پیش‌گیری آورده شده است.

جدول ۳-۸) تعداد موش‌ها و نحوه ایمن‌سازی آنها در گروه پیش‌گیری

گروه	p-EM-L2	p-Peptid	p-C	p-PBS
تعداد	۴	۴	۴	۴
ایمن‌سازی	EM-L2 displaying phage	EM-L2 peptid	β2m displaying phage	PBS
تزریق سلول	یک میلیون سلول به هر موش (S. C)			

۱- به گروه p-EM-L2، 10^{12}pfu در PBS 150µl فاژ نمایش دهنده پپتید EM-L2 در هر بار، تزریق شد.

۲- به گروه p-Peptid، 100 میکروگرم پپتید EM-L2 بیان شده در باکتری در PBS 150µl تزریق شد.

۳- به گروه p-C فاژ غیر مرتبط نمایش دهنده β2m با تیتر 10^{12}pfu در PBS 150µl در هر بار، تزریق شد.

88- Tumor monitoring

89- Digital caliper

۴- به گروه p-PBS ، PBS 150µl در هر بار، تزریق شد.

تزریقات به مدت یک ماه و در چهار نوبت به صورت زیر پوستی انجام گرفت. یک هفته پس از آخرین تزریق سلول‌های تومورزای LL/2 تزریق گردید. P نشان دهنده prophylactic است.

۳-۲-۲۹-۲) گروه درمانی

در جدول ۲-۹ تعداد موش‌ها در هر گروه و ماده تزریقی به آنها مربوط به گروه درمانی آورده شده است.

جدول ۳-۹) تعداد موش‌ها و نحوه ایمن‌سازی آنها در گروه درمانی

گروه	t-EM-L2	t-Peptid	t-C	t-PBS
تعداد	۴	۴	۴	۴
تزریق سلول	یک میلیون سلول به هر موش (S. C)			
ایمن‌سازی	EM-L2 displaying phage	EM-L2 peptid	β2m displaying phage	PBS

۱- به گروه p-EM-L2، 10^{12}pfu در PBS 150µl فاژ نمایش دهنده پپتید EM-L2 در هر بار، تزریق شد.

۲- به گروه p-Peptid، 100 میکروگرم پپتید EM-L2 بیان شده در باکتری در PBS 150µl تزریق شد.

۳- به گروه p-C فاژ غیر مرتبط نمایش دهنده β2m با تیتر 10^{12}pfu در PBS 150µl در هر بار، تزریق شد.

۴- به گروه p-PBS ، PBS 150µl در هر بار، تزریق شد.

تزریقات بعد از اینکه تومور قابل لمس شد، هفته‌ای یکبار برای چهار هفته و بصورت زیر پوستی صورت گرفت. t نشان دهنده therapeutic است.

۳-۲-۳۰) بررسی نرخ بقا[90]

برای بررسی عملکرد واکسن پپتیدی و فاژی علاوه بر روند رشد تومور، نرخ بقا نیز توسط آزمون Log-Rank (Mantel–Cox) مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار زمان مرگ هر حیوان ثبت میشود و در پایان آزمایش روند مرگ و میر حیوانات در هر گروه مورد ارزیابی قرار میگیرد.

90- Survival rate

۳-۲-۳۱) ارزیابی وضعیت سیستم ایمنی موشهای C57BL/6

بمنظور بررسی فعال شدن سیستم ایمنی هومورال و سلولی اقدام به اندازه‌گیری مقدار سایتوکاین‌های IL-4 و IFN-γ در سرم حیوانات ایمن شده با واکسن فاژی و پپتیدی گردید.

۳-۲-۳۱-۱) آزمایش سنجش سایتوکاینی

تهیه بافر شستشو[1] برای الایزا

- مواد لازم

بافر PBS

شوینده Tween 20(Sigma, USA)

- روش تهیه

مقدار ۵۰۰ میکرولیتر Tween 20 در حجم کمی از PBS به خوبی حل شد و حجم نهایی با PBS به یک لیتر رسانده شد. محلول حاصل بر روی همزن و با استفاده از مگنت به خوبی مخلوط شد. بدین ترتیب، محلول ۰/۰۵ درصد PBS-Tween بدست می آید.

تهیه محلول متوقف کننده[2] برای الایزا

- مواد لازم

اسید سولفوریک (H_2SO_4) (Merck, Germany)

آب مقطر بدون یون

- روش تهیه

مقدار ۲/۷۸ میلی‌لیتر از اسید سولفوریک در آب مقطر بدون یون حل و حجم نهایی به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به این ترتیب اسید سولفوریک ۲ نرمال تهیه شد. این بافر در سنجش همه سایتوکاین ها مورد استفاده قرار گرفت. برای سنجش سایتوکاین های IL-4 وINfγ از کیت های الایزای ساندویچ و طبق دستور پیشنهادی شرکت سازنده (Ebioscience) استفاده شد. آزمون بر اساس دستورالعمل ذکر شده توسط خود شرکت انجام گرفت.

۱ - حجم لازم از آنتی بادی پوشاننده پلیت طبق دستور توصیه شده در داخل کیت، در بافر PBS تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن، در هر چاهک پلیت الایزا ریخته شده و پس از پوشاندن روی آن، پلیت به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شد.

---

[1] Washing buffer
[2] Stop solution

۲ -چاهک ها سه بار و هر بار با حجم ۲۵۰ میکرولیتر بافر شستشو شدند. در تمام مراحل پس از شستشو، آبگیری با کوبیدن پلیت روی چند لایه دستمال کاغذی و گاز انجام گرفت.

۳ -چاهک ها با ریختن ۲۵۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده به مدت ۱ ساعت، در دمای اتاق، بلوک شدند.

۴ -چاهک ها مانند مرحله قبل شسته شده، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتیبادی رقیق شده به صورت دوتایی به چاهک ها اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند

۵ - پس از شستشو مطابق مراحل قبل، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی شناسایی کننده که طبق دستور کیت در محلول رقیق کننده تهیه شده بود در تمام چاهک ها ریخته شد و انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انجام گرفت.

۶ - چاهک ها مطابق مراحل قبل شسته شدند. بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیم که به نسبت ۱ به ۲۰۰ در بافر رقیق کننده تهیه شده بود، به تمام چاهک ها اضافه و پلیت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق، در تاریکی انکوبه شد.

۷ -چاهک ها مطابق قبل شسته شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترای TMB به هر چاهک اضافه شده و ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق در تاریکی انجام گرفت.

۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر چاهک اضافه شده و جذب نوری در طول موج های ۴۵۰ نانومتر(جذب اختصاصی) و ۵۷۰ نانومتر(جذب رفرانس) بوسیله دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. در انتها، به منظور رسیدن به غلظت سایتوکاین، با استفاده از غلظت و جذب نوری استانداردها منحنی استاندارد رسم شده و بر آن اساس غلظت IL-4 وINfγ بر حسب پیکوگرم در میلی لیتر بدست آمد

۳-۲-۳۲) تهیه بافت و رنگ آمیزی

۱- ابتدا بافت مورد نظر از موش جدا شده و مقداری از آن داخل فرمالین خنثی انداخته شد.

۲- آن بافت داخل دستگاه پروسسور بافت[93] قرار گرفت و قالب پارافین از آن تهیه گردید.

۳- از قالب پارافینی توسط دستگاه میکروتوم برش در حد ۵-۷ میکرون تهیه شد. این برش تهیه شده روی لام قرار داده شد و اجازه دادیم تا خشک گردد.

۴- لام در دمای ۶۵°C قرار داده شد تا زمانی که پارافین آن کاملا ذوب گردد.

۵- دپارافینه کردن: لام در محلول XyleneI و II و در هر کدام به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت.

۶- آبدهی: لام در محلول الکل به شرح ذیل قرار گرفت:

اتانول ۱۰۰٪ به مدت ۵ دقیقه

93- Tissue processor

اتانول ۹۶٪ به مدت ۵ دقیقه

اتانول ۹۰٪ به مدت ۵ دقیقه

اتانول ۸۰٪ به مدت ۵ دقیقه

اتانول ۷۰٪ به مدت ۵ دقیقه

۷- لام به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر آب کشی گردید.

۸- لام به مدت ۱۰ دقیقه درون رنگ هماتوکسیلن قرار داده شد.

۹- لام به مدت ۱۰ دقیقه زیر شیر آب، آب کشی شد.

۱۰- لام رنگ شده چند ثانیه در محلول اسید-الکل قرار داده شد.

۱۱- لام به مدت ۳ دقیقه زیر شیر آب، آب کشی شد.

۱۲- سپس به مدت ۲۰ ثانیه در رنگ مخالف[94] در ائوزین قرار داده شد.

۱۳- آبگیری: لام در محلول الکل به شرح ذیل قرار گرفت:

اتانول ۷۰٪ به مدت ۳ دقیقه

اتانول ۸۰٪ به مدت ۳ دقیقه

اتانول ۹۶٪ به مدت ۳ دقیقه

اتانول ۱۰۰٪ به مدت ۳ دقیقه

۱۴- شفاف‌سازی بافت در محلول XyleneI و II هر کدام به مدت ۵ دقیقه.

۱۵- چند قطره چسب بر روی لام ریخته شد و لامل روی آن قرار داده شد تا برای مدت طولانی قابل نگهداری باشد.

۳-۲-۳۳) ایمونوهیستوشیمی

۳-۲-۳۳-۱) تهیه بافت در قالب پارافین

ابتدا مراحل ۱ تا ۷ از پروتکل ۲-۲-۲۷ انجام شد و سپس به شرح ذیل ادامه پیدا کرد:

۸- برای اینکه محلولها به صورت یکنواخت روی بافت قرار بگیرند و همچنین مواد کمتری مصرف شود، با استفاده از Dako Pen یک دایره هیدروفوب دور بافت روی لام کشیده شد.

- نکته اینکه از این پس هیچگاه لام نباید خشک بشود.

۹- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر بلاک کننده به هر لام اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد.

۱۰- شستشوی لام با بافر شستشو ۳ بار و هر بار به مدت ۲ دقیقه انجام گردید.

94- Counterstain

۱۱- سرم بز ۱٪ به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر لام اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید.

۱۲- مرحله ۱۰ تکرار شد.

۱۳- سپس بمنظور غیر فعال‌سازی پروکسیداز بافتی H_2O_2 3% به میزانی که روی بافت پوشانده شود ریخته شد و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.

۱۴- مرحله ۱۰ تکرار شد.

۱۵- به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی اولیه با غلظت مورد نظر روی بافت ریخته و ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد.

۱۶- مرحله ۱۰ تکرار شد.

۱۷- آنتی‌بادی ثانویه HRP کونژوگه با رقت ۱: ۱۰۰۰ به میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی هر بافت ریخته شد. لام به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.

۱۸- مرحله ۱۰ تکرار شد.

۱۹- محلول DAB بعنوان سوبسترای آنزیم به هر لام اضافه شد و ۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه گردید.

۲۰- سپس DAB با کج کردن لام و تکاندن آن از روی لام خارج گردید و لام به مدت ۳۵ ثانیه در محلول رنگ هماتوکسیلن غوطه ور گردید.

۲۱- سپس لام به مدت ۱ دقیقه با آب مقطر شسته شد.

۲۲- آبگیری: لام در محلول الکل به شرح ذیل قرار گرفت:

اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه

اتانول ۸۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه

اتانول ۹۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه

اتانول ۱۰۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه

۲۳- شفاف‌سازی بافت در محلول XyleneI و II هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه.

۲۴- چند قطره چسب بر روی لام ریخته شد و لامل روی آن قرار داده شد تا برای مدت طولانی قابل نگهداری باشد.

۳-۲-۳۳-۲) تهیه بافت در OCT و تهیه Frozen section

۱- بافت مورد نظر از موش جدا شد و قطعات کوچک از آن جدا شد و داخل بلوک آلمینیومی حاوی OCT قرار گرفت.

۳- بلوک برای چند دقیقه داخل مخزن نیتروژن قرار داده شد و سپس در فریزر 70°C- قرار گرفت.

۱- از بلوک تهیه شده از بافت، با استفاده از دستگاه Cryostat مقطع گیری شد و مقاطع روی لام منتقل شد.

۲- لام‌ها برای ۱۰ دقیقه در استون سرد قرار داده شد تا بافت فیکس شود و در هوای آزاد خشک شد.

۳- روی اسلایدها با مقداری PBS پوشانده شد و برای ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت.

۴-با کج کردن و تکان دادن لام PBS به طور کامل از روی لام دور ریخته شد.

از این پس از مرحله ۸ پروتکل بخش ۲-۲-۲۸-۱ کار ادامه پیدا کرد.

۳-۲-۳۴) آنالیز آماری

در این پروژه آنالیز تستهای مقایسهای با استفاده از Student's t test انجام شد. نتایج مربوط به آنالیز رشد تومور توسط آزمون One-way ANOVA همراه با تست تعقیبی Dunnett's multiple comparison صورت گرفت. همچنین در آزمایش نرخ survival حیوانات پس از ایجاد تومور از تست Log-Rank (Mantel–Cox) test برای معنادار بودن نتایج بهره گرفته شد. در بررسی و تفسیر نتایج آزمایشها مقادیر P.value<۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنی دار در نظر گرفته شد. آنالیز آماری و رسم تمام شکلها در این پروژه با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism version 5.04 انجام گرفت.

95- Optimum cutting temperature

96- Comparative analyses

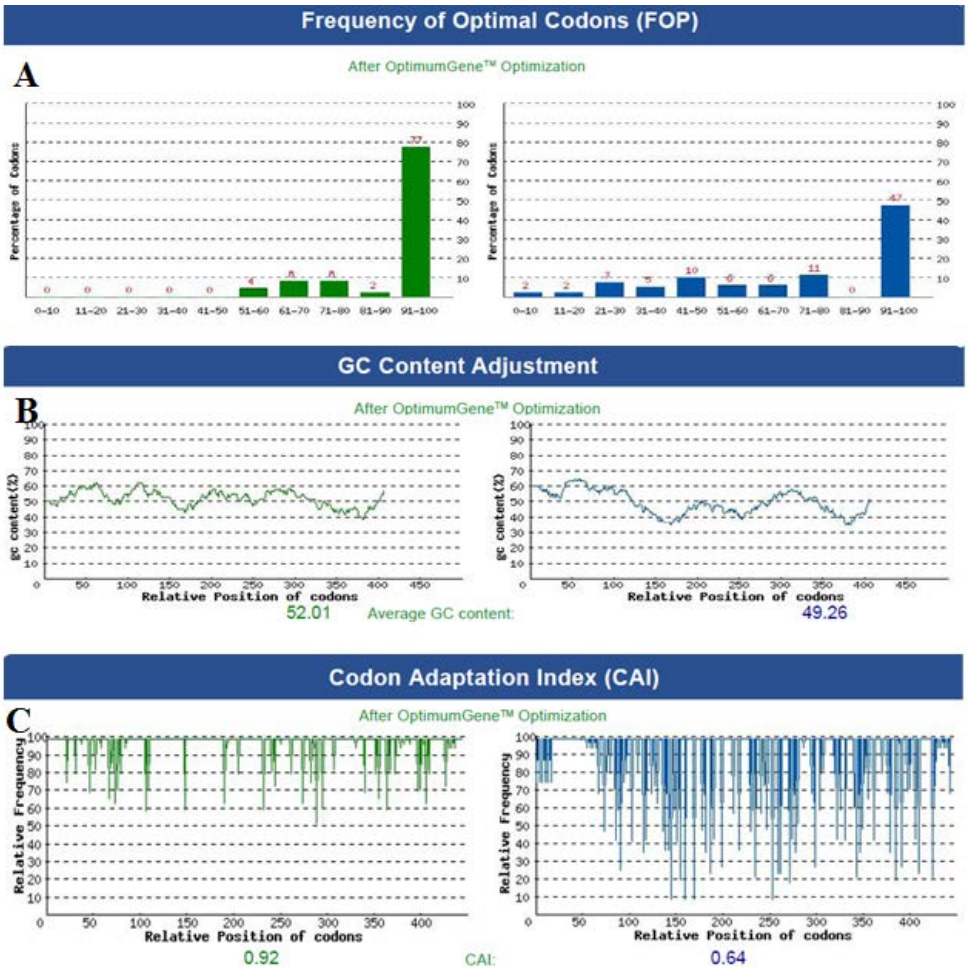
فصل چهارم
نتایج

۴) فصل چهارم: نتایج

۴-۱) نتایج مربوط به مطالعات in silico

۴-۱-۱) نتایج مربوط بهینه سازی توالی ژن

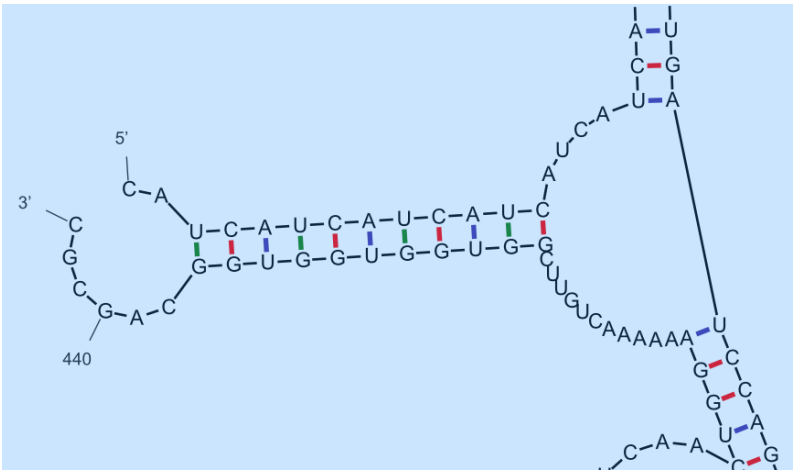
بهینه سازی توالی ژن توسط نرم افزار OptimumGeneTM Codon شرکت GeneScript صورت گرفت که نتایج آن نشان دهنده ی بهبود توالی از لحاظ نوع کدون های مورد استفاده برای بیان بهتر در میزبان مورد نظر می باشد. از طرف دیگر برخی توالی هایی که امکان ایجاد اخلال در بیان ژن را دارند در صورت وجود حذف شدند. شکل ۴-۱ برخی از نمودار های بهبود ویژگی های توالی ژن می باشد.



شکل ۴-۱) بهینه سازی توالی قطعه DNA بیان کننده پپتید EM-L2. A: بهینه سازی کدونها از نظر فراوانی. B: بهینه سازی محتوای GC. C: بهینه سازی سازگاری نسبی کدونها

۴-۱-۲) پیشبینی ساختار دوم mRNA

بررسی ساختار دوم mRNA مربوط به ژن بهینه سازی شده نشان می دهد که mRNA این ژن از پایداری خوبی (dG=-145) برخوردار است. در ضمن انتهای ۵ این مولکول در ساختار ثانویه خاصی قرار ندارد و به راحتی می تواند در اختیار ریبوزوم برای ترجمه قرار گیرد.شکل زیر که بخشی از ساختار سه بعدی پیش بینی شده توسط نرم افزار mfold با فرمت خروجی *Structure Drawing Mode* بوده و نشان دهندهی محل انتهای ۵ و ۳ این مولکول می باشد.



شکل ۴-۲) بررسی ساختار دوم mRNA ژن بهینه سازی شده با نرمافزار mfold

۴-۱-۳) بررسی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی پروتئین

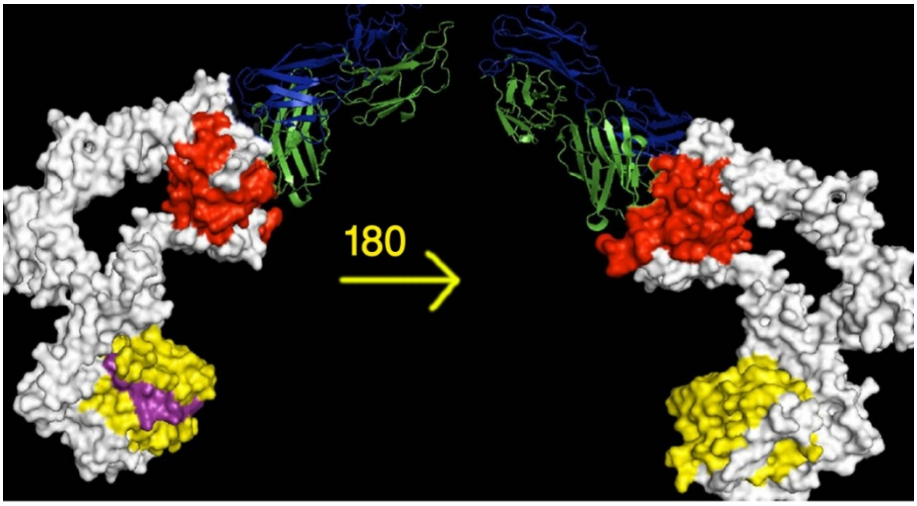
انجام بررسی بر روی پروتئین طراحی شده به همراه پروتئین ۸ فاژی که به همراه هم بیان خواهند شد نشان می دهد که پروتئین بیان شده از پایداری لازم برخودار است و به ترتیب در سلول های یوکاریوتی، مخمری و باکتریایی دارای نیمه عمری برابر با ۴ ساعت، ۱۰ دقیقه و ۱۰< ساعت خواهد بود. همین بررسیها بر روی پروتئین بیان شده در باکتری به همراه تگ تیوردوکسین نشان داد که این پپتید نیز از پایداری خوبی برخوردار است و نیمه عمر آن در سلول های یوکاریوتی، مخمری و باکتریایی به ترتیب ۳۰، ۲۰ < و ۱۰ < میباشد.

۴-۱-۴) بررسی میزان آنتیژنسیته

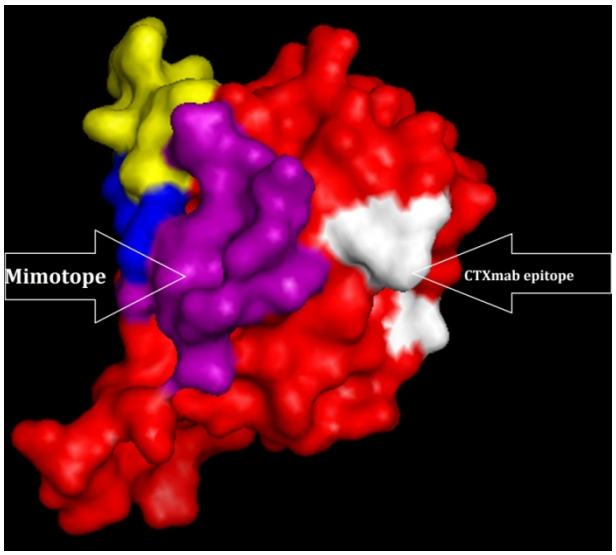
بررسی آنتی ژنسیته ی پروتئین طراحی شده نشان می دهد که پروتئین طراحی شده با امتیاز آنتی ژنسیتهی 0.6091 می تواند یک آنتی ژن قوی بوده و پاسخ ایمنی را به خوبی تحریک نماید.

۴-۱-۵) بررسی ساختار سوم ECD-EGFR در برهمکنش آن با آنتیبادی Cetuximab و پیش بینی ساختار سومEM-L2

شکل ۴-۳ نشان می دهد که محل اتصال بین Cetuximab و L2 domain EGFR می باشد. ضمنا این بررسی نشاد نیدهد که میموتوپ EGFR مشابه قسمتی از دمین L1 است. ساختار سه بعدی توالی پروتئینی EM-L2 نیز با استفاده از نزم افزار m4t به دست آمد (شکل ۴-۴).



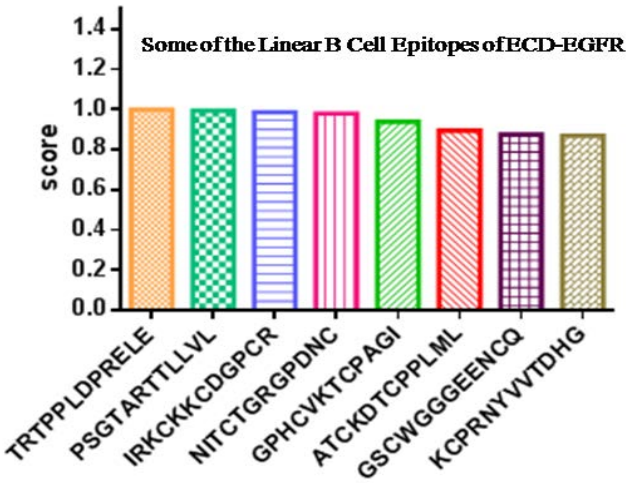
شکل ۴-۳) ساختار دومین خارج سلولی EGFR در کمپلکس با بخش Fab از cetuximab/Erbitux/IMC-C225 (PDB ID: 1YY9) با نرم افزار Paymol. بخش Fab با نمایش ribbon به رنگ سبز و آبی نشان داده شده است. بخشی از کمپلکس که با نمایش سطح توپر نشان داده شده است مربوط به دومین خارج سلولی EGFR می باشد. قسمت قرمز رنگ EGFR مربوط به دومین L2 می باشد. اپیتوپ (بنفش) موجود بر روی دومین L1 (زرد) که دارای ویژگی های مشابه با میموتوپ می باشد در شکل نشان داده شده است.



شکل ۴-۴) ساختار پیش بینی شده ی پپتید EM-L2 . بخش بنفش رنگ مربوط به میموتوپ، بخش زرد رنگ مربوط به نشان هیستیدینی، بخش آبی رنگ مربوط به لینکر G4S و بخش قرمز رنگ مربوط به دومین L2 می باشد. روی دومین L2 اپیتوپی که با سینوکسیمب واکنش میدهد نشان داده شده است.

۴-۱-۶) پیش بینی اپیتوپ های سلول B در ECD-EGFR

توالی قسمت خارج سلولی پروتئین EGFR در نرم افزار BCPREDS (http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/) بررسی گردید. نتایج نشان داد که بیشترین امتیاز در این زمینه مربوط به اپیتوپ "TRTPPLDPRELE " میباشد که در دومین L2 قرار دارد.



شکل ۴-۵) پیشبینی اپیتوپهای خطی قسمت خارج سلولی پروتئین EGFR در نرم افزار BCPREDS. بیشترین امتیاز در این راستا مربوط به اپیتوپی در دومین L2 است.

۴-۲) نتایج مربوط به تخلیص پلاسمید

بعد از گرفتن وکتور pAK8-GVO به منظور بررسی آن، وکتور به باکتری E.coli TG1 ترانسفورم شد. سپس باکتری پذیرنده این وکتور در ۵ میلی‌لیتر محیط LB کشت داده شد تا وکتور تکثیر شود. به وسیله کیت تخلیص پلاسمید شرکت MN فاژمیدها تخلیص و یک لاندا از آنها جهت سنجش و مشاهده روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورزشد. غلظت پلاسمید تخلیص شده در این مرحله حدود ۵۰۰ ng/ µl می باشد (شکل۱-۳) .

شکل ۴-۶) الکتروفورز محصول تخلیص پلاسمید pAK8-GVO از باکتری E.coli TG1

۴-۳) نتایج تایید وکتور فاژمیدی با استفاده از هضم آنزیمی

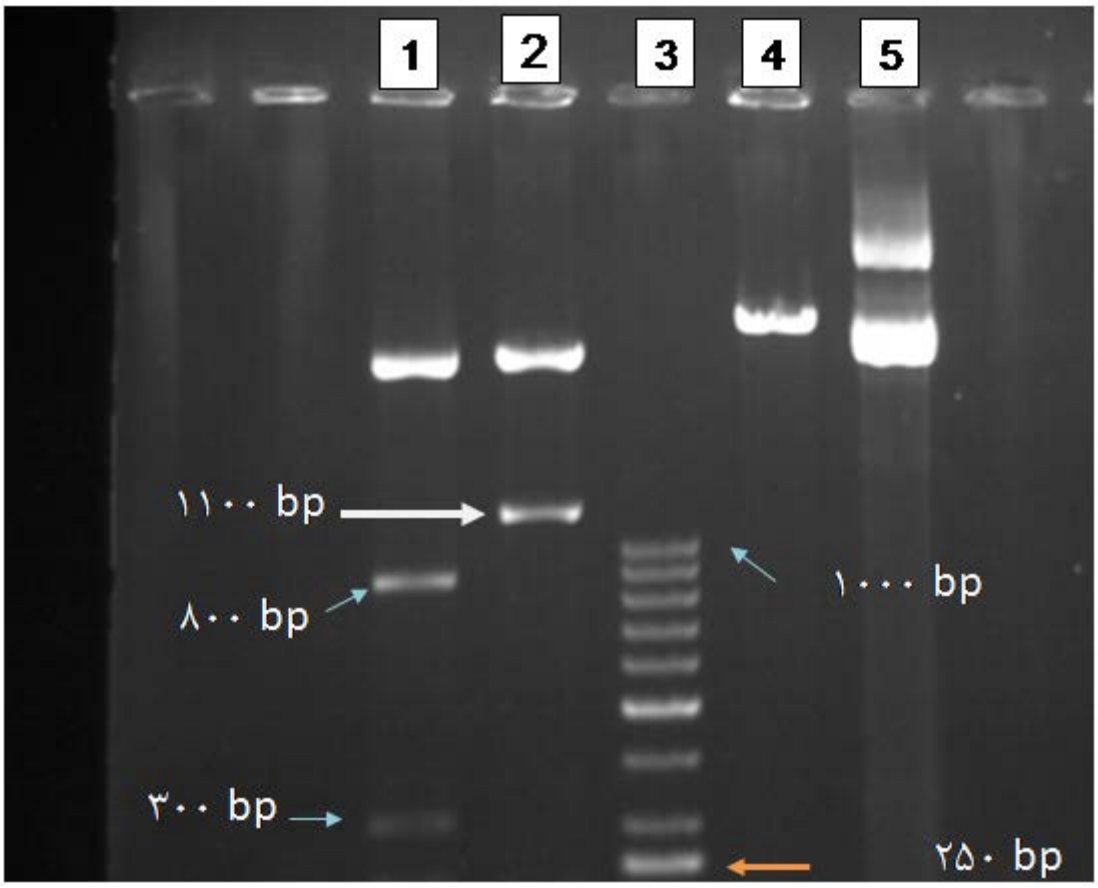
با توجه به بررسی توالی وکتور در نرم افزارهای کامپیوتری، به منظور تایید وکتور، با آنزیمهای محدود ساز Sfi1, Not1, EcoR1, Pst1 مورد تست هضم آنزیمی قرار گرفت. درزیر نتایج مربوط به این تست آورده شده است.

۴-۳-۱) نتایج مربوط به هضم آنزیمی با EcoR1, Pst1 ، Pst1/EcoR1

۱ - با آنزیم Pst1 وکتور باید خطی شود.

۲ - با آنزیم EcoR1 یک قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی از وکتور خارج می‌شود.

۳ - در هضم دوگانه با Pst1/EcoR1 یک قطعه ۸۰۰ جفت بازی و یک قطعه ۳۰۰ جفت بازی از وکتور خارج می‌شود.(شکل ۳-۴)



شکل ۴-۷) نتایج الکتروفورز پس از هضم آنزیمی با EcoR1, Pst1 ، Pst/EcoR1 .

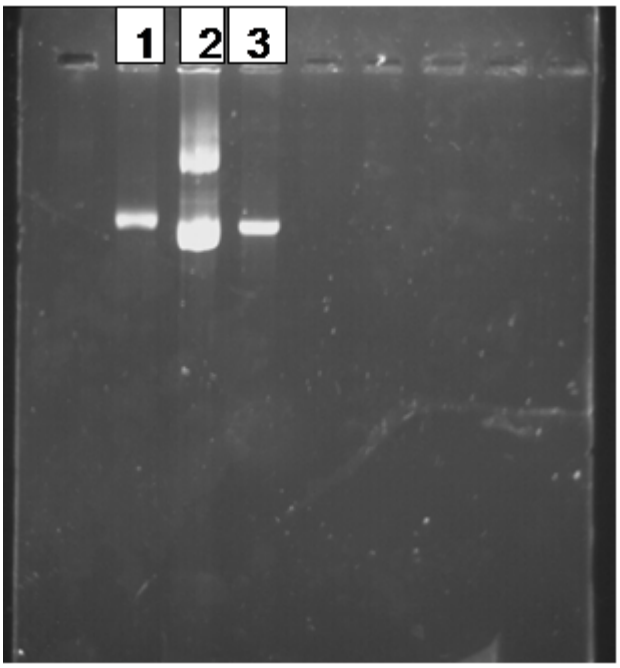
ستون ۱) در هضم دوگانه با Pst1/EcoR1 . ستون۲) با آنزیم EcoR1. ستون۳) لدر ۱۰۰۰-۵۰. ستون ۴) هضم با آنزیم Pst1. ستون۵) پلاسمید هضم نشده

۴-۳-۲) نتایج مربوط به هضم آنزیمی با Sfi1 و Not1:

۱ -در هضم با Not1 وکتور باید خطی شود.

۲ -در هضم با Sfi1 وکتور باید خطی شود. (شکل۳-۵)

همان طور که در شکل ۳-۴ و ۳-۵ مشاهده می‌شود،نتایج تمام تست‌های هضم آنزیمی مطابق انتظار بوده است و قطعات مذکور توسط آنزیم‌های مربوطه از وکتور خارج شده‌اند.

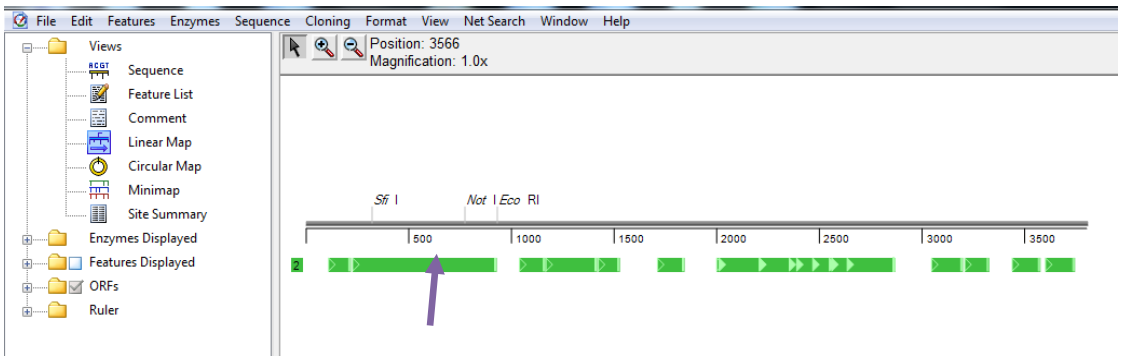


شکل ۴-۸) نتایج الکتروفور مربوط به هضم آنزیمی با Sfi1 و Not1.

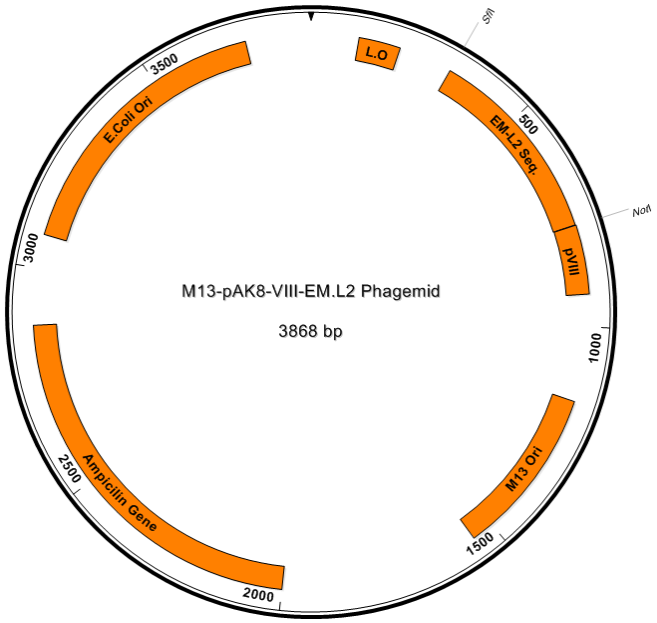
ستون ۱- پلاسمید خطی شده با Not1 در 37^{o} C. ستون۲- پلاسمید تخلیص شده. ستون۳- پلاسمید خطی شده با Sfi1 در 50^{o} C.

۴-۴) نتیجه مربوط به بررسی نرم‌افزاری مراحل کلونینگ و پیدا کردن ORF مربوطه پس از کلونینگ

برای بررسی صحت محل کلونینگ، توالی وکتور قبل و بعد از کلونینگ (بدون توالی کلون شونده و با توالی کلون شونده) توسط نرم افزار seqbuilder بررسی شد و ORF و توالی می‌موتوپ پس از کلونینگ مورد جستجو قرار گرفت و همان طور که در شکل ۳-۶ مشاهده می‌شود توالی پپتید EM-L2 پس از کلونینگ نرم افزاری در نتیجه کلونینگ قابل مشاهده است. شکل شماتیک سازه جدید M13-pAK8-VIII-EM.L2 نیز در شکل ۴ نشان داده شده است.



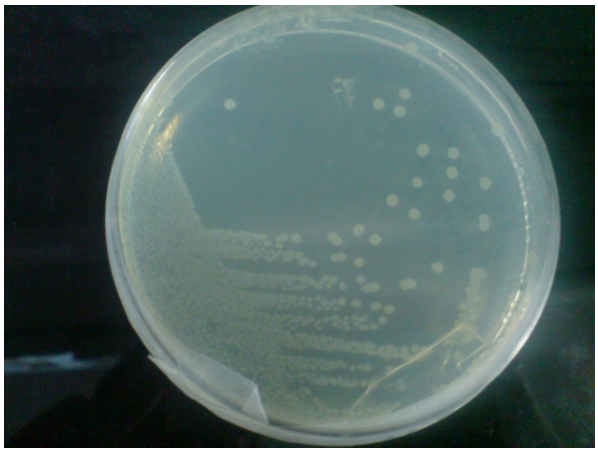
شکل ۴-۹) بررسی و صحت کلونینگ در وکتور pAK8-GVO



شکل ۴-۱۰) سازه M13-pAK8-VIII-EM.L2

۴-۵) نتیجه انتقال فاژمیدM13-pAK8-VIII-EM.L2 به باکتری با روش شیمیایی

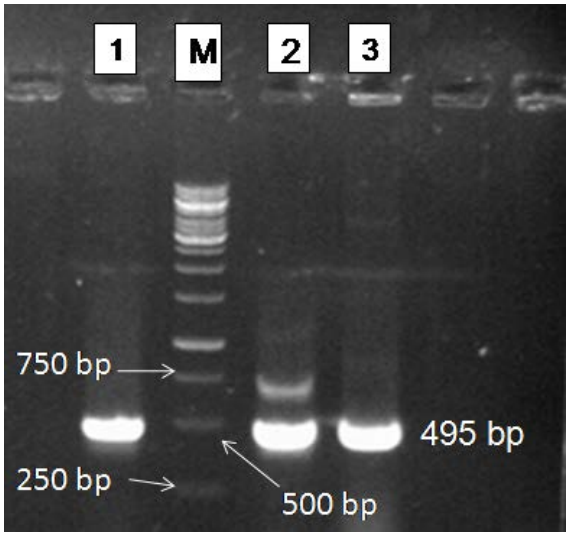
پس از ساخته شدن سازه M13-pAK8-VIII-EM.L2، این سازه با استفاده از روش شیمیایی به باکتری E.coli TG1 انتقال داده شد. مارکر انتخابی این سازه مقاومت به آمپیسیلین است. کلنیهای رشد کرده نشاندهنده صحت ترانسفورماسیون است.



شکل ۴-۱۱) کلنی های به دست آمده پس از ترانسفورمیشن سازه M13-pAK8-VIII-EM.L2 به باکتری E.coli TG1

۴-۶) نتیجه کلنی PCR به منظور تایید فاژمید M13-pAK8-VIII-EM.L2:

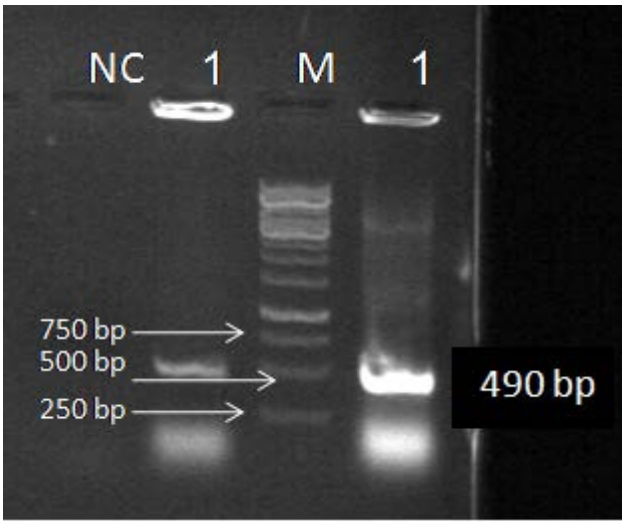
جهت تایید وکتور ترانسفورم شده سه کلنی به طور رندوم انتخاب و کلنی PCR انجام شد. نتیجه نشان داد که کلنیهای مورد نظر همگی مثبت بوده و ژن پپتید EM-L2 در آنها موجود است.



شکل ۴-۱۲) نتیجه PCR روی M13-pAK8-VIII-EM.L2. باند ۴۹۵ جفت بازی در چاهکهای ۱،۲ و ۳ که هر یک معرف یک کلون است، موید تکثیر DNA کد کننده پپتید EM-L2 است.

۴-۷) نتیجه PCR روی فاژمید M13-pAK8-VIII-EM.L2 تخلیص شده

یکی از کلونهای مثبت به منظور تخلیص پلاسمید انتخاب شد. پس از جداسازی پلاسمید از آن به عنوان الگو در PCR استفاده گردید و مجددا باند ۴۹۵ بازی مشاهده گردید.



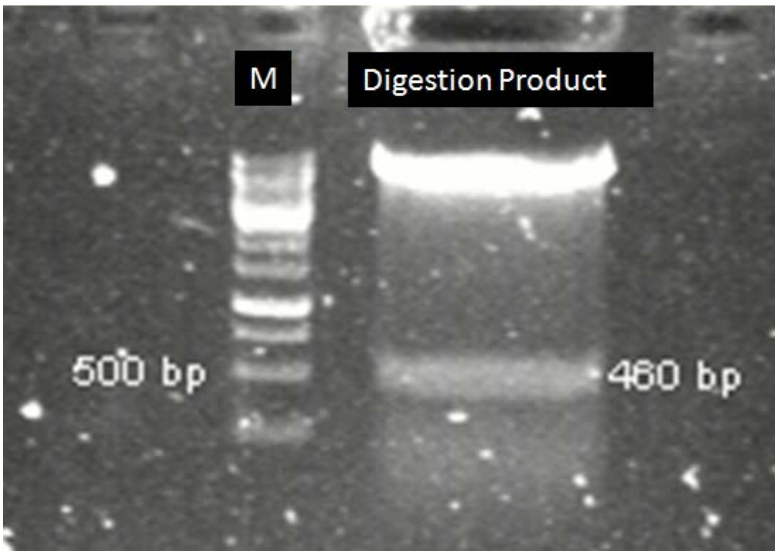
شکل ۴-۱۳) PCR روی M13-pAK8-VIII-EM.L2 تخلیص شده. ۱: نموته تست، NC: کمترل منفی و M: مارکر DNA میباشد.

۴-۸) نتیجه هضم آنزیمی روی سازه M13-pAK8-VIII-EM.L2 با استفاده از آنزیمهای SfiI و NotI

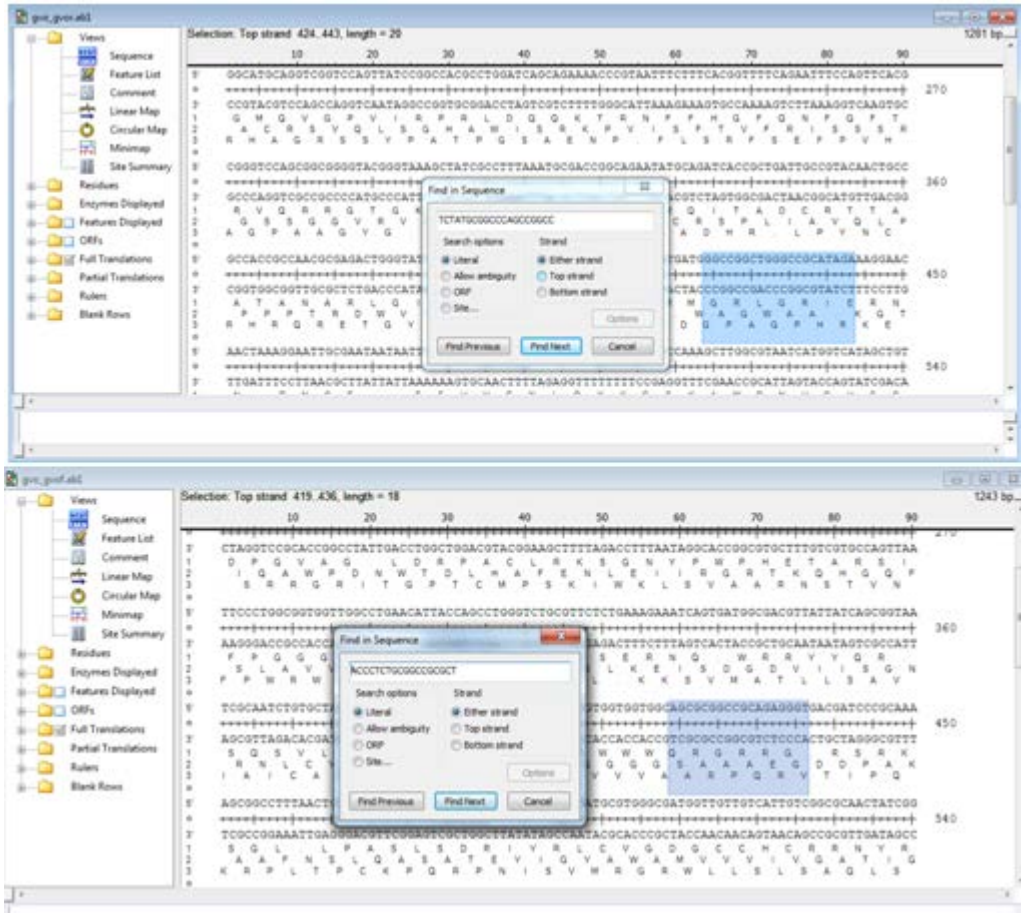
به منظور تایید صحت کلونیگ، روی فاژمید نوترکیب تخلیص شده از همان کلنی که در PCR مثبت شده بود، طی دو شب با آنزیمهای مورد استفاده در کلونینگ، یعنی Sfi1/Not1 ،هضم دوگانه آنزیمی انجام شد. پس از هضم آنزیمی محصول نهایی روی ژا آگارز ران و باند ۴۶۰ بازی مشاهده گردید (شکل ۴-۱۰).

۴-۹) نتیجه مربوط به تعیین توالی

پس از تأیید مجدد وکتوربا روش colony PCR و هضم آنزیمی، نمونه پلاسمید M13-pAK8-VIII-EM.L2 تخلیص شده با پرایمرهای اختصاصی قطعه کلون شده توسط شرکت DNA به صورت دو طرفه تعین توالی شد. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، نتیجه تعیین توالی نیز موید حضور قطعه DNA کد کننده در سازه می باشد (شکل ۴-۱۱).



شکل ۴-۱۴) نتیجه هضم آنزیمی روی سازه M13-pAK8-VIII-EM.L2 با استفاده از آنزیمهای SfiI و NotI که در آن مشاهده باند ۴۶۰ بازی نشان دهنده صحت کلونینگ است. : مارکر DNA میباشد.



شکل ۴-۱۵) بررسی نتیجه تعیین توالی با نرم افزار DNAstar. بررسی نشان داد که ژن پپتید EM-L2 به درستی و با فریم مناسب در وکتور فاژمیدی قرار داده شده است.

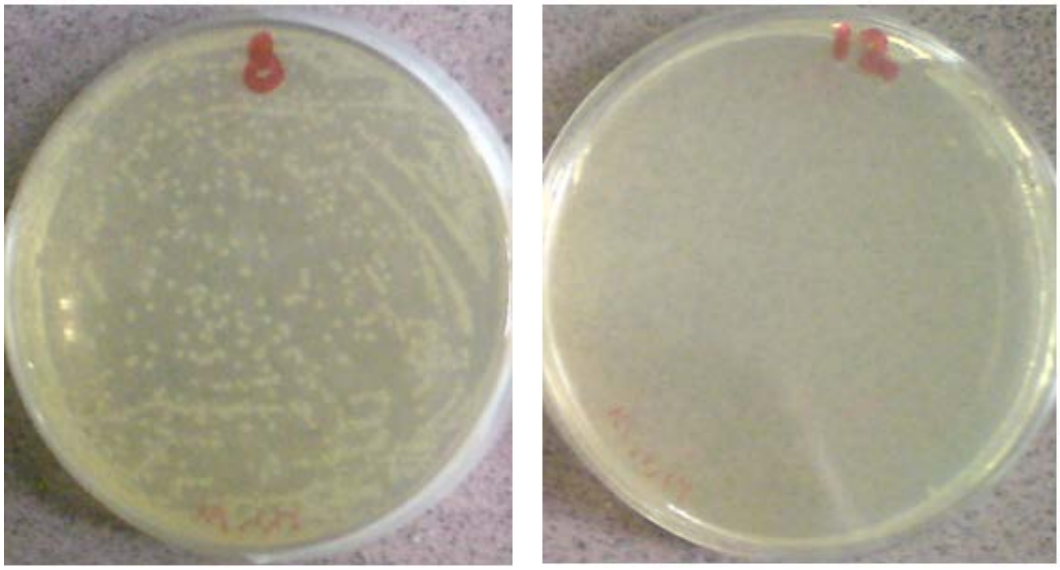
۴-۱۰) نتیجه مربوط به تیتراسیون فاژکمکی

پس از تیتراسیون فاژ کمکی با روش رقت سازی متوالی و آلوده کردن باکتری و کشت آن‌ها در محیط حاوی کانامایسین طی یک شب، تعداد کلونی‌ها در پلیت‌ها شمارش شده و تیتر نهایی 10^{14} pfu/ml محاسبه شد.

۴-۱۱) نتیجه مربوط به آلوده کردن باکتری E.coli TG1 با نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 تخلیص شده

پس از تخلیص نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 ، جهت اثبات وجود آنها در رسوب حاصله از تخلیص، باکتری E.coli TG1 فاقد فاژمید با آنها آلوده شد و سپس باکتری ۳۰ دقیقه بدون شیک و ۳۰ دقیقه با شیک در دمای 37^{o} C انکوبه و از نظر مقاومت به آمپی‌سیلین، روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین بررسی شد. پس از یک شب انکوباسیون در دمای 37^{o} C، همان طور که در شکل ۳-۱۹ مشاهده می‌شود در پلیت حاوی محیط 2XYT حاوی آمپی‌سیلین، کلونی‌های باکتری‌ها رشد کرده در

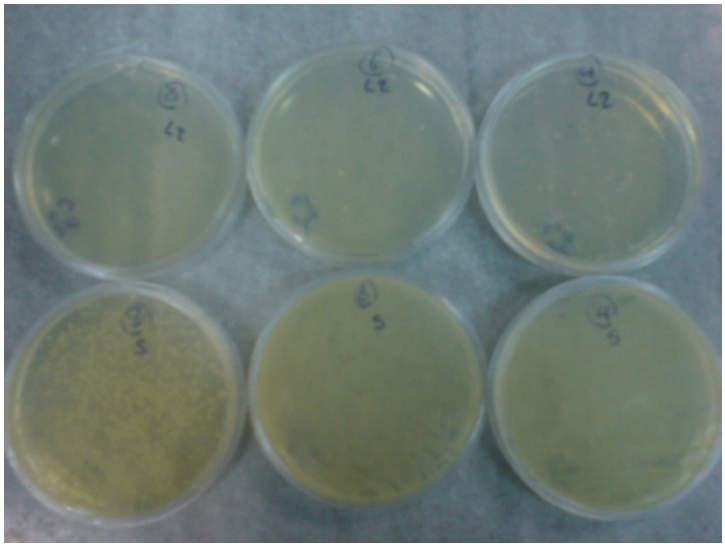
حالیکه در پلیت کنترل کلونی‌ای مشاهده نشد که این نشان دهنده وجود نانوذرات شبه فاژی در محصول تخلیص شده است (شکل ۴-۱۲).



شکل ۴-۱۶) آلوده کردن باکتری E.coli TG1 با نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده می‌موتوپEGFR تخلیص شده. سمت راست کنترل منفی و سمت چپ نمونه آلوده شده با نانوذرات شبه‌فاژی

۴-۱۲) نتیجه مربوط به تیتراسیون ذرات فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 و فاژ کنترل

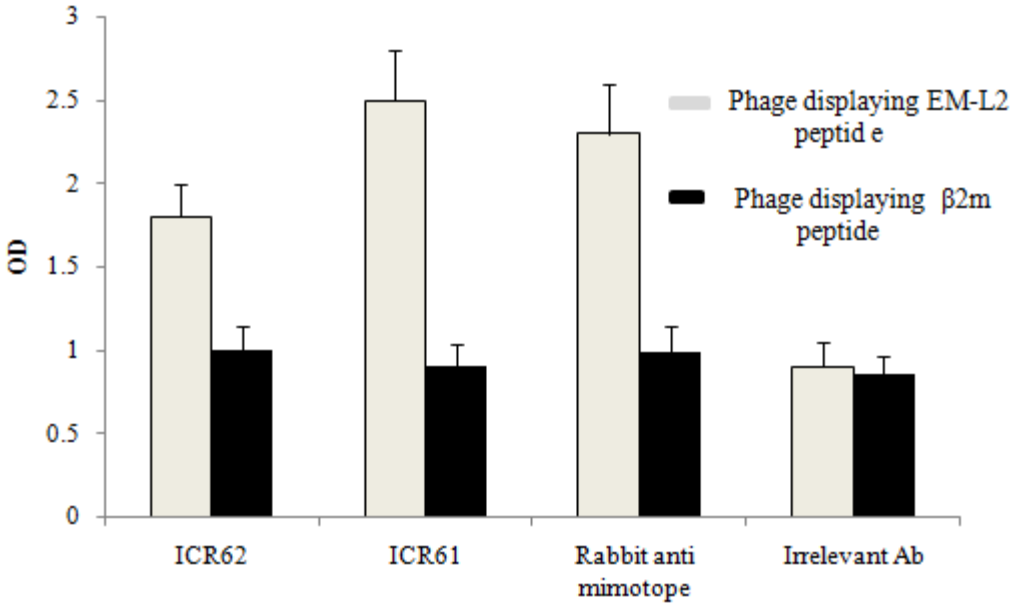
پس از تیتراسیون نانوذرات شبه فاژی، تیتر نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 و نیز نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده پروتئین β2m به عنوان کنترل محاسبه شد. نتیجه حاصله تیتر برای فاژ اصلی و کنترل به ترتیب ۱۰۱۲ pfu/ml و ۱۰۱۷pfu/ml گزارش شد.



شکل ۴-۱۷) تیتراسیون نانو ذرات شبه فاژی. تیتر برای فاژ اصلی و کنترل به ترتیب 10^{12} pfu/ml و 10^{17}pfu/ml به دست آمد.

۴-۱۳) نتیجه مربوط به اثبات نمایش پپتید EM-L2 روی سطح نانوذرات شبه فاژی

برای بررسی حضور پپتید نمایش داده شده بر روی انتهای N پروتئین PVIII سطح فاژ از تست الایزا به کمک آنتی بادی‌های ICR62، ICR61 ، IgGخرگوشی علیه می‌موتوپ و آنتی بادی غیر مرتبط به عنوان کنترل استفاده شد. همان طور که در شکل ۳-۱۴ مشاهده می‌شود تمایل آنتی بادی‌های ICR62، ICR61 و IgG خرگوشی علیه می‌موتوپ متصل به BSA به نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 بیشتر از تمایل آنها به نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده قسمتی از پروتئین β2m به عنوان کنترل است در حالیکه تمایل آنتی بادی غیر مرتبط نسبت به هر دو نانوذره شبه فاژی کمتر از دو آنتی‌بادی دیگر می‌باشد.

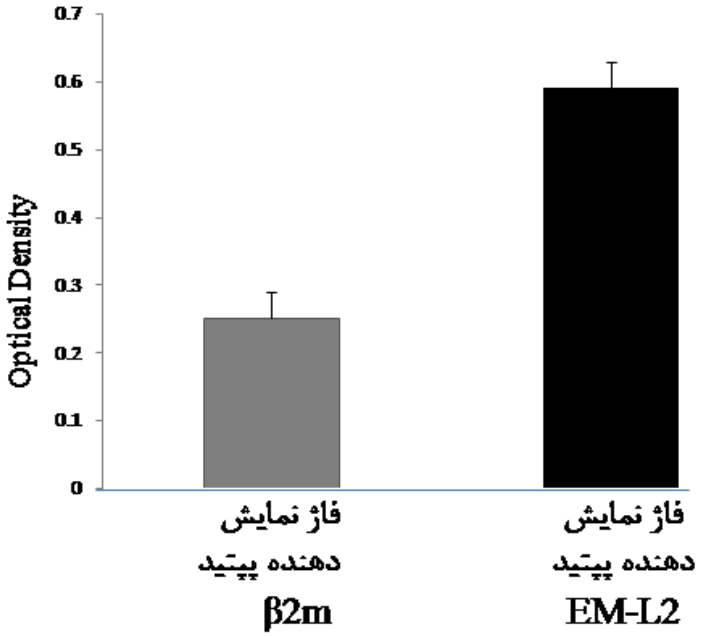


شکل ۴-۱۸) آزمون ELISA برای نشان دادن نمایش پپتید EM-L2 بر روی سطح ذرات فاژی. آنتی بادی های مونوکلونال ICR61، ICR62 و IgGs خرگوشی علیه میموتوپ و آنتی بادی ضد پروژسترون به عنوان آنتی بادی کنترل مورد استفاده قرار گرفتند (۱ میکروگرم / چاهک). ذرات فاژی نمایش دهنده β2m به عنوان کنترل استفاده شد. نتایج نشان داد که ICR61، ICR62 و آنتی بادی خرگوشی علیه میموتوپ تمایل بالاتری نسبت به فاژ نمایش دهنده پپتید EM-L2 در مقایسه با فاژ کنترل نمایشدهنده β2m دارند. هر نوار نشان دهنده میانگین ± انحراف معیاراست.

۴-۱۴) نتایج الایزا با آنتیبادی علیه تگ هیستیدین روی فاژ نمایش دهنده پپتید EM-L2

با توجه به وجود تگ هیستیدین در پپتید EM-L2، جهت تایید وجود پپتید EM-L2 در سطح فاژ به کمک آنتیبادی علیه تگ هیستیدین آزمون الایزا انجام شد. همانطور که شکل ۳-۱۵ نشان میدهد

فاژ نمایش دهنده پپتید EM-L2 نسبت به آنتیبادی علیه تگ هیستیدین از تمایل خوبی برخوردار است.

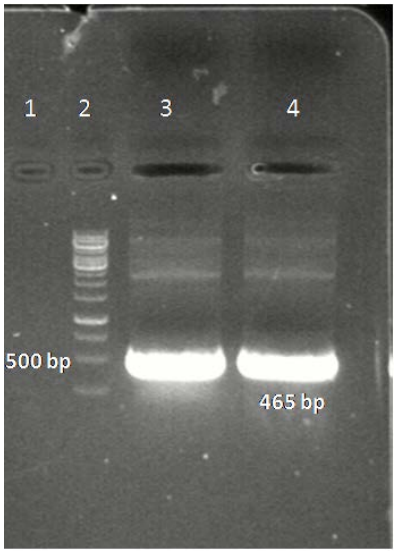


شکل ۴-۱۹) جهت تایید وجود پپتید EM-L2 در سطح فاژ به کمک آنتیبادی علیه تگ هیستیدین. نتیجه نشاندهنده این امر است که فاژ نمایش دهنده پپتید EM-L2 نسبت به آنتیبادی علیه تگ هیستیدین از تمایل خوبی برخوردار است.

۴-۱۵) نتایج مربوط به سابکلون کردن ژن پپتید EM-L2 در وکتور بیانی به منظور تولید پپتید در باکتری

۴-۱۵-۱) نتیجه واکنش PCR برای ژن EM-L2

روی وکتور حاوی ژن M13-pAK8-VIII-EM.L2 که توالی آن برای میزبان E.coli بهینه شده است، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن واکنش PCR انجام شد و قطعه حدود ۴۶۵ جفت بازی حاصل از آن روی ژل مشاهده شد.

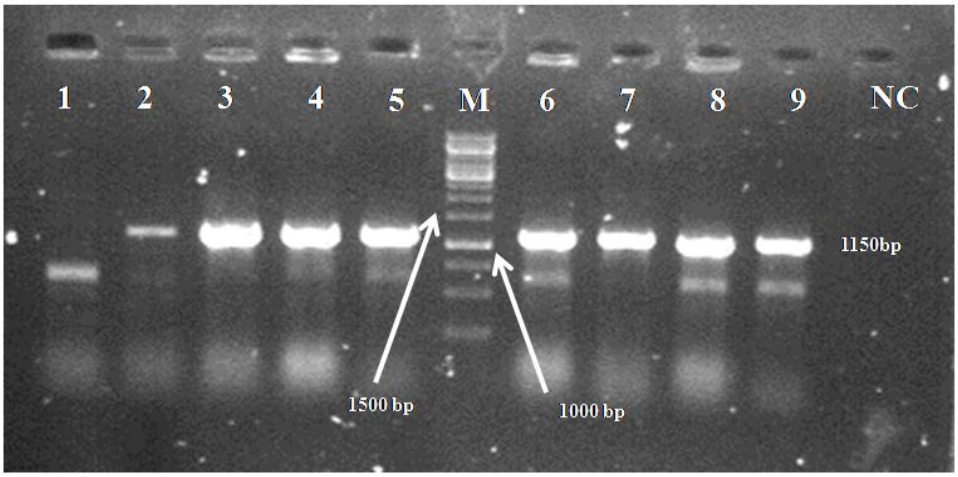


شکل ۴-۲۰) تکثیر ژن یا DNA کد کننده پپتید EM-L2 با استفاده از PCR و پرایمرهای اختصاصی. مشاهده باند ۴۶۵ جفت بازی موید تکثیر ژن مورد نظر است.

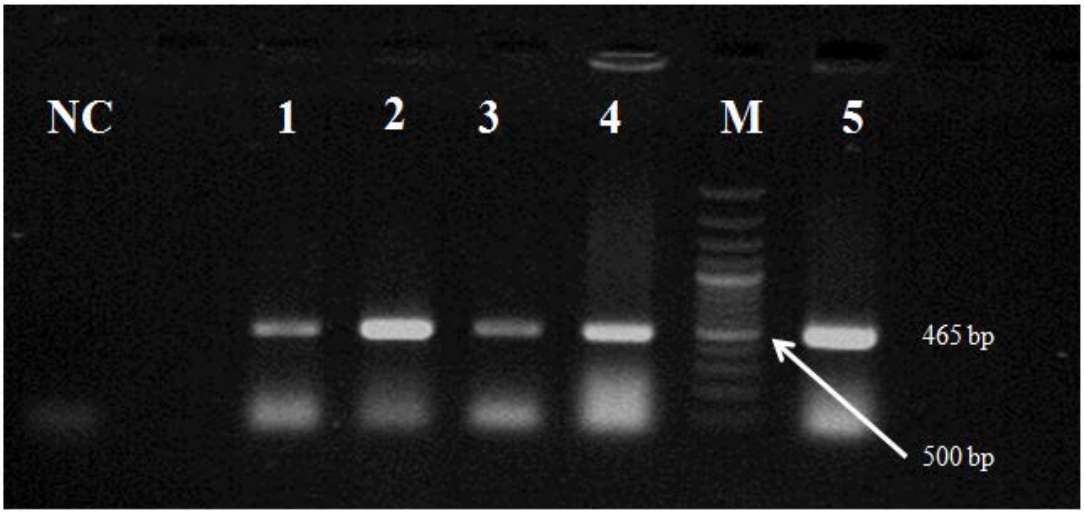
در ادامه وکتور pET32a و ژن EM-L2 در واکنش های مجزا تحت هضم آنزیمی با آنزیمهای BamHI و EcoRI قرار گرفتند و پس از انجام واکنش محلول حاوی آنها روی ژل ران شد و خالص سازی آنها انجام گرفت. پس از غلظت سنجی مجصولات حاصل از برش آنزیمی، واکنش لیگاسیون طبق فرمول آماده شد و محصول آن به باکتری TG1 ترانسفورم شد. مارکر انتخابی این وکتور نیز ژن مقاومت به آنتیبیوتیک آمپیسلین است.

۴-۱۵-۲) نتیجه واکنش PCR روی کلونهای مثبت

روی تک کلون های حاصل از ترانسفورماسیون محصول لیگاسیون ابتدا با استفاده از پرایمر های یونیورسال پروموتر T7، PCR انجام شد. سپس روی کلونهای مثبت این مرحله با پرایمرهای اختصاصی ژن EM-L2 واکنش کلنی PCR انجام شد. محصولات حدود ۱۱۵۰ (شکل ۴-۱۷) و ۴۷۰ (شکل ۴-۱۸) جفت بازی نشان دهنده کلون های مثبت هستند در این مرحله هستند.



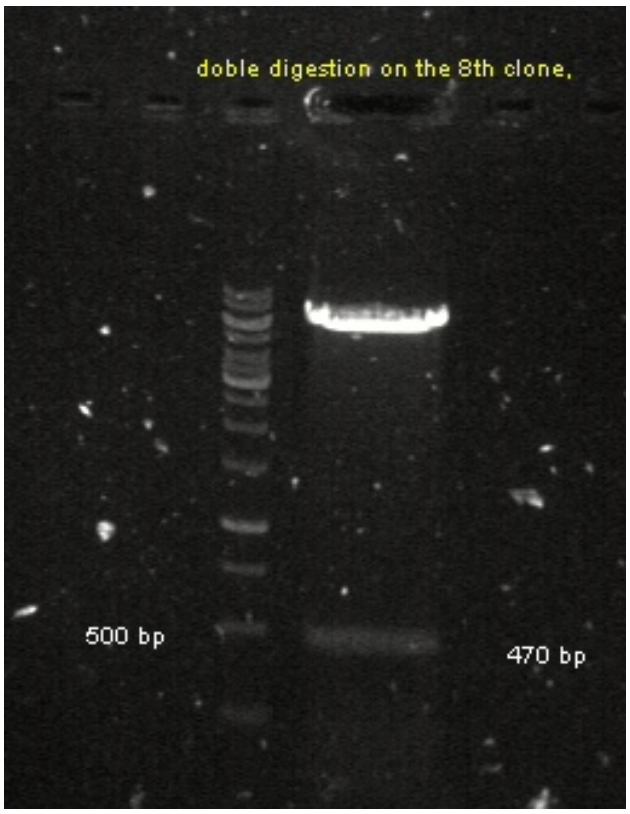
شکل ۴-۲۱) کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای استاندارد پروموتور T7. مشاهده باند ۱۱۵۰ جفت بازی نشاندهنده کلنیهای مثبت دریافت کننده ژن پپتید EM-L2 میباشد.



شکل ۴-۲۲) کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن پپتید EM-L2 با استفاده از کلونهایی که در PCR قبل با پرایمر T7 مثبت شده بودند. مشاهده باند ۴۶۵ جفت بازی نشاندهنده کلنیهای مثبت دریافت کننده ژن پپتید EM-L2 میباشد.

۴-۱۵-۳) نتیجه واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید کلونینگ

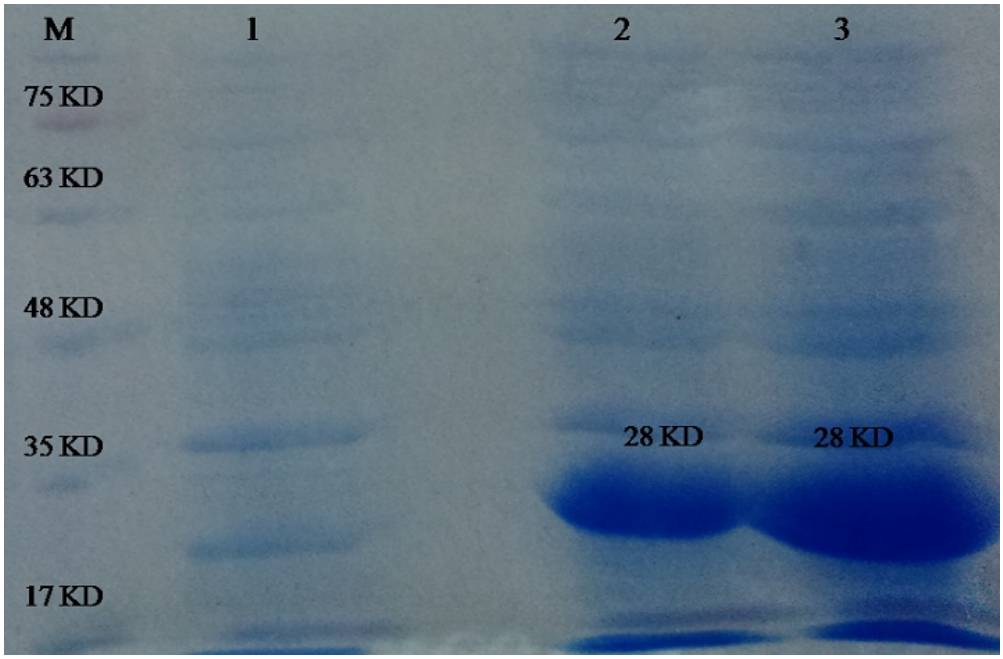
به منظور تایید قطعی کلونینگ ژن و بررسی صحت فریم در وکتور بیانی، از یکی از کلون های مثبت تخلیص پلاسمید انجام شد و روی آن با شرایط قبلی با استفاده از آنزیمهای BamHI و EcoRI هضم آنزیمی انجام شد. مشاهده قطعه حدود ۴۶۵ جفت بازی روی ژل نشانگر ساب کلون شدن صحیح ژن EM-L2 در وکتور pET32a می باشد (شکل ۴-۱۹) .



شکل ۴-۲۳) هضم آنزیمی با استفاده از آنزیمهای BamHI و EcoRI روی وکتور تخلیص شده از کلون شماره ۵. مشاهده باند حدود ۴۶۵ جفت بازی موید صحت کلونینگ است.

۴-۱۶) القای بیان اولیه ژن ساب کلون شده در وکتور بیانی pET32a در میزبان باکتریایی

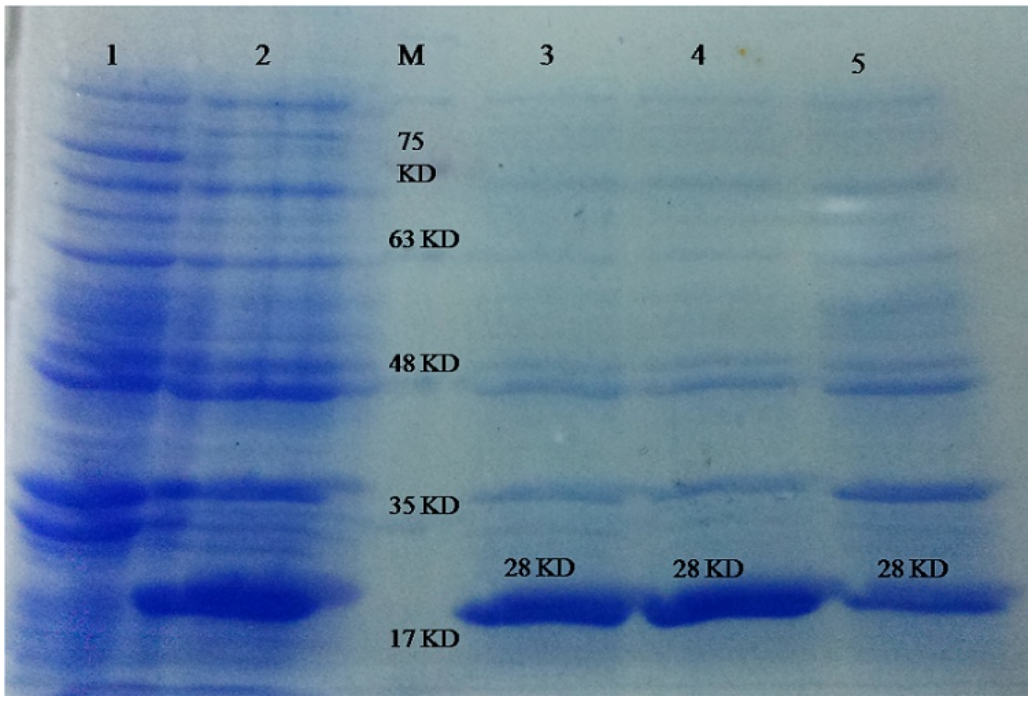
بیان ژن در شرایط ذکر شده انجام گرفت. پس از بیان ۴ ساعته در دمای $37^{\circ}C$ ، یک سی سی از محیط کشت برداشته و رسوب داده شد. پس از یک بار شستشو با بافر PBS، ۲۰ میکرولیتر بافر نمونه روی رسوب ریخته و نمونهها برای ده دقیقه جوشانده شدند. سپس نمونهها روی روی ژل SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد ران و باند ۲۸ کیلو دالتونی مشاهده شد. در نمونه باکتری فاقد پلاسمید (کنترل منفی) باند مورد نظر مشاهده نشد.



شکل ۴-۲۴) بیان پروتیین نوترکیب. ۱: BL21 خالی، ۲و ۳: نمونه القا شده حاوی باند ۲۸ کیلو دالتونی مربوط به پروتیین نوترکیب، M: مارکر پروتیینی،

۴-۱۷) نتایج مربوط به بهینه سازی دمای القا

پس از اینکه کشت باکتری مورد نظر به OD مناسب رسید، القا با IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار صورت گرفت و در سه فالکون با حجم ۱۰ میلی لیتر تقسیم شده و در دماهای ۱۸، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از تعیین غلظت پروتئین ها در هر نمونه با روش برادفورد و همسان سازی غلظت آن ها به اندازه ۱۰ میکروگرم در هر چاهک، بر روی ژل SDS-PAGE به صورت زیر می باشد.



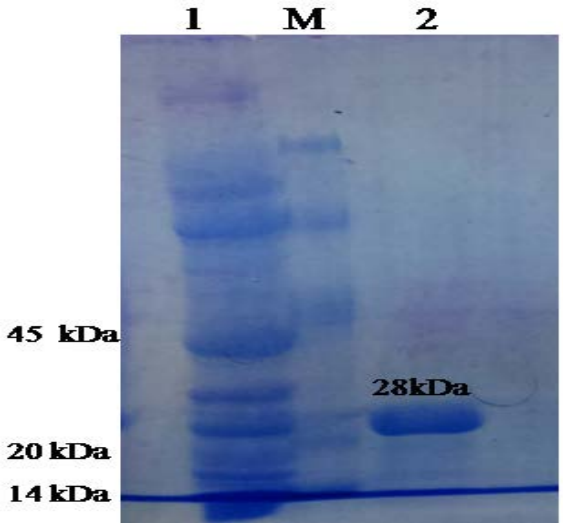
شکل ۴-۲۵) بهینه سازی دمای القا. ۱: BL21 خالی، ۲: نمونه قبل از القا، M: مارکر پروتیینی، ۳: دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، ۴: دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، ۵: دمای ۱۸ درجه سانتی گراد

۴-۱۸) نتیجه مربوط به تخلیص پروتئین نو ترکیب با ستون Ni- NTA

برای تخلیص پروتئین دارای His tag از ستون Ni- NTA و بافر های تخلیص حاوی غلظت های متفاوت ایمیدازول استفاده شد، تا باند ۲۸ کیلو دالتونی مورد نظر به صورت کاملا خالص مشاهده شود. به منظور کاهش باند های غیر اختصاصی، از بافر شست و شو با غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار ایمیدازول و بافر Elution با غلظت ۵۰۰ میلی مولار استفاده شد. غلظت نهایی پپتید خالص شده پس از تغلیظ حدود ۱ میلگرم در هر سی سی گزارش گردید.

۴-۱۹) نتایج مربوط به تایید پپتید بیان شده شده در باکتری

پپتید نوترکیب EM-L2 دارای تگ هیستسدین است و بنابراین برای تایید پروتئین تخلیص شده پس از بیان در باکتری از دو آزمون الایزا و وسترن بلات استفاده گردید.



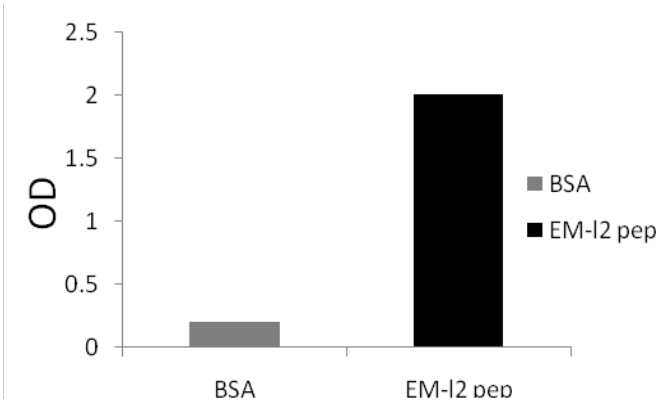
شکل ۴-۲۶) تخلیص و تغلیظ پپتید EM-L2 بیان شده در باکتری. مشاهده باند ۲۸ کیلودالتونی نشان-دهنده تخلیص مناسب این پپتید میباشد.

۴-۱۹-۱) نتیجه آزمون الایزا با استفاده از آنتیبادی علیه تگ هیستیدین روی پپتید EM-L2

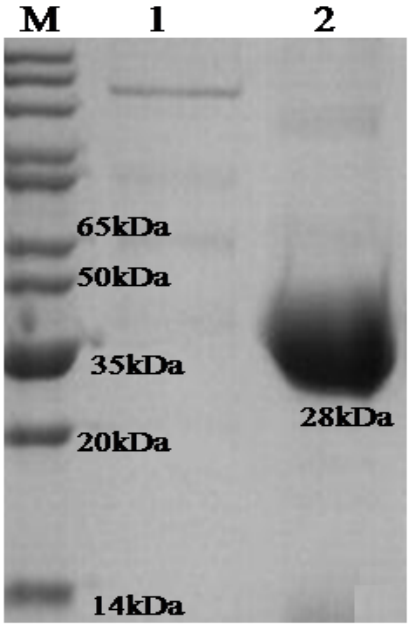
پس از تخلیص پپتید نوترکیب، ۱ میکروگرم از آن به ازای هر چاهک در آزمون الایزا به کار رفت. از پروتئین BSA به عنوان کنترل استفاده شد. نتیجه نشان داد که آنتیبادی علیه تگ هیستیدین به صورت قابل ملاحظهای نسبت به پپتید نوترکیب تمایل دارد (شکل ۳-۲۳).

۴-۱۹-۲) نتیجه آزمون وسترن بلات برای پپتید بیان شده

پروتئین های تفکیک شده بر روی ژل ۱۲/۵٪ پلی آکریل آمید با استفاده از دستگاه الکتروترانسفر به غشای نیترو سلولز منتقل شد. بیان پپتید EM-L2 با استفاده از آنتی بادی کونژوگه با HRP ضد برچسب پلی هیستیدین با نسبت ۱/۵۰۰۰ در بافر TBST و با سوبسترای آنزیمی TMB مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل مشاهده می شود، لکه ی باند مورد نظر در محل مارکر ۲۸ کیلو دالتونی ظاهر شده که نشان می دهد پپتید مورد نظر به خوبی بیان، تخلیص و تغلیظ شده و آنتی بادی علیه تگ پلی هیستیدینی پپتید قادر به شناسایی پپتید نوترکیب بیان شده می باشد (شکل ۴-۲۴).



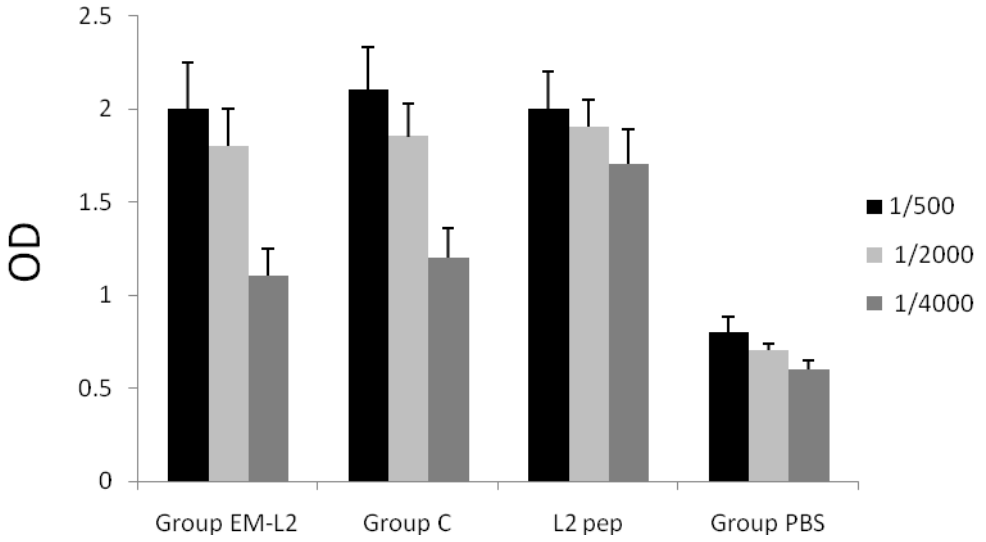
شکل ۴-۲۷) آزمون الایزا با استفاده از آنتیبادی علیه تگ هیستیدین روی پپتید EM-L2. ۱ میکروگرم آنتیژن در هر چاهک کت شد و با استفاده از آنتی هیس تگ کونژوگه شده با HRP الایزای مستقیم انجام شد. EM-L2 pep نشان دهنده پپتید EM-L2 است و BSA کنترل تست میباشد. اختلاف OD نشاندهنده تمایل بالای پپتید بیان شده به آنتی هیس تگ است.



شکل ۴-۲۸) آزمون وسترن با استفاده از آنتیبادی علیه تگ هیستیدین روی پپتید EM-L2 تخلیص شده. ۲۰ میکرولیتر از محلول تغلیظ شده پپتید در هر چاهک ران شد و با استفاده از آنتی هیس تگ کونژوگه شده با HRP تست وسترن انجام شد. مشاهده باند حدود ۲۸ کیلودالتونی نشاندهنده بیان، تخلیص و تغلیظ خوب پپتید و برهمکنش آن با آنتی هیس تگ کونژوگه است. ۱: رسوب باکتری فاقد وکتور. ۲: پپتید تخلیص و تغلیظ شده. M: مارکر پروتئینی.

۴-۲۰) نتایج مربوط به بررسی پتانسیل ایمنی‌زایی سازه‌های فاژی و پپتید تزریق شده

اولین خون گیری قبل از تزریق آخر از رگ دم حیوانات انجام شد و سپس سرم آنها جدا و از آن رقت‌های ۱/۵۰۰، ۱/۲۰۰۰ و ۱/۴۰۰۰ در بافر PBS تهیه و جهت بررسی تولید آنتی‌بادی در موش‌ها، تست الایزای فاژ انجام شد. همان طور که در شکل ۳-۲۵ مشاهده می‌شود آنتی‌بادی به خوبی علیه نانوذرات شبه فاژی تولید شده است. از سرم موش ایمن شده با PBS جهت کنترل استفاده شده است.

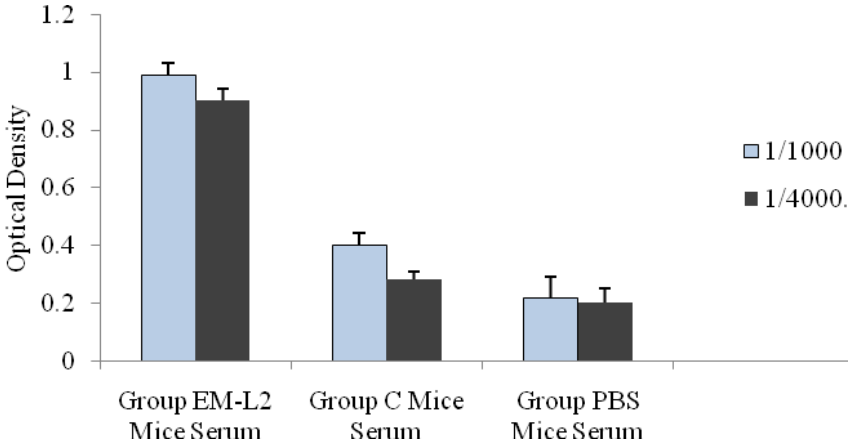


شکل ۴- ۲۹) نتایج تست الایزا در اثبات تولید آنتی‌بادی علیه نانوذرات شبه فاژی و پپتید EM-L2. Group EM-L2 نشان دهنده نتایج سرم موش‌های ایمن شده با نانوذرات شبه فاژی نمایش‌دهنده پپتید EM-L2 علیه خود نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 است. Group C نشان دهنده نتایج سرم موش‌های ایمن شده با نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده پروتئین بتادو میکروگلوبولین علیه خود نانوذرات شبه فاژی نمایش دهنده β2M است. L2 pep نشان دهنده نتایج سرم موش‌های ایمن شده پپتید EM-L2 علیه پپتید EM-L2 است. Group PBS نشان دهنده نتایج سرم موش ایمن شده با PBS بر علیه نانوذرات شبه فاژی نمایش‌دهنده پپتید EM-L2 به عنوان کنترل است. هر نوار نشان دهنده میانگین ± انحراف معیاراست.

۴-۲۱) نتایج مربوط به بررسی وجود آنتی بادی علیه پپتید EM-L2 در موشهای BALB/C ایمن شده با فاژ نمایش دهنده EM-L2

جهت بررسی تولید آنتی بادی علیه پپتید، دو رقت ۱/۱۰۰۰ و ۱/۴۰۰۰ سرم موشها در تست الایزا به کار گرفته شد. پپتید EM-L2 بیان شده در باکتری E.Coli به عنوان آنتیژن و سرم موشهای گروه PBS و C به عنوان کنترل به کار رفتند. نتایج نشان داد که سرم موشهای ایمن شده با نانوذرات فاژی

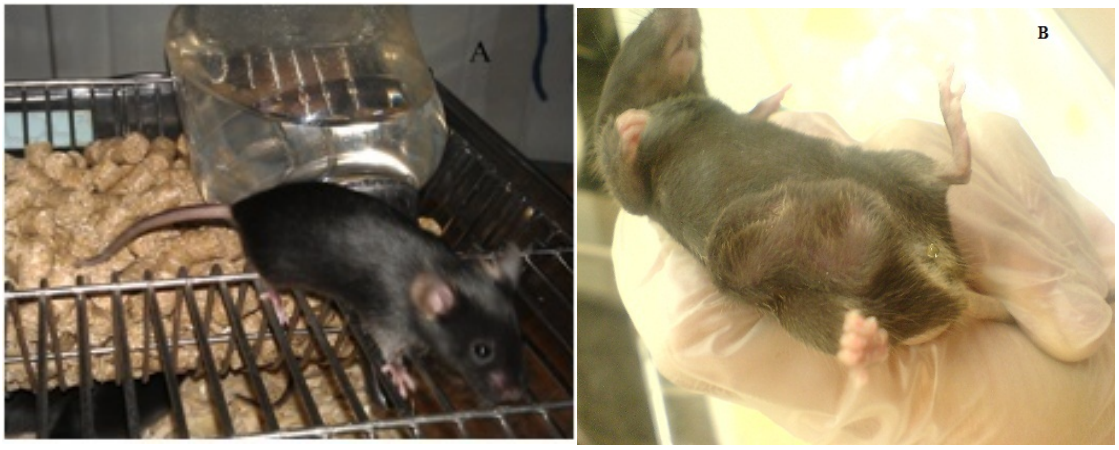
نمایش دهنده پپتید EM-L2 به طرز معناداری تمایل بیشتری به پپتید EM-L2 نسبت به گروههای کنترل دارند.



شکل۴- ۳۰) الایزای مربوط به نتایج بررسی وجود آنتی بادی علیه پپتید EM-L2 در موشهای BALB/C ایمن شده با فاژ نمایش دهنده EM-L2. یک میکروگرم پپتید EM-L2 در هر چاهک کت شد. Group EM-L2: سرم موشهای ایمن شده با واکسن فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2. Group C: سرم موشهای ایمن شده با واکسن فاژی نمایش دهنده پپتید β2m. Group PBS: سرم موشهای ایمن شده با PBS به عنوان کنترل. نتایج نشان میدهد که سرم موشهای Group EM-L2 توانستهاند بر علیه پپتید EM-L2 آنتی بادی تولید نمایند. هر نوار نشان دهنده میانگین ± انحراف معیاراست.

۴-۲۲) نتایج حاصل از تومورزایی در موشهای C57BL/6

برای ایجاد تومور در حیوانات گروه پیش‌گیری کننده و درمانی تعداد $۱۰^{۶}$ سلول LL/2 به صورت زیر پوستی به موش‌ها تزریق گردید. نرخ تشکیل تومور در حیوانات ۱۰۰٪ بود، بدین ترتیب که تمام موش‌ها در گروه درمانی و پیش‌گیری توموری شدند. یک هفته پس از تزریق سلول‌ها تومور قابل لمس بود. شکل ۳-۲۷ موش C57BL/6 قبل و بعد از تشکیل تومور نشان داده شده است.

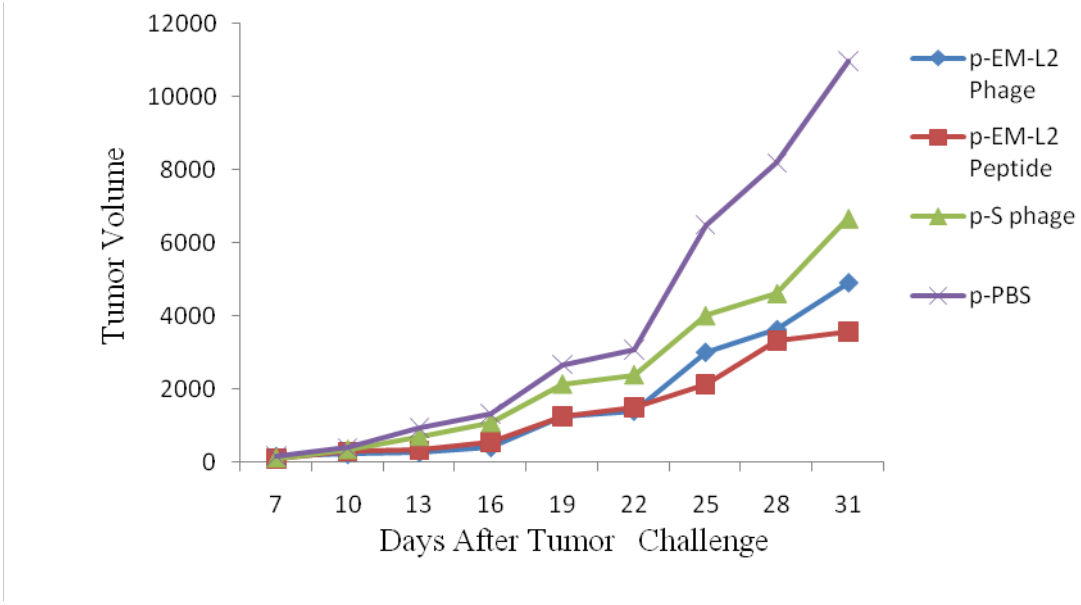


شکل ۴-۳۱) نتایج توموزایی.A: موش قبل از ایجاد تومور. B: موش بعد از ایجاد تومور

۴-۲۳) نتایج حاصل از بررسی روند رشد تومور

۴-۲۳-۱) نتایج مربوط به گروه پیش‌گیری

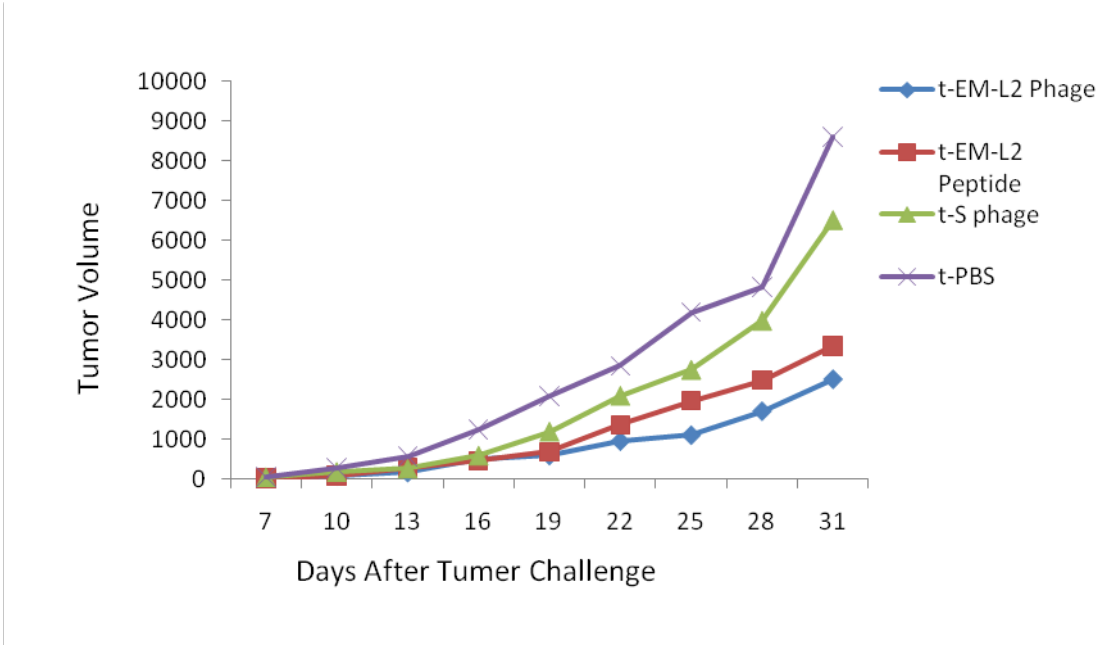
موش‌های گروه پیش‌گیری به مدت یک ماه، هفتهای یک مرتبه، مورد تزریق آنتیژن قرار گرفتند . یک هفته پس از آخرین تزریق تعداد یک میلیون سلول به هر موش تزریق گردید. تومورها یک هفته پس از سلول‌ها قابل لمس بودند. ابعاد تومورها هفتهای ۲ بار اندازه گیری شد و بعد از محاسبه حجم تومور و محاسبه‌ی میانگین، نمودار روند رشد تومور رسم شد. برای بررسی آماری نتایج بدست آمده مانند گروه درمانی عمل شد. شکل ۴-۲۸ نمودارهای مربوط به روند رشد تومور در گروه پیش‌گیری را نشان میدهد. تفاوت معنادار در روند رشد تومور بین گروههای p-EM-L2 phage و p-EM-L2 peptide با گروه p-PBS وجود دارد درحالیکه بین گروههای p-PBS و p- S phage و بین گروههای p-EM-L2 phage و p- S phage تفاوت معنادار مشاهده نمیشود. بین p-EM-L2 peptide با گروه p- S phage نیز تفاوت معنادار مشاهده شد.



شکل ۴-۳۲) نمودارهای مربوط به روند رشد تومور در گروه پیش‌گیری. موش‌ها ابتدا ایمن‌سازی شده و یک هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی تعداد 10^6 سلول به موش‌ها تزریق شد. پس از قابل لمس شدن تومورها اندازه‌گیریها بطور منظم انجام شد و نمودار میانگین حجم تومورها رسم شد. p-EM-L2 phage: نمودار مربوط به گروه دریافت کننده واکسن فاژی نمایش دهنده پپتید نوترکیب EM-L2. p-EM-L2 peptide: نمودار مربوط به گروه دریافت کننده واکسن پپتیدی نوترکیب EM-L2 بیان شده در باکتری. p-S phage: نمودار مربوط به گروه دریافت کننده فاژ نمایش دهنده پپتید β2m. p-PBS: نمودار مربوط به گروه دریافت کننده PBS. تفاوت معنادار در روند رشد تومور بین گروههای p-EM-L2 phage و p-EM-L2 peptide با گروه p-PBS وجود دارد. بین گروههای p-PBS و p- S phage تفاوت معنادار مشاهده نمیشود(P<۰/۰۵). بین p-EM-L2 peptide با گروه p- S phage نیز تفاوت معنادار مشاهده شد.

۴-۲۳-۲) نتایج مربوط گروه درمانی

به موش‌های این گروه ابتدا بصورت زیر جلدی تعداد 10^6 عدد سلول LL/2 بصورت زیر جلدی و به پهلوی راست تزریق شد. پس از اینکه تومورها قابل رؤیت و لمس شدند (حدود ۱۰ روز بعد از تزریق سلول‌ها) روند ایمنی‌زایی آغاز شد و ابعاد تومور دو بار در هفته اندازه‌گیری شد. برای بررسی آماری نتایج بدست آمده از تست Oneway ANOVA به همراه تست تعقیبی Dunnett post test استفاده شد. نتایج مربوط به روند رشد تومور گروه درمانی در شکل ۴-۲۹ نشان داده شده است. تفاوت معناداری در روند رشد تومور در گروههای t-EM-L2 phage و t-EM-L2 peptide با گروه t-PBS و t-S phage وجود دارد (P<.۰/۰۵) بین گروههای t-PBS و t-S phage تفاوت معنادار مشاهده نمیشود. همچنین تفاوت معنادار بین گروههای t-EM-L2 phage و t-EM-L2 peptide نیز مشاهده نشد.



شکل ۴-۳۳) نمودارهای مربوط به روند رشد تومور در گروه درمانی. ابتدا به موش‌ها سلول LL2 تزریق شد و پس از قابل لمس شدن تومورها اندازه‌گیریها بطور منظم انجام شد و نمودار میانگین حجم تومورها رسم شد. t-EM-L2 phage: نمودار مربوط به گروه دریافت کننده واکسن فاژی نمایش دهنده پپتید نوترکیب EM-L2. t-EM-L2 peptide: نمودار مربوط به گروه دریافت کننده واکسن پپتیدی نوترکیب EM-L2 بیان شده در باکتری. t-S phage: نمودار مربوط به گروه دریافت کننده فاژ نمایش دهنده پپتید β2m-. t-PBS: نمودار مربوط به گروه دریافت کننده PBS. با استفاده از تست آماری تفاوت معناداری در روند رشد تومور در گروههای t-EM-L2 phage و t-EM-L2 peptide با گروه t-PBS و t-S phage وجود دارد (P<۰/۰۵) بین گروههای t-PBS و t-S phage تفاوت معنادار مشاهده نمیشود.

۴-۲۴) نتایج بررسی نرخ بقا[97]

برای بررسی کارآمدی واکسن فاژی نمایش دهنده می‌موتوپ علاوه بر روند رشد تومور، نرخ بقا نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که مرگ هر حیوان ثبت شد و در پایان آزمایش روند مرگ و میر حیوانات در هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمایش به منظور بررسی صحت نتایج از آزمون Log-Rank (Mantel–Cox) استفاده گردید.

۴-۲۴-۱) نرخ بقا در گروه پیش‌گیری

در بررسی مشاهده شد که در روز ۳۲ نرخ بقا در گروه p-PBS صفر بود یعنی تمام موش‌های گروه

97- Survival rate

مرده بودند. در روز ۳۶ نرخ بقا در گروه p-C صفر شد، در حالی که در گروه p-EM-L2 peptide و p-EM-L2 phage نرخ بقا ۵۰٪ بود. در روز ۴۳ موش سوم از گروه p-EM-L2 phage مرد در حالی که در گروه p-EM-L2 peptide نرخ ۵۰٪ هنوز مشاهده میگردید و این نتیجه تا روز آخر (۴۵) پابرجا بود. نتایج آزمون Log-Rank (Mantel–Cox) نشان داد که median survival برای گروه p-PBS، p-C، p-EM-L2 peptide و p-EM-L2 phage به ترتیب ۲۷، ۲۹، ۴۳/۵ و ۴۱ می‌باشد و بدین ترتیب نتایج تست بررسی روند مرگ و میر معنادار گزارش شد و در این میان بهترین نتیجه مربوط به موشهای دریافت کننده واکسن پپتیدی میباشد (شکل ۴-۳۰).

شکل۴-۳۴) بررسی نرخ بقا در گروه پیش‌گیری. بررسی نرخ بقا در این گروه نشان داد که روند مرگ و میر به طور معنادار متفاوت می‌باشد، به طوری که واکسن پپتیدی و فاژی EM-L2 توانسته بودند تا حدی موجب افزایش میزان بقا در حیوانات گروه p-EM-L2 peptide و p-EM-L2 phage شوند (P<۰/۰۵).

۴-۲۴-۲) نرخ بقا در گروه درمانی

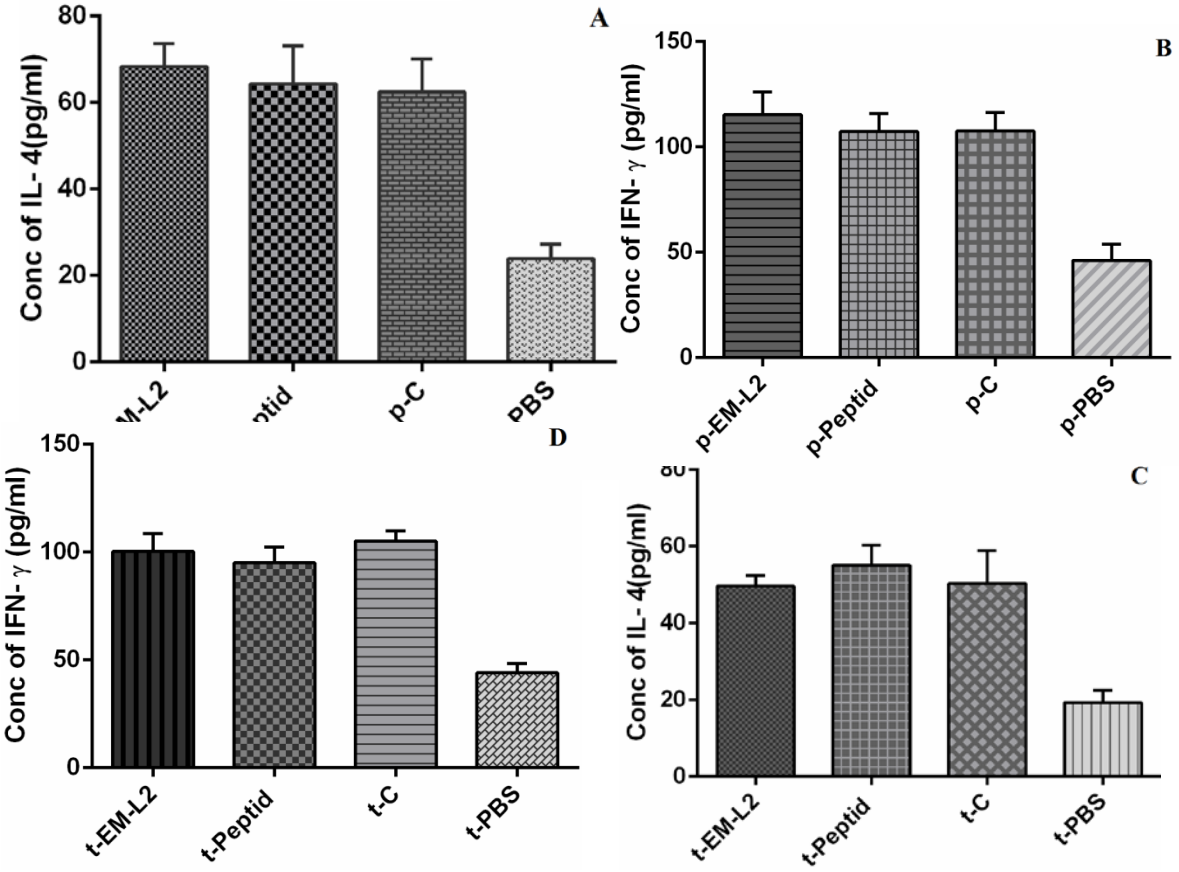
در بررسی مشاهده شد که در روز ۳۳ نرخ بقا در گروه t-PBS صفر بود یعنی تمام موش‌های گروه مرده بودند. آخرین موش گروه t-C در روز ۳۷ مرد، در حالیکه در گروه t-EM-L2 peptide و t-EM-L2 phage نرخ بقا به ترتیب ۵۰٪ و ۷۵٪ مشاهده گردید. همچنین در روز ۴۵ که پایان آزمایش بود یک موش از گروه t-EM-L2 phage زنده مانده بود. نتایج آزمون Log-Rank (Mantel–Cox) نشان داد که median survival برای گروههای t-PBS، t-C، t-EM-L2 peptide و t-EM-L2 phage به ترتیب ۳۰، ۳۲/۵، ۳۷ و ۳۹/۵ می‌باشد و بدین ترتیب نتایج تست Logrank for trend (تست بررسی

روند مرگ و میر) معنادار گزارش شد که در این میان بهترین نتیجه مربوط به موشهای دریافت کننده واکسن فاژی میباشد (شکل ۴-۳۱).

شکل ۴-۳۵) بررسی نرخ بقا در گروه درمانی. بررسی نرخ بقا در این گروه نشان داد که روند مرگ و میر به طور معنادار متفاوت می‌باشد، به طوری که واکسن فاژی EM-L2 توانسته بود تا حدی موجب افزایش میزان بقا در حیوانات گروه t-EM-L2 phage شود (P<۰/۰۵).

۴-۲۵) بررسی مقدار سایتوکاین‌های سرم موش‌ها در گروه درمانی و پیش‌گیری

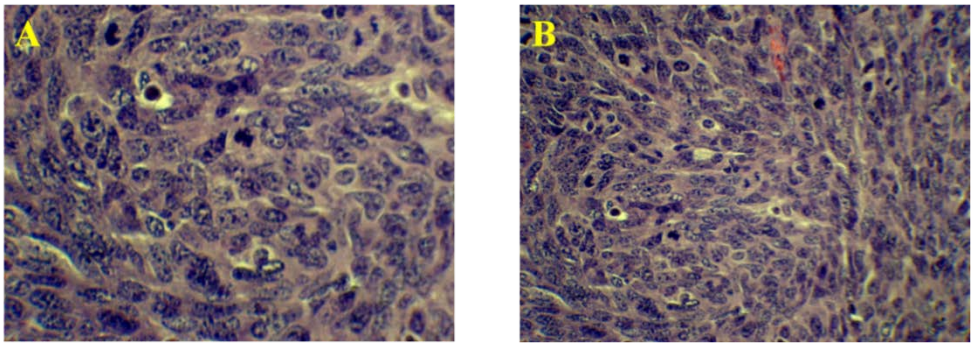
به منظور مطالعه پولاریزاسیون سیتم ایمنی به سمت ایمنی هومورال یا سیستم ایمنی سلولی میزان سایوکاینهای سرم موش‌های گروه درمانی و پیش‌گیری اندازه‌گیری شد. برای این منظور مقدار سایتوکاین IL-4 (به عنوان سایتوکاین ایمنی هومورال) و همچنین مقدار سایتوکاین IFN-γ (به عنوان سایتوکاین ایمنی سلولی) بر حسب pg/ml اندازه گیری شد. نتایج نشان میدهد همه آنتیژنها توانسته اند هم ایمنی سلولی و هم ایمنی همورال را تحریک کنند. در این میان تفاوت معنا داری بین گروههای دریافت کننده آنتیژن مشاهده نشد اما همه این گروهها با گروه PBS تفاوت معنادار داشتند (شکل 4-۳۲).



شکل ۴-۳۶) اندازه‌گیری غلظت سایتوکاین‌های سرم در موش‌های گروه درمانی و پیش‌گیری. A: غلظت IL-4 در موش‌های گروه پیشگیری . B: غلظت IFN-γ در موش‌های گروه پیش‌گیری. C: غلظت IL-4 در موش‌های گروه درمانی. D: غلظت IFN-γ در موش‌های گروه درمانی. P نشان دهنده گروه پیشگیری و t نشان دهنده گروه درمانی است. نتایج نشان میدهد همه آنتیژنها توانسته اند هم ایمنی سلولی و هم ایمنی هومورال را تحریک کنند.

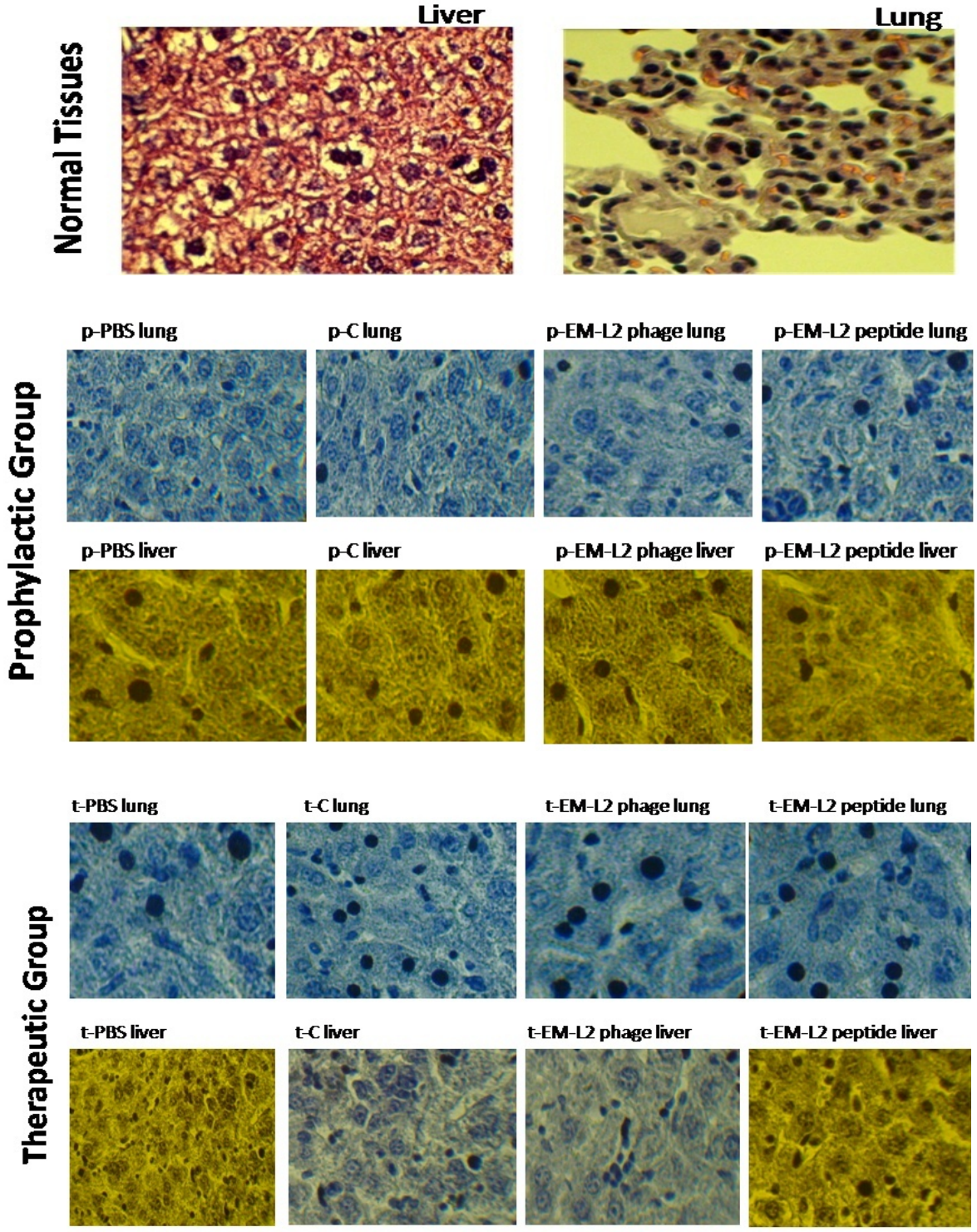
۴-۲۶) نتایج بررسی بافتی

ابتدا برای اثبات توموری بودن بافت توموری ایجاد شده برش بافتی از تومور تهیه گردید و رنگ آمیزی H&E انجام گردید. برای این منظور از بافت تومور حیوانات در هر یک از گروههای موش تیمار شده درمانی و پیشگیری برش بافتی تهیه گردید و سپس لام مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که بافت ایجاد شده توسط سلول LL/2 در تمام گروههای حیوانی یک بافت کاملا توموری با نرخ ارتشاح ۱۰۰٪ می‌باشد. مطالعات میکروسکوپی نشان دهنده بافت توموری به صورت undifferentiated carcinoma به همراه درصدی از نکروز و همچنین میتوز فراوان می‌باشد (شکل۴-۳۳).



شکل ۴-۳۷) بررسی پاتولوژیک بافت تومور. برش بافتی تهیه شده از تومور در گروه درمانی شکل (A). برش بافتی تهیه شده از تومور در گروه پیش‌گیری شکل (B). ظاهر بافت نشان دهنده توموری بوده نمونه با ارتشاح ۱۰۰ ٪ است.

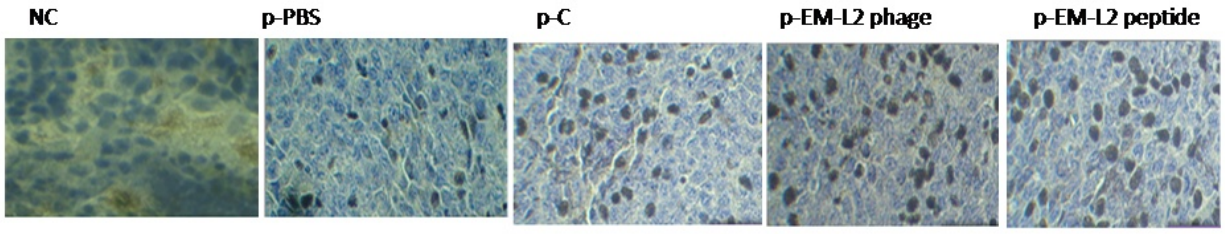
سپس بمنظور بررسی متاستاز بافت ایجاد شده، بافتهای مجاور تومور شامل ریه و کبد مورد بررسی و مطالعه بافتی قرار گرفت. در هیچ کدام از این بافتها در هیچ یک از گروههای مورد مطالعه الگوی توموری مشاهده نشد و تمام بافتها از نظر پاتولوژی الگوی نرمال و غیر پاتولوژیک را نشان دادند (شکل ۴-۳۴). این نتایج نشان داد که در این مدل توموری متاستاز به سایر بافتها رخ نداده است و تومور محدود به محل تزریق باقی مانده است.



شکل ۴-۳۸) بررسی پاتولوژیک بافت‌های کبد و ریه در موش‌های گروه درمانی و پیش‌گیری. از بافت‌های ریه و کبد موش‌ها در گروه درمانی و پیش‌گیری برش تهیه و پس از رنگ آمیزی مورد مطالعه و مقایسه با بافت‌های مذکور در موش نرمال قرار گرفت. نام هر عکس در بالای آن ذکر شده است. t نشان دهنده گروه درمانی و p نشان دهنده گروه پیشگیری است.

۴-۲۷) ایمونوهیستوشیمی به منظور بررسی $EGFR^{+}$ بودت تومور

از بافت تومور ایجاد شده در موش‌های گروه پیشگیری بیوپسی انجام شده و سپس از آنها بلوک پارافینی تهیه گردید. بلوکهای پارافینی برش زده شده و بافت تومور مورد مطالعه جهت بررسی وجود سلول‌های EGFR مثبت در تست ایمونوهیستوشیمی مورد آزمون قرار گرفت. برای این کار از رقت۱/۲۰۰ آنتی‌بادی علیه EGFR (Dako, M3563) به عنوان آنتی‌بادی اولیه و رقت ۱/۵۰۰۰ آنتی‌بادی پلی کلونال ضد موشی متصل به HRP به عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شده بود. به اسلاید کنترل منفی آنتی‌بادی اولیه اضافه نشده بود (شکل ۴-۳۴). این تست در بخش پاتولوژی بیمارستان امام خمینی انجام شده است.



ز. بافت توموری پس از نمونه برداری و قالب گیری برش داده شده و مقطع روی لام انتقال داده شد. کنترل منفی (NC). برای این کار از بافت توموری موش تیمار شده گروه پیشگیری استفاده شد. نام گروه موشی در بالای عکسها آمده است.

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

۵) فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵-۱) بحث

هدف از این مطالعه طراحی و تولید واکسنهایی برای ایمنی درمانی سرطانهای توموری بیان کننده پروتئین EGFR بوده است. این تحقیق بخشی از یک پروژه چندین ساله میباشد که کماکان در حال ادامه است.

سرطان یکی از شایع ترین علل مرگ و میر در سراسر جهان است و هر ساله بیش از ۶ میلیون نفر مرگ و بیش از ۱۰ میلیون مورد جدید سرطان گزارش می‌شود. سالانه میلیاردها دلار صرف تحقیقات در زمینه سرطان می شود. با این حال، پیشرفت های حاصل شده در این زمینه به میزان کافی مطلوب نبوده است.

اخیراً پیشرفت های مهم در بیولوژی مولکولی، بیولوژی سلولی و ژنوم موجب قدرت بخشیدن دانسته‌های بشری در مورد سرطان و بازشدن مسیرها جدید برای درمان سرطان شده است. این مطالعات منجر به شناسایی مارکرهای سرطانی گشته است که تا حدی عامل تمایز بین سلول سرطانی و سلول نرمال می باشند. با شناسایی مارکر های سرطانی، امکان ایجاد درمان هایی که توانایی تمایز سلول های نرمال و سرطانی را دارا می باشند حاصل گشته است. این درمان های جدید بر خلاف سیستم های درمانی اولیه بر علیه سرطان مانند رادیودرمانی و شیمی درمانی عوارض جانبی کمتری داشته و هدفمندتر عمل می کنند. برای مثال می توان به استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال در درمان اشاره کرد که منجر به تایید تعداد قابل توجهی از این آنتی بادی ها توسط FDA برای درمان سرطان گشته است.

فاژها موارد استفاده ی فراوانی در بیوتکنولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی دارند که از مهمترین کاربردهای آن ها می توان به تکنولوژی نمایش فاژی اشاره نمود که دارای کاربردهای بسیار در طراحی واکسن و بخصوص واکسن های سرطانی است. با این تکنولوژی می توان آنتی ژن های غالب و شاخص عوامل بیماری زا و سلول های سرطانی را پیدا نمود. واکسن‌های فاژی را می‌توان به راحتی و با صرف هزینه کم در مقیاس بالا تولید نمود و پایداری بالای فاژ در مقابل شرایط سخت محیطی مدت نگهداری این واکسن‌ها را افزایش می‌دهد.

از طرفی در مطالعات قبلی نشان داده شده است که واکسن‌های فاژی نیازی به استفاده از ادجوانت ندارند. در مطالعهای که توسط Hashiguchi و همکاران انجام شد با تزریق فاژ M13 به موش آنها پاسخ ایمنی شدیدی علیه این فاژ مشاهده کردند. آنها فاژ را بدون استفاده از ادجوانت تزریق کردند و این قدرت ایمنی‌زایی فاژ بدون استفاده از ادجوانت را به عنوان یکی از ویژگیهای مهم واکسن‌های

فاژی بیان کردند[۹۸]. از استفاده های دیگر این تکنولوژی بدست آوردن نقشه ی اپی توپی آنتی بادی هاست. امروزه برای این منظور عمدتا از کتابخانه‌های نمایش فاژی پپتیدهای تصادفی استفاده می‌شود. دراین کتابخانه‌ها تا $۱۰^{۱۰}$ پپتید با توالیهای مختلف که معمولا در سطح پروتئین pIII فاژ Ff بیان می‌شوند، وجود دارد. با انجام چند مرحله غنی‌سازی می‌توان به فاژهایی که پپتید برهمکنش کننده با آنتی‌بادی مورد نظر را بیان می‌کنند، دست یافت. معمولا پپتید به دست آمده شباهت توالی با آنتی‌ژن اصلی (مارکر سرطانی) ندارد، بلکه تقلیدی از ساختار آن می‌باشد. به چنین توالی‌هایی می‌موتوپ گفته می‌شود که به معنای مقلد اپی توپ است. میموتوپ به کار رفته در این تحقیق نیز با استفاده از یک کتابخانه فاژی توسط نواری و همکاران به دست آمده است [۲۳].

از مارکرهای سرطانی که در سال های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است EGFR می باشد. EGFR یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی ۱۷۰ کیلودالتون متعلق به خانواده HER از خانواده گیرنده های تیروزین کینازی می باشد. در خانواده HER علاوه بر EGFR سه عضو دیگر نیز وجود دارد که از نظر توالی و عملکرد رابطه تنگاتنگی با EGFR دارند. به دنبال اتصال لیگاند به EGFR، گیرنده با همتای خود و یا یکی دیگر از اعضای خانواده تشکیل هومو یا هترودایمر داده و آبشارهای پیام رسانی را فعال می کند که در نهایت منجر به رشد، تکثیر، تمایز و مهاجرت سلولی خواهد بود. EGFR در ۳۰٪-۵۰٪ تومورهای جامد دیده می شود و نشان داده شده است که پیام رسانی تنظیم نشده آن روندهای دخیل در بدخیمی مشتمل بر تکثیر و بلوغ، رگ زایی تهاجم، متاستاز و ممانعت از آپوپتوز را ارتقا می دهد. سلول های سرطانی توسط چندین مکانیسم پیام رسانی EGFR را از حالت کنترل شده خارج می کنند که مشتمل بر تولید لیگاند و ایجاد حلقه اتوکرین، جهش و تکثیر ژن EGFR و گریز از تجزیه به واسطه آندوسیتوز می باشد [۲۲].

سیستم ایمنی بدن بصورت بالقوه این توانایی را دارد که سلول‌های سرطانی را از سلول‌های طبیعی تشخیص دهد و استفاده از سیستم ایمنی در راستای درمان سرطان ایمنی درمانی نامیده می‌شود که اخیرا بیشتر به آن توجه میشود. ویلیام کلی اولین کسی بود که با استفاده از عصاره کشت استرپتوکوکال سعی در به کارگیری سیستم ایمنی در راستای ایمنی درمانی سرطان را داشت از این رو او را پدر ایمنی درمانی سرطان می‌نامند [۹۹]. از زمان ویلیام کلی تا کنون روش‌های ایمنی درمانی دستخوش پیشرفتها و تحولات چشمگیری شدهاند و می‌توان به طور کلی آنها را به دو دسته ایمنی درمانی فعال و غیرفعال تقسیم نمود که هر کدام از آنها شامل روش‌های اختصاصی و غیر اختصاصی میشوند.

روش‌های غیرفعال اختصاصی شامل استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌شود که بیشترین استفاده را در ایمنی درمانی سرطان دارند و بیشترین مطالعات برروی آنها صورت گرفته است.

آنتی‌بادی‌ها با روش‌های مختلفی سلول‌های سرطانی را از بین میبرند: مهار گیرنده فاکتور رشد و القای اپوپتوز، به کارگیری سیستم کمپلمان برای لیز کردن سلول‌های سرطانی و فعال‌سازی خاصیت کشندگی سلول‌های سیتم ایمنی ذاتی مانند سلول‌های NK و ماکروفاژها در مجاورت سلول‌های سرطانی و در نهایت مرگ سلول‌های سرطانی [۲۷].

همچنین آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برداشت آنتی‌ژنهای سرطانی را توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن تسهیل می‌کنند و به این ترتیب باعث تحریک سلول‌های سیستم ایمنی سلولی علیه سلول‌های سرطانی میشوند. از معایب استفاده از آنتی‌بادی‌ها علاوه بر هزینه بالا، نیمه عمر کوتاه آنها و نیاز به تکرار در تجویز است [۱۰۰]. از سوی دیگر اغلب این آنتی‌بادی‌ها دارای بخشهای غیرانسانی میباشند که منجر به ایجاد واکنش ناخواسته با سیستم ایمنی می‌شود.

روش‌های فعال غیر اختصاصی شامل استفاده از انواع ادجوونت‌های باکتریایی و شیمیایی و همچنین انواع سایتوکاین‌ها می‌شود که باعث ایجاد پاسخهای التهابی و افزایش کلی فعالیت سیستم ایمنی و در نهایت فعال شدن سیستم ایمنی در مقابل سلول‌های سرطانی می‌شود [۱۰۱-۱۰۲].

روش‌های ایمنی درمانی اختصاصی به انواع واکسن‌های سرطانی گفته می‌شود که می‌توانند پیش‌گیری کننده یا درمانی باشند. برتری این روش‌ها که زمینه اصلی تحقیق حاضر نیز میباشد، نسبت به سایر روش‌ها ایجاد خاطرهی ایمنی است که می‌تواند در حالت ایدهآل تا آخر عمر همراه فرد باقی بماند و او را از بازگشت سرطان و یا ابتلای به سرطان حفظ کند [۲۹-۳۰]. روش‌های مختلفی برای واکسیناسیون در مقابل سرطان وجود دارد. واکسن‌های برپایه سلول از اولین واکسن‌هایی بودند که برای درمان سرطان به کار گرفته شدند. با پیشرفت علم و شناخت هرچه بیشتر آنتی‌ژنها روش‌های واکسیناسیون نیز متحول شدند و واکسن‌هایی نظیر واکسن‌های پروتئینی، پپتیدی، واکسن‌های برپایه نوکلئیک اسید، واکسن‌های برپایه وکتورها و واکسن‌های برپایه سلول‌های دندریتیک، مورد مطالعه قرار گرفتند [۳۵].

در بحث واکسن سرطان یکی از موارد مورد توجه یافتن آنتی‌ژن سرطانی مناسب می‌باشد. عمده آنتی‌ژنهای سرطانی را آنتی‌ژنهای افزایش بیان یافته تشکیل می‌دهند که EGFR یکی از آنها به شمار میرود. همان طور که ذکر شد EGFR در تنظیم رشد و تمایز سلولی نقش دارد و از این رو میتواند دارای قابلیت سرطان زایی باشد. افزایش بیان در EGFR در بسیاری از سرطان‌ها شامل سرطان‌های ریه، سینه، پروستات، سر وگردن و حتی در گلایوبلاستوماها نیز مشاهده شده است که در ارتباط مستقیم با رشد و تهاجم سرطان، مقاومت به شیمی درمانی و رگزایی است [۲۱].

با معرفی EGFR به عنوان یک هدف درمانی سرطان در اوایل دهه ۸۰ میلادی، عوامل درمانی مختلفی علیه EGFR تولید شدهاند. دو دسته از این عوامل بیش از دیگران موثر واقع شده و تعدادی

از آنها هم اکنون توسط FDA برای درمان مورد تایید قرار گرفته و یا در فاز آزمایشی قرار دارند که مشتمل بر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (نظیر Cetuximab) و مولکول‌های کوچک مهارکننده تیروزین کینازی میباشند [۱۰۳]. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال که به دومن خارج سلولی EGFR متصل می‌شوند توسط سه مکانیسم اصلی از پیام رسانی EGFR جلوگیری می‌کنند که مشتمل بر ممانعت از اتصال لیگاند به گیرنده، القای اندوسیتوز گیرنده و القای ADCC می‌باشد [۱۰۴]. در مقابل مهارکنندههای تیروزین کینازی به دومن تیروزین کینازی گیرنده در بخش درون سلولی گیرنده متصل میشوند و مانع از پیام رسانی گیرنده میشوند [۱۰۵].

واکسیناسیون علیه مارکر سرطانی می‌تواند جایگزین دیگری برای آنتی‌بادی‌های مونوکلونال باشد [۱۰۶]. بدین منظور می‌توان از مولکول مارکر به عنوان واکسن استفاده کرد. اما این روش محدودیت - های خاص خود را دارد. بسیاری از مارکرهای سرطانی که هدف آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌باشند مانند EGFR و HER2 گیرندههای فاکتور رشد میباشند. واکسیناسیون با مولکول مارکر می‌تواند به تولید آنتی‌بادی‌های تحریک کننده گیرنده به جای آنتی‌بادی‌های مهارکننده منجر شود . از سوی دیگر بسیاری از اپی توپهای موجود در طبیعت از نوع فضایی میباشند و ممکن است در مراحل پردازش آنتی‌ژن از بین بروند. نکته قابل توجه دیگر ترکیب شیمیایی مارکرهای سرطانی می‌باشد. برخی از این مارکرها ترکیب گلیکولیپیدی و یا کربوهیدراتی دارند که آنتی‌ژنهای ضعیفی هستند [۱۰۷].

یک راه حل جایگزین می‌تواند تعیین نقشه اپی توپی یک آنتی‌بادی موثر علیه مارکر و استفاده از میموتوپ به دست آمده به عنوان واکسن باشد [۵۱]. مزایای استفاده از واکسن‌های می‌موتوپی در مقایسه با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال قابل توجه می‌باشند . ترکیب شیمیایی این ترکیبات تعریف شده بوده و هزینه سنتز این پپتیدها در مقایسه با آنتی‌بادی‌ها ناچیز می‌باشد. به علاوه از لحاظ شیمیایی پایدار بوده و می‌توان آنها را به صورت لیوفیلیزه به مدت طولانی نگهداری کرد. آنها پاسخ ایمنی از قبل تعریف شدهای را القا می‌کنند و در نتیجه از تولید آنتی‌بادی‌های ناخواسته جلوگیری می‌شود. آنتی‌بادی‌های تولید شده انسانی بوده و با سیستم ایمنی برهم کنش ناخواسته ندارند. از سوی دیگر این آنتی‌بادی‌ها از کلاسها و زیرکلاسهای مختلف میباشند و از کل ظرفیت سیستم ایمنی برای سرکوب تومور استفاده می‌کنند. همچنین این واکسن‌ها می‌توانند جایگزین مناسبی برای مارکرهایی از جنس کربوهیدرات باشند [۵۱].

Riemer و همکاران از چنین استراتژیای برای تولید یک واکسن پپتیدی علیه EGFR استفاده کردند. آنها با تعیین نقشه اپی توپی آنتی‌بادی Cetuximab (Erbitux) به دو می‌موتوپ این

آنتی‌بادی دست یافتند که پس از اتصال به پروتئین KLH[98] به عنوان حامل و تزریق به موش، توانایی تولید آنتی‌بادی علیه EGFR را داشتند. آزمون بررسی رشد نشان داد که آنتی‌بادی‌های تولید شده توانایی ممانعت از رشد رده سلولی A431 را دارا بودن [۱۰۸]. همچنین در مطالعه دیگری Li و همکاران با استفاده از آنتی‌بادی Avastin (آنتی VEGF آنتی‌بادی) می‌موتوپ VEGF را از کتابخانه پپتیدی جدا کردند که پپتید جدا شده افینیتی بالایی به Avastin نشان داد. این می‌موتوپ سپس سنتز و به پروتئین حامل KLH کونژوگه گردید و ایمنی‌زایی موش‌ها با این واکسن به طور موثری باعث فعال شدن سیستم ایمنی هومورال موش گردید. همچنین سرم موش‌های ایمن شده با این واکسن می‌موتوپی مانع از اتصال VEGF به VEGFR و بنابراین مهار تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروق گردید[۱۰۹].

میموتوپی که در طراحی واکسن پپتیدی این مطالعه به کار رفته است پس از غنیسازی کتابخانه فاژی علیه ICR62 به دست آمده و توالی آن در جدول ۱-۹ آمده است. خاصیت ضد سرطانی این پپتید در مطالعات متعددی بررسی شده است [۲۳-۲۵].

واکسن های مبتنی بر پپتید بر این فرض استوار هستند که در سلول های سرطانی برخی از آنتی ژن های مرتبط با تومور (TAAs) بیان میشوند که در بافت سالم یا وجود ندارند و در سطوح پایین بیان میشوند . از جمله آنتیژنهایی که در این رابطه مورد استفاده قرار گرفتهاند میتوان به دومین خارج سلولی EGFR، CEA و MUC-1 اشاره نمود [۴۶].

در راستای بدست آوردن واکسنی جهت تومورهای سرطانی EGFR، ابتدا نواری و همکاران نقشه اپی توپی آنتی‌بادی ICR-62 را از کتابخانه پپتیدی تصادفی ۱۲ اسید آمینه‌ای به دست آوردند. سپس این پپتید به صورت متصل به BSA به موش و خرگوش تزریق شد و یافتهها نشان داد که آنتی‌بادی ایجاد شده با EGFR واکنش متقاطع دارد و رشد سلول‌های بیان کننده EGFR در شرایط In Vitro را مهار می‌کند [۲۳]. در ادامه اسدی و همکاران ژن کد کننده این پپتید را در وکتور فاژمیدی pAK8-GVO77 کلون کردند و بر روی پروتئین ۸ فاژ M13 به نمایش در آوردند. واکسن فاژی مذکور به موش تزریق و پاسخ ایمنی ایجاد شده بررسی شد که نتایج نشان میداد آنتی‌بادی علیه می‌موتوپ ایجاد شده است [۲۴]. ضمنا واکسن مذکور در مطالعات حیوانی خاصیت پیشگیری کننده-ای نداشت اما توانسته بود در موشهای گروه درمانی به طرز معنا داری رشد تومورهای EGFR مثبت را کندتر کند. جهت تقویت و عملکرد این واکسن جوانمردی و همکاران میموتوپ را به صورت سه تایی

98- keyhole limpet hemocyanin

روی فاژ M13 نمایش دادند که نتایج آنها تا حدی نسبت به نتایج اسدی و همکاران بهتر شده بود [۲۵].

مطالعه حاضر طراحی و ساخت واکسنی قویتر از سه حوزه فاژ، واکسن پپتیدی و میموتوپ الهام گرفته و دو واکسن پپتیدی و فاژی تولید شده است. اساس این واکسنها پروتئین نوترکیب فیوژنی است که از "میموتوپ EGFR" و "دومین خارج سلولی L2 از EGFR" تشکیل شده است که به اختصار EM-L2 نامیده شد. یک واکسن، پپتید EM-L2 بیان شده در باکتری E.coli و واکسن دوم EM-L2 نمایش داده شده بر روی فاژ M13 بود.

هدف از این کار افزایش پتانسیل مهار کنندگی واکسن بود و پیش فرض این مطالعه این بود که پپتید EM-L2 نمایش داده شده روی فاژ قدرت بیشتری نسبت واکسنهای قبلی و نیز نسبت به پپتید EM-L2 بیان شده در باکتری E.coli دارد.

بدین منظور ابتدا به کمک مطالعات in silico توالی آنتیژن مورد نظر به دست آمد (جدول ۱-۳). نتایج مطالعات نرمافزاری نشان داد که پپتید مورد نظر از نظر ساختاری پایدار بوده و از آنتی ژنسیته خوبی برخوردار است. ضمنا در بررسی برهمکنش Cetuximab با قسمت خارج سلولی EGFR نشان داده شده که این آنتیبادی با دومین L2 برهمکنش دارد [۱۱۰] و بررسی ساختار سوم پپتید EM-L2 نیز نشان داد که این بخش از پروتین در در پپتید EM-L2 نیز موجود است. ژن به دست آمده از پپتید به صورت شیمیایی سنتز و در وکتور pAK8-VIII-EM.L2 کلون شد و سازه M13-pAK8-VIII-EM.L2 ساخته شد. پس از ترانسفورماسیون این سازه به باکتری TG1 و آلوده کردن باکتری حامل آن با فاژ کمکی ذرات فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 ساخته شدند.

در واقع یکی از اهداف اولیه در این تحقیق، ساختن ذرات فاژی‌ای بود که روی پروتئین‌های ۸ خود به صورت تصادفی (موزاییک) پپتید EM-L2 را هم نمایش دهد. تعداد پروتئین‌های هشتی که بدین ترتیب نوترکیب شده و پپتید را نمایش می‌دهند دقیقا مشخص نیست، اما با توجه به مقالات مرتبط و اندازه پپتید، می‌توان این تعداد را حدود ۱۵۰ تخمین زد که این در مقایسه با پروتئین ۳ به مراتب بیشتر است [۹۶].

منوچاریان[99] و همکاران از باکتریوفاژ M13 و سیستم نمایشی ۸+۸ برای واکسینه کردن خوکها علیه انگل سیستی‌سرکوزیس[100] استفاده نموده‌اند و موفق به ایجاد ایمنی علیه این انگل در خوکها شده‌اند [۱۱۱]. در مطالعه‌ای که توسط هوتن[101] و همکاران انجام شده یک پپتید سنتزی، هم روی پروتئین ۸ فاژی نمایش داده شد و هم با اووالبومین کونژوگه شد تا میزان تولید آنتی‌بادی علیه پپتید سنتزی

[99] Manoutcharian
[100] cysticercosis
[101] Houten

را بررسی نمایند. نتایج آنها نشان داد که آنتی‌بادی علیه پپتید در حیوانات ایمن شده با فاژ بیشتر بوده تا حیوانات ایمن شده با کونژوگه اووالبومین - پپتید [۱۱۲] که این یافتهها نشان می‌دهد که فاژ پتانسیل استفاده جهت واکسیناسیون و تحریک سیستم ایمنی را دارد.

بررسیها نشان میدهد که پس از آلوده یا ابر آلوده شدن باکتری حاوی سازه نوترکیب M13-pAK8-VIII-EM.L2 حدود ده دقیقه زمان لازم است که ذرات فاژی شروع به خارج شدن از باکتری‌ها کنند [۱۱۳].

همان طور که قبلا ذکر شد قطر این ذرات حدود ۷ و طول آنها با توجه به DNA قرار گرفته در آن می‌تواند تا ۹۰۰ نانومتر باشد، لذا می‌توان این ذرات را نانوذره هم به حساب آورد کما اینکه پیش از این نیز برخی محققان ، فاژها از جمله فاژ T4 نمایش دهنده Flt4 را به عنوان nanometer phage معرفی کرده‌اند [۱۱۴-۱۱۶]. از طرف دیگر این ذرات توانایی آلوده کردن باکتری را دارند اما وقتی وارد باکتری شدند، بدون حضور فاژ کمکی، توانایی تکثیر به عنوان فاژ را نداشته و اساسا خاصیت فاژی خود را از دست می‌دهند، لذا نمی‌توان آنها را فاژ کامل به حساب آورد و به همین دلیل این ذرات نانوذره شبه فاژی نامیده شدند.

برای نشان دادن نمایش داده شدن پپتید EM-L2 روی سطح فاژ، از تست الایزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های ICR62، ICR61 و IgG خرگوشی علیه می‌موتوپ استفاده شد که نتایج در قیاس با فاژمید کنترل و آنتیبادی غیر مرتبط موید نمایش پپتید روی سطح فاژ بودند.

فاژها پس از تکثیر، تغلیظ و تیتراسیون به تعداد 10^{12}pfu در هر PBS 150µl تنظیم شدند و برای ایمن‌سازی حیوانات مورد استفاده قرار گرفتند.

برای تولید واکسن پپتیدی EM-L2 بیان شده در E.coli با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ژن پپتید EM-L2 تکثیر و در وکتور بیانی pET32a سابکلون گردید. سازه جدید سپس به باکتری Bl21 ترانسفورم و پپتید مذکور بیان و پس از آن تخلیص شد. پس از تخلیص برای هر تزریق حدود ۱۰۰ میکروگرم از آنتیژن به همراه ادجوانت فروند با نسبت ۱:۱ به کار برده شد.

برای ایجاد مدل حیوانی تومور از رده سلولی LL/2 و موش‌های C57BL/6 استفاده شد. رده سلولی LL/2 مشتق شده از نوعی کارسینومای ریوی است که کارسینومای ریوی لوییس نام دارد و بطور خود بخودی در ریه موش‌های C57BL/6 ماده ایجاد می‌شود. دلیل انتخاب این سلول‌ها و موش‌ها در درجه اول بدلیل بیان بالای EGFR در این سلول‌ها می‌باشد [۱۱۷] و در درجه دوم توان بالای تومورزایی این سلول‌ها در موش‌های C57BL/6 است [۱۱۸]. در بسیاری از مطالعات نیز از این سلول‌ها برای ایجاد مدل تومور استفاده شده است [۱۱۴, ۱۱۷]. در تعدادی از مطالعات از این سلول‌ها برای ایجاد مدلهای توموری بیان کننده EGFR استفاده شده است [۴۸, ۱۱۹]. در مراحل اولیه این کار قائم و

همکاران با استفاده از آزمون فلوسایتومتری نشان دادند که آنتیبادی ICR62 میتواند با سلولهای LL/2 برهمکنش دهد [۱۲۰]. همانند مطالعات قبلی [۲۴-۲۵] نرخ تومورزایی در این مطالعه نیز ۱۰۰درصد گزارش شد.

در گروه پیش‌گیری موش‌ها ابتدا چهار بار و به مدت یک ماه و هربار با تیتری معادل 10^{12} با واکسن فاژی و با حدود ۱۰۰ میکروگرم از آنتیژن پپتیدی ایمن‌سازی شدند، در روز هفتم پس از آخرین تزریق، از موش‌ها به منظور بررسی پاسخ آنتی‌بادی، خون گرفته و تعداد حدود 10^{6} سلول LL/2 به هرکدام از موش‌ها تزریق شد.

در گروه درمانی ابتدا به موش‌ها تعداد 10^{6} سلول LL/2 تزریق شد و پس از اینکه تومورها قابل لمس شدند، موش‌ها مانند گروه پیش‌گیری کنندگی به چهار زیر گروه تقسیم شدند.

در بیشتر تحقیقات مثل مطالعه انجام شده توسط وان[102] و همکاران، از فاژ وحشی جهت کنترل استفاده شده است [۱۲۱]. اما در این تحقیق با توجه به ماهیت شبه‌فاژی و روش تیتراسیون به نظر میآید که فاژ نمایش دهنده پپتید β2m (غیر مرتبط) می‌تواند گزینه بسیار ایدهآلی به عنوان کنترل باشد. این پپتید توسط یک قطعه DNA با طول حدود ۱۳۰۰ جفت باز رمزدهی می‌شد و طولی بیش از ۴۲۰ اسیدآمینه داشت که حدودا ۳ برابر طول پپتید EM-L2 می‌باشد. با توجه به مارکر انتخابی و ماهیت کنترل، کار با آن دقیقا شبیه کار با فاژمید نوترکیب ساخته شده بود و این شرایط بین کنترل و نمونه را بیش از پیش یکسان می‌کند. به گروه کنترل منفی نیز PBS خالی تزریق شد. پس از تشکیل تومور ابعاد تومور هر دو روز اندازه گیری شد و نتایج به صورت نمودار رسم شد.

در ایمن سازی با استفاده از آنتی ژن های پروتئینی نوترکیب می توان از پروتئین کامل و یا دومین های خاصی از پروتئین ها استفاده نمود. به دلیل اینکه سیستم ایمنی به آنتی ژن های خودی تولرانس نشان می دهد معمولا از هومولوگ های حیوانی آن ها استفاده می شود و یا اینکه پروتئین های خودی به صورت فیوز شده با یک ایمونوژن قوی و یا به همراه ادجوونت به منظور از بین بردن تولرانس تجویز می شوند. در مورد آنتی ژن های سرطانی (خصوصا گیرنده های فاکتور های رشد و تمایز مانند EGFR) پاسخ سیستم ایمنی بر علیه اپی توپهای متفاوت آنتی ژن می تواند اثرات متفاوتی داشته باشد، و میتواند دارای خاصیتی مهار کنندگی و یا حتی تشدید کنندگی تومور باشد. از این رو استفاده از پپتید ها برای ایمن سازی به دلیل اینکه پاسخ ایمنی را محدود به اپی توپ های خاصی از آنتی ژن می کند می تواند مفید باشد [۴۷].

مقاومت سیستم ایمنی به TAAها نشان دهنده یک چالش مهم در ایمونوتراپی سرطان انسان است و دراستراتژی هر واکسن موفق ، باید به این موضوع پرداخته شده باشد. نتایج آزمایشگاهی که

[102] Wan

به تازگی منتشر شده است نشان میدهد که شکستن مقاومت ایمنی به آنتیژن خودی تحت این اصل که شناسایی آنتیژن خودی یک پدیده فیزیولوژیک است ممکن میباشد [۱۲۲].

این امر که EGFR یک آنتیژن گسترده در سلولهای اپیتلیال بدن میباشد بیانگر آن است که این پروتئین به خودی خود یک ایمنوژن ضعیف بوده و هر گونه طراحی واکسن بر مبنای این آنتیژن را کمی سخت مینماید.

در مطالعه سانچز رامیرز[103] و همکاران (۲۰۰۶)، این محققان قسمت خارج سلولی EGFR موش و انسان را با استفاده از وکتور pCDNA3 در سلولهای HEK293 تولید نموده و پس از تخلیص موشها را با آنها به کمک ادجوانتهای مختلف (FA و VSSP) ایمن کردند. نتایج آنها نشان داد که آنتیبادی به میزان قابل قبولی علیه EGFR موشی در بدن موشها تولید شده است[۴۸].

در مطالعه دیگری که توسط سانچز رامیرز در سال ۲۰۰۸ انجام شده بود، قسمت خارج سلولی EGFR انسانی با استفاده از ذرات بسیار ریز پروتئولیزوزوم (VSSP) به عنوان ادجوانت به موش تزریق شد و اینبار نیز نتایج مشابهی به دست آمده بود [۱۰۶].

در این مطالعه نیز برای واکسن پپتیدی از ادجوانت کامل و ناقص فروند جهت ایمنی زایی موشها استفاده شد در حالیکه برای تزریق واکسن فاژی از ادجوانت استفاده نگردید. نتایج نشان داد که هر دو نوع واکسن توانسته بودند سیستم ایمنی را تحریک و منجر به تولید آنتیبادی علیه EM-L2 شوند. این نتایج همانند نتایج رامیرز نشان میدهد که با استفاده از ادجوانت و یا حامل مناسب مانند فاژ ،که خود نیز با وجود توالی های غنی از GC میتواند نقش محرک سیستم ایمنی و ادجوانتی بازی کند، میتوان مقاومت ایمنی نسبت به TAAها را شکست و بدن را به تولید آنتیبادی علیه این آنتیژنها واداشت. هرچند با توجه به شرایط و ماهیت آنتیژنها قیاس نمیتواند جامع باشد اما مقایسه اولیه نشان داد که واکسن پپتیدی در مجموع آنتیژن بهتری بوده است به طوری که در رقت ۱/۴۰۰۰ سرم موشهایی که با فقط با پپتید EM-L2 ایمن شده بودند اختلاف OD بیشتری نسبت به سرم موشهایی که با واکسن فاژی ایمن شده بودند نشان دادند که این نتایج به نظر مغایر با نتایج هوتن [۱۱۲] و همراستا با نتایج یام[104] [۱۲۳] میباشد. تولید آنتیبادی علیه پپتید EM-L2 در گروه دریافت کننده واکسن فاژی نمایش دهنده این پپتید نیز یافته دیگری است که وجود پپتید EM-L2 در سطح پپتید را تایید میکند.

بر اساس نظریه ی سیگنال خطر که توسط Metzinger ارائه شد، ایجاد یک پاسخ ایمنی قوی و ماندگار نیازمند وجود سیگنال های خطر است که در مورد سلول های سرطانی سطح این سیگنال ها

[103] Sanchez Ramirez
[104] Yum

بسیار پایین میباشد. ادجوونت های باکتریایی و شیمیایی سیگنال های خطر لازم جهت فعال سازی سیستم ایمنی را تأمین میکند [۱۲۴].

برخی از ادجوانتهای دیگر که با فعالیت مشابه برای این منظور استفاده می شو ند عبارتند از MTP-PE، MF59، ISCOM و Detox. اولیگو دئوکسی نوکلئوتید های CpG که در فاژ نیز موجودند از دیگر ادجوونت هایی هستند که به منظور درمان و واکسیناسیون سرطان استفاده می شود [۱۲۵]. نتایج ما در این قسمت نشان میدهد که هم ادجونت فروند و هم خود فاژ میتوانند در تحریک سیستم ایمنی علیه TAAها خوب عمل نمایند.

در مطالعه دانگ و همکاران قسمتهای مختلف قسمت خارج سلولی EGFR مرغ را در سطح فاژ T7 به صورت فیوز شده با پروتئین پوششی 10B آن نمایش دهند. سپس فاژهای نوترکیب به عنوان واکسن به موشها تزریق و سپس موشها را با سلولهای سرطان ریه LL2/2C تلقیح و سرطانی نمودند. نتایج آنها نشان داد که این واکسن توانسته است تا حدود ٪ ۴۰ از ایجاد تومور ممانعت نماید. ضمن اینکه سلولهای لنفوسیت طحال به دست آمده از موشهای ایمن شده با این واکسن اثرات سمی علیه سلولهای A431 از خود نشان داده است [۱۲۶].

در مطاله سانچز سرم به دست آمده ناشی از تزریق قسمت خارج سلولی EGFR موشی به موش توانسته بود بدون حضور سیستم کمپلمان، از رشد سلولهای +EGFR در شرایط in vitro بیش از حدود ۵۰ درصد جلوگیری نماید [۴۸]. در مطالعه دیگری آنتیبادیهای پلیکلونالی که به دست آمده ناشی از تزریق قسمت خارج سلولی EGFR موشی به موش توانسته بودند نه تنها از رشد سلولهای +EGFR در شرایط in vitro جلوگیری کنند بلکه اپپتوز را نیز در آنها القا میکردند [۱۰۶]. میزان کاهش رشد تومور با استفاده از واکسن پپتیدی طراحی شده در این مطالعه نسبت به گروه کنترل برای گروه پیشگیری حدود ۴۵ ٪ و برای گروه درمانی حدود ۴۰٪ میباشد که از این نظر به مطالعه سانچز نزدیک میباشد. شایان ذکر است که پپتید این مطالعه با پپتید به کار رفته در مطالعه سانچز متفاوت میباشد.

در مطالعه انجام شده توسط جوانمردی واکسن فاژی طراحی شده توانسته بود حدود ۲۷٪ رشد تومور را کاهش دهد [۲۵] در حالیکه واکسن فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 در گروه پیشگیری ۳۳٪ و در گروه درمانی حدود ۵۰٪ رشد تومور را کاهش داده است و از این نظر نسبت به واکسن جوانمردی عملکرد بهتری داشته است.

نتایج مختلفی از بررسی اثر پیش‌گیری کنندگی واکسن‌های سرطانی بر روی تومورها بدست آمده است. در مطالعه جاکوبسون به طور مثال هیچ اثر پیش‌گیری کنندگی بر روی رشد تومور مشاهده نشده است [۱۲۷]. ولی در مطالعه دانگ و همکارانش که از دومینهای مختلف EGFR مرغ که بر

روی فاژ T7 به نمایش در آمده، به منظور واکسیناسیون استفاده کرده است، اثرات پیش‌گیری کنندگی قابل مشاهده است که با میزان آنتی‌بادی ایجاد شده علیه هر دومین چندان مرتبط نیست و دلیل آن می‌تواند عملکرد متفاوت دومین‌های مختلف EGFR و دخیل بودن سایر بخشهای سیستم ایمنی به جز ایمنی هومورال، نظیر ایمنی سلولی باشد [۱۲۶].

همچنین در مطالعهی رن که بر روی اثر پیش‌گیری کنندگی فاژ T4 نمایش دهنده mflt4 (از فاکتورهای دخیل در رگزایی) صورت گرفت، هیچ گونه اثر مهاری بر روی رشد تومور مشاهده نشده بود [۱۱۴].

در مطالعهای دیگر، از فاژ T4 نمایش دهنده mVEGFR2 (از گیرنده‌های فاکتورهای رگزایی) استفاده شده است. نتایج نشان داد که این فاژ توانسته بود تا حدی حیوان را در مقابل سلول‌های LLC محافظت کرده و رگ زایی بافت توموری را نیز کاهش دهد [۹۷].

در مطالعه فانگ و همکاران، پپتید اختصاصی تومور ملانوما (MAGE-A1) روی پروتین ۸ فاژ رشتهای نمایش و اثرات درمانی و پیشگیری کننده واکسن در موشهای توموری شده با رده سلولی B16.F10 بررسی شد. نتیجه نشان داد که واکسن فاژی توانسته بود رشد تومور را کم و نرخ بقا را به طرز معناداری افزایش دهد. پپتید نمایش داده شده در مطالعه ما نسبت به مطالعه ایشان هم از نظر اندازه و هم از نظر نوع آنتیژن تفاوت داشت اما نتایج این مطالعه هم مانند مطالعه فانگ کارامدی واکسنهای فاژی نمایش دهنده پپتید سرطانی را تایید میکند [۱۲۸].

بافت ایجاد شده در اثر تزریق سلول مورد مطالعه میکروسکوپی و پاتولوژی قرار گرفت و نتایج حاکی از این بود که بافت در هر دو گروه درمانی و پیش‌گیری دارای الگوی پاتولوژیک و توموری می‌باشد. سپس به منظور بررسی تهاجم بافتی و متاستاز، مطالعه پاتولوژی بر روی بافتهای مجاور تومور شامل ریه و کبد موش‌ها در گروههای درمانی و پیش‌گیری انجام شد. در تمام گروهها بافتهای کبد و ریه در مقایسه با بافت مشابه در موش نرمال الگوی مشابهی با بافت نرمال داشته و غیر پاتولوژیک بودند. از آنجاییکه بافت نرمال کبد و ریه هم در گروههای تیمار شده با واکسن فاژی و هم در گروههای کنترل (تیمار شده با فاژ کنترل و PBS) در هر دو گروه درمانی و پیش‌گیری مشاهده شد می‌توان گفت که احتمالا این نوع از تومور قادر به متاستاز نبوده و ارتباطی با نوع تیمار صورت گرفته بر روی گروههای حیوانی ندارد که این نتایج مشابه نتایج جوانمردی و همکاران است [۲۵]

در مطالعهای که توسط Ren و همکاران انجام شد اثر ضد توموری فاژ T4 نمایش دهنده mflt4 (از فاکتورهای دخیل در رگزایی) در مدل توموری موش بررسی گردید. آنها از رده سلولی LLC برای ایجاد تومور استفاده کردند و متاستاز به ریه را مشاهده کردند [۱۱۴] و از طرف دیگر Dong و

همکاران در مطالعه واکسن فاژی T7 نمایش دهنده دومن خارج سلولی EGFR از همین رده سلولی LLC استفاده کردند ولی هیچ گزارشی از مشاهده متاستاز در نتایج خود بیان نکردند [۱۲۶] .
با توجه به نتایج و اختلاف معناداری که بین اثر واکسن‌های فاژی و پپتیدی روی روند رشد تومور در مقایسه با گروه دریافت کننده PBS و گروه دریافت کننده فاژ کنترل وجود دارد می‌توان نتیجه گرفت که این واکسن توانسته روی روند رشد تومور تاثیر بگذارد. اگرچه اختلاف معناداری در تاثیر واکسن پپتیدی و فاژی EM-L2 در گروههای درمانی و پیش‌گیری در روند رشد تومور مشاهده نشد اما نتایج به دست آمده از الگوی رشد تومورها در دو گروه پیشگیری و درمانی نشان میدهد که ظاهرا در گروه پیشگیری واکسن پپتیدی و در گروه درمانی واکسن فاژی نتایج بهتری نشان داده اند. در مطالعه جوانمردی نیز مشاهده شد که بعد درمانی واکسن فاژی پتانسیل بهتری نسبت به بعد پیشگیری دارد و این امر در مورد واکسن فاژی با تکرار ۳ تایی بیشتر از واکسن فاژی با ۱ تکرار بود. این مطلب بیانگر این است که طول پپتید نمایش داده شده میتواند نقش بسزایی در عملکرد واکسن فاژی داشته باشد. البته با توجه عدم مشاهده اختلاف معنادار در تاثیر واکسن پپتیدی و فاژی EM-L2 در گروههای درمانی و پیش‌گیری در روند رشد تومور، فرض اینکه فاژ نمایش دهنده پپتید EM-L2 نسبت به پپتید EM-L2 خاصیت آنتیژنی بهتری دارد رد میشود.

از طرف دیگر مسئلهای که علاوه بر اندازه تومور در بررسی پتانسیل یک واکسن موثر می‌باشد، موضوع تاثیر آن واکسن بر روی طول عمر حیوان می‌باشد که این تاثیر نیز به خوبی در مورد واکسنها در گروههای درمانی و پیش‌گیری قابل مشاهده است، به طوری که میانگین بقا برای واکسن پپتیدی EM-L2 ۴۳/۵ روز و برای واکسن فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 ۴۱ روز در گروه پیشگیری می‌باشد. این ارقام برای گروه درمانی به ترتیب ۳۷ و ۳۹/۵ گزارش شد. در مقایسه با واکسن فاژی با تکرار ۳ تایی از میموتوپ، واکسنهای این تحقیق عملکرد بهتری داشته اند به طوری که درصد بقا در روز آخر برای گروه پیشگیری در مورد واکسن پپتیدی EM-L2 و واکسن قاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 به ترتیب ۵۰ و ۲۵ درصد بود درحالیکه این عدد برای واکسن فاژی با تکرار ۳ تایی ۱۶/۶ درصد گزارش شده بود. در روز آخر آزمون برای گروه درمانی در مورد واکسن فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 نرخ بقا ۲۵ درصد بود درحالیکه این عدد برای واکسن فاژی با تکرار ۳ تایی ۱۶/۶ درصد گزارش شده بود. بنابراین بهترین نتیجه در بررسی نرخ بقا متعلق به بعد پیشگیری واکسن پپتیدی EM-L2 میباشد.

با توجه به اینکه پپتید L2 موشی نمایش داده شده روی فاژ و تولید شده در باکتری از آنتیژنهای خودی است نگرانیهایی در مورد این امر که آنتیبادیهای ایجاد شده علیه آن ممکن است باعث بیماری

خودایمن شود مطرح میشود. در این زمینه مطالعه لی و همکاران در بررسی اثرات جانبی یک مهار کننده تیروزین کینازی EGFR حاکی از ایجاد راشهای پوستی در بعضی از بیماران است [۱۲۹].

اما در بیشتر مطالعاتی که انجام شده و یا در مورد داروهایی که در مراحل آزمایشی هستند تاکنون عارضه جدیای گزارش نشده است. با توجه به اینکه طبق گزارش رابین گراندیس مهار بیان ژن EGFR در سلولهای سرطانی و نه نرمال بسیار مهم است [۱۳۰] پیشنهاد میشود در ایمنیزاسیون فعال که منجر به پاسخهای ایمنی دراز مدت میشود اثرات جانبی نیز به دقت مورد کنترل مستمر قرار گردند. سانچز در مطالعه خود نشان داد که موشهای دریافت کننده قسمت خارج سلولی EGFR موشی تا یک سال بعد از آخرین تزریق تیتری هرچند پایین از IgG داشتد اما در این مدت هیچگونه عرضه جانبی در موشها دیده نشد [۴۸]. در مطالعه حاضر این قسمت مورد ارزیابی دقیق قرار نگرفت اما در حین ایمن کردن موشها بخصوص در گروه پیشگیری هیچ عارضهای دیده نشد.

بررسی اجمالی روند نشان میدهد که در مطالعه اسدی واکسن فاژی نمایش دهنده میموتوپ خاصیت پیشگیری کنندگی نداشته اما دارای خاصیت درمانی بوده است [۲۴]. با افزایش تکرارنمایش میموتوپ از ۱ به ۳ در کار جوانمردی، واکسن فاژی نمایش دهنده تکرار ۳ تایی توانسته بود هم در گروه پیشگیری و هم در گروه درمانی نتایج ضد توموری از خود نشان دهد [۲۵]. نهایتا در این بخش از پروژه پپتید EM-L2 طراحی، تولید و در سطح فاژ نمایش داده شد. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که این واکسن (بخصوص واکسن پپتیدی)، نسبت به واکسنهای قبلی هم در زمینه پیشگیری و هم در زمینه درمانی دارای عملکرد بهتری بوده است. در این میان در گروه پیشگیری واکسن پپتیدی و در گروه درمانی واکسن فاژی نمایش دهنده پپتید EM-L2 عملکرد بهتری از خود نشان دادند.

بدیهی است که چالشهای زیادی در طراحی و رسیدن به یک واکسن سرطانی سر راه است. هر چه بینش و فهم ما از مفاهیم بنیادی مثل نحوه عرضه آنتیژنها و ... بیشتر شود سرعت و اشتیاق ما نیز در این زمینه علمی بیشتر خواهد شد و این اشتیاق بیشک منجر به تولید واکسنهای ضد سرطانی موثرتری خواهد شد. می‌توان گفت که با تحقیق بیشتر در زمینه افزایش کارایی این نوع واکسن می‌توان امیدوار بود که در آینده بتوان از واکسن‌های پپتیدی و واکسنهای فاژی در کلینیک جهت مبارزه با بیماریهای مختلف از جمله سرطان استفاده گردد.

۵-۲) نتیجه گیری

در نهایت با توجه به اینکه پپتید نوترکیب EM-L2 توانسته است اثرات درمانیای را در موشهای توموری شده نشان دهد میتوان چنین نتیجه گرفت که این پپتید میتواند کاندید مناسبی برای تهیه واکسن در سرطانهای EGFR مثبت باشد. اثرات این پپتید در ادجوانت فروند به تنهایی نسبتا از فاژ نمایش دهنده آن بهتر بوده است بنابراین، هرچند میتوان اذعان داشت که پپتید بزرگ و استفاده از ادجوانت میتواند نیاز به استفاده فاژ را تحتالشعاع قرار دهد اما به هیچ عنوان نمیتوان مزایای فاژ را به عنوان حامل آنتیژن نادیده گرفت.

۵-۳) پیشنهادات

۱ -نمایش پپتید EM-L2 روی فاژ T4 [۹۷].

۲ -بیان پپتید EM-L2 در سلولهای یوکاریوتی و بررسی پپتید بیان شده در مدل حیوانی [۴۸, ۱۰۶].

۳ -نمایش کل قسمت خارج سلولی EGFR بر روی فاژ [۴۸].

۴ -نمایش پپتید EM-L2 در سطح لیپوزوم و تولید یک واکسن لیپوزومی.

۵ -تهیه واکسن سلولی دندرتیکی که با پپتید EM-L2 فعال شده باشد.

۶ -فیوز کردن پپتید EM-L2 با یک پپتید ایمنوژن (مانند سم تتانوس) جهت تحریک بیشتر سیستم ایمنی، و حتی نمایش آن روی فاژ M13.

منابع

1 Anand, P., et al., Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharm Res, 2008. 25(9): p. 2097-116.

.2 Hunter, E.G., M. D'Amico, and C. BCP, Cancer Rehabilitation: Systematic Review.

.3 Pedersen, M., et al., The type III epidermal growth factor receptor mutation biological significance and potential target for anti-cancer therapy. Annals of oncology, 2001. 12(6): p. 745-760.

.4 Rowinsky, E.K., Signal events: cell signal transduction and its inhibition in cancer. The Oncologist, 2003. 8(Supplement 3): p. 5-17.

.5 Ullrich, A., et al., Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. 1984.

.6 Zhen, Y., R.M. Caprioli, and J.V. Staros, Characterization of glycosylation sites of the epidermal growth factor receptor. Biochemistry, 2003. 42(18): p. 5478-5492.

.7 Ogiso, H., et al., Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. Cell, 2002. 110(6 :(p. 775-787.

.8 Abe, T., et al., PTEN decreases in vivo vascularization of experimental gliomas in spite of proangiogenic stimuli. Cancer research, 2003. 63(9): p. 2300-2305.

.9 Burgess, A.W., et al., An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. Molecular cell, 2003. 12(3): p. 541-552.

.10 Ferguson, K.M., et al., EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. Molecular cell, 2003. 11(2): p. 507-517.

.11 Harari, P., Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. Endocrine-related cancer, 2004. 11(4): p. 689-708.

.12 Yarden, Y., The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. European journal of cancer, 2001. 37: p. 3-8.

.13 Schneider, M.R. and E. Wolf, The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. Journal of cellular physiology, 2009. 218(3): p. 460-466.

.14 Jorissen, R.N., et al., Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. Experimental cell research, 2003. 284(1): p. 31-53.

.15 Leof, E.B., Growth factor receptor signalling: location, location, location. Trends in cell biology, 2000. 10(8): p. 343-348.

.16 Normanno, N., et al., Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. Gene, 2006. 366(1): p. 2-16.

.17 Grandis, J.R. and J.C. Sok, Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. Pharmacology & therapeutics, 2004. 102(1): p. 37-46.

.18 Bianco, R ,.et al., Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment. The international journal of biochemistry & cell biology, 2007. 39(7): p. 1416-1431.

.19 Ciardiello, F. and G. Tortora, EGFR antagonists in cancer treatment. New England Journal of Medicine, 2008. 358(11): p. 1160-1174.
.20 Scaltriti, M. and J. Baselga, The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. Clinical Cancer Research, 2006. 12(18): p. 5268-5272.
.21 Rocha-Lima, C.M., et al., EGFR targeting of solid tumors. Cancer Control, 2007. 14(3): p. 295.
.22 Roepstorff, K., et al., Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. Histochemistry and cell biology, 2008. 129(5): p. 563-578.
.23 Navari, M., et al., Epitope mapping of epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody and induction of growth-inhibitory polyclonal antibodies by vaccination with EGFR mimotope. Immunopharmacology and immunotoxicology, 2014. 36(5): p. 309-315.
.24 Asadi-Ghalehni, M ,.et al., Cancer immunotherapy by a recombinant phage vaccine displaying EGFR mimotope: an in vivo study. Immunopharmacology and immunotoxicology, 2015(ahead-of-print): p. 1-6.
.25 Javanmardi, M., et al., Triple tandem mimotope peptide of Epidermal Growth Factor Receptor displaying on the surface of M13 phage induces anti-tumor response in mice tumor model. Iranian Journal of Biotechnology, 2014. 12(3): p. 9-17.
.26 McCarthy, E.F., The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. The Iowa orthopaedic journal, 2006. 26: p. 154.
.27 Borghaei, H., M.R. Smith, and K.S. Campbell, Immunotherapy of cancer. European journal of pharmacology, 2009. 625(1): p. 41-54.
.28 Raez, L.E., S. Fein, and E.R. Podack, Lung cancer immunotherapy .Clinical medicine & research, 2005. 3(4): p. 221-228.
.29 Rožková, D., et al., FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. Clinical immunology, 2009. 131(1): p. 1-10.
.30 Gulley, J.L ,.R.A. Madan, and P.M. Arlen, Enhancing efficacy of therapeutic vaccinations by combination with other modalities. Vaccine, 2007. 25: p. B89-B96.
.31 Schreiber, T.H., et al. Tumor immunogenicity and responsiveness to cancer vaccine therapy: the state of the art. in Seminars in immunology. 2010: Elsevier.
.32 Wei, H., et al., Targeted delivery of tumor antigens to activated dendritic cells via CD11c molecules induces potent antitumor immunity in mice. Clinical Cancer Research, 2009. 15(14): p. 4612-4621.
.33 Cheever, M.A. and C.S. Higano, PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. Clinical cancer research, 2011. 17(11): p. 3520-3526.
.34 Wolff, J.A., et al., Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science, 1990. 247(4949): p. 1465-1468.
.35 Chen, C.-H. and T.-C. Wu, Experimental vaccine strategies for cancer immunotherapy. Journal of biomedical science, 1998. 5(4): p. 231-252.

.36 Donnelly, J.J., J.B. Ulmer, and M.A. Liu, DNA vaccines. Life sciences .1996 , :(3)60p. 163-172.
.37 Fioretti, D., et al., DNA vaccines: developing new strategies against cancer. BioMed Research International, 2010. 2010.
.38 Restifo, N., et al., The promise of nucleic acid vaccines. Gene therapy, 2000. 7(2): p. 89.
.39 Kreiter, S., et al., Tumor vaccination using messenger RNA: prospects of a future therapy. Current opinion in immunology, 2011. 23(3): p. 399-406.
.40 Bringmann, A., et al., RNA vaccines in cancer treatment. BioMed Research International, 2010. 2010.
.41 Harrop, R. and M.W. Carroll, Viral vectors for cancer immunotherapy. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 2005. 11: p. 804-817.
.42 Hewson, R., RNA viruses: emerging vectors for vaccination and gene therapy. Molecular medicine today, 2000 :(1)6 .p. 28-35.
.43 Newswire, P., FDA Approves IMLYGIC™(Talimogene Laherparepvec) As First Oncolytic Viral Therapy In The US.
.44 Bruhn, K.W., N. Craft, and J.F. Miller, Listeria as a vaccine vector. Microbes and Infection, 2007. 9(10): p. 1226-1235.
.45 Singh, R. and Y. Paterson, Listeria monocytogenes as a vector for tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. 2006.
.46 Soliman, H., Developing an effective breast cancer vaccine. Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center, 2010. 17(3 :(p. 183.
.47 Vergati, M., et al., Strategies for cancer vaccine development. BioMed Research International, 2010. 2010.
.48 Ramírez, B.S., et al., Active antimetastatic immunotherapy in Lewis lung carcinoma with self EGFR extracellular domain protein in VSSP adjuvant. International Journal of Cancer, 2006. 119(9): p. 2190-2199.
.49 Troyer, K.L. and D.C. Lee, Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2001 :(1)6 .p. 7-21.
.50 Sharav, T., K.-H. Wiesmüller, and P. Walden, Mimotope vaccines for cancer immunotherapy. Vaccine, 2007. 25(16): p. 3032-3037.
.51 Riemer, A.B. and E. Jensen-Jarolim, Mimotope vaccines: epitope mimics induce anti-cancer antibodies. Immunology letters, 2007. 113(1): p. 1-5.
.52 Herlyn, D. and B. Birebent, Special Section: Future Trendsin Vaccination: Advances in cancer vaccine development. Annals of medicine, 1999. 31(1): p. 66-78.
.53 Copier, J., S. Ward, and A. Dalgleish, Cell based cancer vaccines: regulatory and commercial development. Vaccine, 2007. 25: p. B35-B46.
.54 Uyl-de Groot, C., et al., Immunotherapy with autologous tumor cell-BCG vaccine in patients with colon cancer: a prospective study of medical and economic benefits. Vaccine, 2005. 23(17): p. 2379-2387.

.55 Repmann, R., A.J. Goldschmidt, and A. Richter, Adjuvant therapy of renal cell carcinoma patients with an autologous tumor cell lysate vaccine: a 5-year follow-up analysis. Anticancer research, 2003. 23(2): p. 969-974.

.56 Nemunaitis, J., et al., Phase II study of belagenpumatucel-L, a transforming growth factor beta-2 antisense gene-modified allogeneic tumor cell vaccine in non–small-cell lung cancer. Journal of Clinical Oncology, 2006. 24(29): p. 4721-4730.

.57 Nestle, F.O., A. Farkas, and C. Conrad, Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. Current opinion in immunology, 2005. 17(2): p. 163-169.

.58 Margolin, K., Cytokine therapy in cancer. 2008.

.59 Jones, T., A. Stern, and R. Lin, Potential role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as vaccine adjuvant. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1994. 13(2): p. S47-S53.

.60 Modjtahedi, H., et al., Anti-EGFR monoclonal antibodies which act as EGF, TGFa, HB-EGF and BTC antagonists block the binding of epiregulin to EGFR-expressing tumours. International journal of cancer, 1998. 75: p. 310-316.

.61 Smith, G.P., Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface .Science, 1985. 228(4705): p. 1315-1317.

.62 Smith, G.P. and V.A. Petrenko, Phage display. Chemical reviews, 1997. 97(2): p. 391-410.

.63 Kehoe, J.W. and B.K. Kay, Filamentous phage display in the new millennium. Chemical reviews, 2005. 105(11): p. 4056.4072-

.64 Malys, N., et al., A bipartite bacteriophage T4 SOC and HOC randomized peptide display library: detection and analysis of phage T4 terminase (gp17) and late σ factor (gp55) interaction. Journal of molecular biology, 2002. 319(2): p. 289-304.

.65 Gommans, W.M., H.J. Haisma, and M.G. Rots, Engineering zinc finger protein transcription factors: the therapeutic relevance of switching endogenous gene expression on or off at command. Journal of molecular biology, 2005. 354(3): p. 507-519.

.66 Armstrong, N., et al., Vectors for phage display. 1996, Academic press, Inc, San Diego. p. 35-53.

.67 Specthrie, L., et al., Construction of a microphage variant of filamentous bacteriophage. Journal of molecular biology, 1992. 228(3): p. 720-724.

.68 Marvin, D ,.Filamentous phage structure, infection and assembly. Current opinion in structural biology, 1998. 8(2): p. 150-158.

.69 Endemann, H. and P. Model, Lcoation of filamentous phage minor coat proteins in phage and in infected cells. Journal of molecular biology, 1995. 250(4): p. 496-506.

.70 Rakonjac, J., J.-n. Feng, and P. Model, Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a two-step mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII. Journal of molecular biology, 1999. 289(5): p. 125.1265-3

.71 Goodrich, A.F. and D.A. Steege, Roles of polyadenylation and nucleolytic cleavage in the filamentous phage mRNA processing and decay pathways in Escherichia coli. Rna, 1999. 5(7): p. 972-985.
.72 Felici, F., et al., Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. Journal of molecular biology, 1991. 222(2): p. 301-310.
.73 Weiss, G.A. and S.S. Sidhu, Design and evolution of artificial M13 coat proteins. Journal of molecular biology, 2000. 300(1): p. 213-219.
.74 Cunningham, B.C., et al., Production of an atrial natriuretic peptide variant that is specific for type A receptor. The EMBO Journal, 1994. 13(11): p. 2508.
.75 Russel, M., et al., Low-frequency infection of F-bacteria by transducing particles of filamentous bacteriophages. Journal of bacteriology, 1988. 170(11): p. 5312-5316.
.76 Deng, L.-W., P. Malik, and R.N. Perham, Interaction of the Globular Domains of pIII Protein of Filamentous Bacteriophage fd with the F-Pilus ofEscherichia coli. Virology, 1999. 253(2): p. 271-277.
.77 Riechmann, L. and P. Holliger, The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of E. coli. Cell, 1997. 90(2): p. 351-360.
.78 Marciano, D.K., M. Russel, and S.M. Simon, Assembling filamentous phage occlude pIV channels. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. 98(16): p. 9359-9364.
.79 Lopez, J. and R.E. Webster, Assembly site of bacteriophage f1 corresponds to adhesion zones between the inner and outer membranes of the host cell. Journal of bacteriology, 1985. 163(3): p. 1270-1274.
.80 Rakonjac, J. and P. Model, Roles of pIII in filamentous phage assembly. Journal of molecular biology, 1998. 282(1): p. 25-41.
.81 Vieira, J. and J. Messing, Production of single-stranded plasmid DNA. Methods in enzymology, 1987. 153: p. 3-11.
.82 Azzazy, H.M. and W.E. Highsmith, Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Clinical biochemistry, 2002. 35(6): p. 425-445.
.83 Hoogenboom, H.R., et al., Antibody phage display technology and its applications. Immunotechnology, 1998. 4(1): p. 1-20.
.84 Harmsen, M. and H. De Haard, Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Applied microbiology and biotechnology, 2007. 77(1): p. 13-22.
.85 Smith, J., et al., Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis. The FASEB journal, 2005. 19(3): p. 331-341.
.86 Ahmadvand, D., et al., Production and characterization of a high-affinity nanobody against human endoglin. Hybridoma, 2008. 27(5): p. 353-360.
.87 Horak, E., et al., Isolation of scFvs to in vitro produced extracellular domains of EGFR family members. Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals, 2005. 20(6): p. 603-613.

.88 Fernandez-Gacio, A., M. Uguen, and J. Fastrez, Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. Trends in biotechnology, 2003. 21(9): p. 408-414.
.89 Willats, W.G., Phage display: practicalities and prospects. Plant molecular biology, 2002. 50(6): p. 83.854-7
.90 Friedman, M., et al., Directed evolution to low nanomolar affinity of a tumor-targeting epidermal growth factor receptor-binding affibody molecule. Journal of molecular biology, 2008. 376(5): p. 1388-1402.
.91 Li, Y., et al., Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display. Nature biotechnology, 2005. 23(3): p. 349-354.
.92 Ladner, R.C., et al., Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. Drug discovery today, 2004. 9(12): p.529-525 .
.93 Hetian, L., et al., A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor. Journal of Biological Chemistry, 2002 :(45)277 .p. 43137-43142.
.94 Karasseva, N.G., et al., Identification and characterization of peptides that bind human ErbB-2 selected from a bacteriophage display library. Journal of protein chemistry, 2002. 21(4): p. 287-296.
.95 Rowley, M.J., K. O'Connor, and L. Wijeyewickrema, Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor–ligand interactions. Biotechnology annual review, 2004. 10: p. 151-188.
.96 Lidqvist, M., et al., Phage display for site-specific immunization and characterization of high-risk human papillomavirus specific E7 monoclonal antibodies. Journal of immunological methods, 2008. 337(2): p. 88-96.
.97 Ren, S., et al., Inhibition of tumor angiogenesis in lung cancer by T4 phage surface displaying mVEGFR2 vaccine. Vaccine, 2011. 29(34): p. 5802-5811.
.98 Hashiguchi, S., et al., Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling. Biochemical and biophysical research communications, 2010. 402(1): p. 19-22.
.99 Tsung, K. and J.A. Norton, Lessons from Coley's toxin. Surgical oncology, 2006. 15(1): p. 25-28.
.100 Dhodapkar, K.M., et al., Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. The Journal of experimental medicine, 2002. 195(1): p. 125-133.
.101 Kreitman, R.J., Immunotoxins for targeted cancer therapy. The AAPS journal, 2006. 8(3): p. E532-E551.
.102 Lode, H.N. and R.A. Reisfeld, Targeted cytokines for cancer immunotherapy . Immunologic research, 2000. 21(2-3): p. 279-288.
.103 Jonker, D.J., et al., Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. New England Journal of Medicine, 2007. 357(20): p. 2040-2048.
.104 Seiden, M., et al., A phase II trial of EMD72000 (matuzumab ,(a humanized anti-EGFR monoclonal antibody, in patients with platinum-resistant ovarian and

primary peritoneal malignancies. Gynecologic oncology, 2007. 104(3): p. 727-731.

.105 Dassonville, O., et al., EGFR targeting therapies: monoclonal antibodies versus tyrosine kinase inhibitors: similarities and differences. Critical reviews in oncology/hematology, 2007. 62(1): p. 53-61.

.106 Ramírez, B.S., et al., Anti-EGFR activation, anti-proliferative and pro-apoptotic effects of polyclonal antibodies induced by EGFR-based cancer vaccine. Vaccine, 2008. 26(38): p. 4918-4926.

.107 Hakomori, S.-i., Tumor-associated carbohydrate antigens. Annual review of immunology, 1984. 2(1): p. 103-126.

.108 Riemer, A.B., et al., Vaccination With Cetuximab Mimotopes and Biological Properties of Induced Anti–Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies. Journal of the National Cancer Institute, 2005. 97(22): p. 1663-1670.

.109 Li, W., et al., Mimotope vaccination for epitope-specific induction of anti-VEGF antibodies. BMC biotechnology, 2013. 13(1): p. 77.

.110 Voigt, M., et al., Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab. Neoplasia, 2012. 14(11): p. 1023-IN3.

.111 Manoutcharian, K., et al., Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against Taenia solium pig cysticercosis. Veterinary immunology and immunopathology, 2004. 99(1): p. 11-24.

.112 Van Houten, N., et al., Filamentous phage as an immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide. Vaccine, 2006. 24(19): p. 4188-4200.

.113 Russel, M., H.B. Lowman, and T. Clackson, Introduction to phage biology and phage display. Phage Display: A practical approach, 2004: p. 1-26.

.114 Ren, S.-x., et al., Antitumor activity of endogenous mFlt4 displayed on a T4 phage nanoparticle surface. Acta Pharmacologica Sinica, 2009. 30(5): p. 637-645.

.115 Petrenko, V., Evolution of phage display: from bioactive peptides to bioselective nanomaterials. 2008.

.116 Ducheyne, P., et al., Comprehensive Biomaterials: Online Version. Vol. 1. 2011: Newnes.

.117 Lai, M.-D., et al., The effects of DNA formulation and administration route on cancer therapeutic efficacy with xenogenic EGFR DNA vaccine in a lung cancer animal model. Genet Vaccines Ther :(2)7 .2009 ,p. 1-13.

.118 Duś, D., W. Budzyński, and C. Radzikowski, LL2 cell line derived from transplantable murine Lewis lung carcinomamaintenance in vitro and growth characteristics. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis, 1984. 33(6): p.823-817 .

.119 Lu, Y., et al., Immunogene therapy of tumors with vaccine based on xenogeneic epidermal growth factor receptor. The Journal of Immunology, 2003. 170(6): p. 3162-3170.

120. قائم مقامی , بررسی اثر ضد تومووری ایمن سازی با استفاده از ذرات نانوفاژی نمایش دهنده میموتوپ EGFR بر روی pVIII در مدل حیوانی. تربیت مدرس, 1390.

.121 Wan, Y., et al., Induction of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes response in vivo by filamentous phage display vaccine. Vaccine, 2001. 19(20): p. 2918-2923.
.122 Coutinho, A., et al., Regulatory T cells: the physiology of autoreactivity in dominant tolerance and "quality control" of immune responses. Immunological reviews, 2001. 182(1): p. 89-98.
.123 Yip, Y.L., G. Smith, and R.L. Ward, Comparison of phage pIII, pVIII and GST as carrier proteins for peptide immunisation in Balb/c mice. Immunology letters, 2001. 79(3): p. 197-202.
.124 Hobohm, U., J.L. Stanford, and J.M. Grange, Pathogen-associated molecular pattern in cancer immunotherapy. Critical Reviews™ in Immunology, 2008. 28(2.(
.125 Davis, I.D., An overview of cancer immunotherapy. Immunology and cell biology, 2000. 78(3): p. 179-195.
.126 Liu, D., et al., Immunotherapy of EGFR-positive tumor based on recombinant EGFR phage vaccine. The Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2006. 5(3): p. 189-193.
.127 Jacobson, T., Development and evaluation of a phage-display based vaccine against prostate cancer. Stockholm, Sweden: Royal Institute of Technology, 2007.
.128 Fang, J., et al., The potential of phage display virions expressing malignant tumor specific antigen MAGE-A1 epitope in murine model. Vaccine, 2005. 23(40): p. 4860-4866.
.129 Lee, M.-W., et al., Cutaneous Side Effects in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Iressa (ZD 1839), an Inhibitor of Epidermal Growth Factor. Acta dermato-venereologica, 2003. 84(1): p. 23-26.
.130 Grandis, J.R., et al., Inhibition of epidermal growth factor receptor gene expression and function decreases proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. Oncogene, 1997. 15(4): p. 409-416.

تاییدیه استاد راهنما مبنی بر آمادگی دانشجو برای دفاع از پایان نامه

مدیر محترم گروه بیوتکنولوژی پزشکی

به اطلاع میرساند پایان نامه آقای مجید اسدی قلعهنی دانشجوی مقطع دکترای تخصصی PhD در رشته بیوتکنولوژی پزشکی که با عنوان: طراحی و ساخت نانو سازههای شبه فاژی نمایش دهنده پپتیدهای کاهش دهنده رشد تومورهای EGFR و بررسی اثرات درمانی آن در شرایط In Vivo

و به راهنمایی اینجاب تهیه گردیده است قابل ارائه در جلسه دفاع میباشد.

تاریخ و جلسه پیشنهادی برای دفاع از پایان نامه:

امضای استاد راهنما

صورت‌جلسه دفاع از پایان‌نامه مقطع دکترای تخصصی PhD

جلسه دفاعیه پایان‌نامه آقای: مجید اسدی قلعهنی در رشته: بیوتکنولوژی پزشکی

تحت عنوان : **طراحی و ساخت نانو سازههای شبه فاژی نمایش دهنده پپتیدهای کاهش دهنده رشد تومورهای EGFR و بررسی اثرات درمانی آن در شرایط In Vivo**

که به راهنمایی استاد محترم آقای دکتر صدرالدینی تهیه شده است، در تاریخ ...تشکیل گردید.

این پایان‌نامه باتوجه به ضوابط تعیین شده توسط شورای تحصیلات تکمیلی دانشکده فنآوریهای نوین پزشکی، ارزیابی و با نمره ..... و با درجه

☐عالی ☐بسیار خوب ☐خوب ☐قابلقبول

مورد تأیید هیأت محترم داوران قرار گرفت.

هیأت داوران	نا م خانوادگی	امضا
۱-استاد راهنما	۱-نمونه: آقای دکتر نام نام خانوادگی	
	۲-	
	۳-	
۲-استاد مشاور	۱-	
۳-داوران	۱- مدیر گروه :	
	۲- خارج از دانشگاه :	
	۳- خارج از دانشگاه :	
	۴- از گروه :	
استاد ناظر		

معاون آموزشی دانشکده **معاون پژوهشی دانشکده**

نام و امضاء **نام و امضاء**

Declaration

Hereby I eclarate that the present thesis is my own work based on my reaserch in the department of medical biotechnology at the school of advanced technologies in medical science , Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

I also eclaret that no part of this thesis has been submitted in this form any where els. Information delivered from the published work of other has been acknowledged in the text and a list references is given.

All the rights of this thesis is reserved for Tehran University of Medical Sciences. Criticism by mentioning the source is allowded.

Majid Asadi-Ghalehni

Abstract

Epidermal growth factor receptor (EGFR) has been shown to play a critical role in tumor cell growth, and its over expression in a significant percentage of human tumors has been observed. Up to now numerous methods in cancer therapy have been developed using EGFR as the primary target. In the field of cancer vaccine, one strategy would be active immunotherapy against the receptor in order to control its over activity. On the other hand, since phage particles are highly immunogenic; within cancer research have been widely used for the vaccination against tumors. It can be used as a delivery vehicle to efficiently administrate the antigen to the immune system. Additionally it is shown that peptide displayed on the surface of phage particles can strongly induce immune response in immunized mice. In this study a novel fusion recombinant peptide base vaccine consisting of L2 domain of murine ECD-EGFR and EGFR mimotope (EM-L2) was constructed and its prophylactic and therapeutic effects either as a peptide vaccine or as a phage base vaccine were evaluated. For this purpose C57BL/6 EGFR positive tumor model mice was created using LL/2 cell line. Recombinant M13 phage particles displaying EM-L2 and the EM-L2 peptide were produced. In therapeutic group of study tumor models were first established and then the mice were immunized using the vaccines, while in the prophylactic group of study mice were first immunized and then were challenged with tumor cells. In both groups of study β2microglobolin displaying phage and PBS were used to immunize control groups of mice. In prophylactic group the significant difference in tumor growth rate observed between the peptide and phage vaccine groups with the PBS group. There was significant difference in tumor growth rate between the peptide vaccine and control phage too. In therapeutic group significant difference in tumor growth rate was observed between the peptide and phage vaccine groups with the control groups. It can be concluded that the EM-L2 peptide may has antitumor activity and immunization with such peptide can trigger an effective immune response against tumor in EGFR positive tumor mice model and these data may be helpful for further cancer immunotherapy research.

Key words: Cancer, EGFR, peptide vaccine, phage vaccine, immunotherapy

Teheran University of Medical Sciences

School of Advanced Technologies in Medical Science

Title:

Construction of nanophage particles displaying EGFR mimotope along with L2 domain of ECD-EGFR and its evaluation in mice model

"A dissertation submitted as partial fulfillment of the requirements for Doctor of Philosophy (PhD) Degree''

By

Majid Asadi-Ghalehni

Supervisor (s)

Dr. Esmaeil Sadroddiny

Prof. Mohammad Javad Rasaee

Year: 2015

Registration number: …