

ساخت گیرنده کایمیریک لنفوسیت T دارای کمک محرك OX40 علیه سلول‌های سرطان سینه

نویسندگان: سپیده خالقی^۱، فاطمه رهبری زاده^{۲*}، کیهان آزاد منش^۳، محمد
جواد رسایی^۴، فرنوش جعفری^۵

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت
مدرس - تهران، ایران

۲. استاد راهنما - گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس - تهران

۳. همکار - گروه ایدز و هپاتیت، انسیتو پاستور ایران، تهران

۴. استاد مشاور - گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس - تهران

۵. دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس - تهران

Email: rahbarif@modares.ac.ir

* نویسنده مسئول: فاطمه رهبری زاده

چکیده

مقدمه و هدف: گیرنده‌های کایمیریک سلول‌های T روش خوبی برای ایمونوتراپی سرطان فراهم کرده است. در این گیرنده بجای قطعه متغیر گیرنده سلول T از نانوبادی استفاده شده است. نانوبادی یا VHH کوچکترین قطعه آنتی‌بادی زنجیره سنگین شتری است که قابلیت اتصال به آنتی‌ژن دارد و نیز همولوژی بسیاری با VH انسانی داشته، از قدرت ایمنی زایی اندکی بهره‌مند است. سازه رسپتور کایمیریکی که در آزمایشگاه ما ساخته شده دارای CD3 ζ -VHH-hing-CD28-CD3 ζ است. اگرچه گیرنده‌های کایمیریکی که از طریق CD3 ζ فعال می‌شوند اینترفرون گاما آزاد می‌کنند، اما به علت نبود سیگنال‌های کمک تحریکی نمی‌توانند به طور کامل فعال شوند. لذا وجود CD28 باعث رها سازی اینترلوکین ۲ شده و تکثیر تومور را محدود می‌کند؛ اما باعث فعال شدن کامل T سل نمی‌شود. به منظور بهبود عملکرد گیرنده‌های کایمیریک، اندو دامین‌های سه بخشی ساخته شده است که شامل CD28-OX40-CD3 ζ است. به دنبال تحریک سلول‌های T کمک محرك OX40 سیگنال‌های قوی فعال سازی و طولانی مدت برای این سلول‌ها ایجاد می‌کند که برای حفظ پاسخ ایمنی بسیار مهم است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق پرایمرهای همپوشان که ۶۰٪ از توالی OX40 را در برداشت سنتز و قطعه CD28-Ox40-CD3 ζ با روش SOE PCR ایجاد شد و سپس این توالی با قطعه CD28-CD3 ζ در سازه CD3 ζ -VHH-hing-CD28-CD3 ζ جایگزین شد. بعد از انتقال این سازه به درون سلول‌های T (Jurkat) بیان گیرنده در سطح mRNA و عملکرد آن با روش‌های semi-quantitative RT PCR و کیت الیزا سنجش IL-2 ارزیابی شد.

نتایج و نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از آن است که عملکرد و بیان سازه دارای OX40 بیشتر شده است. با توجه به نتایج ارزیابی IL-2 و semi-quantitative RT PCR می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که میزان بیان سازه‌های pCDNA-1 hinge CAR-OX40 و pCDNA-2 hinge CAR-OX40 برابرند اما عملکرد سازه pCDNA-2 hinge CAR-OX40 بیشتر است.

واژگان کلیدی: گیرنده سلول T کایمیریک، نانوبادی، OX40، T لنفوسیت.

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال نوزدهم - شماره ۹۵
آبان ۱۳۹۰

وصول: ۱۳۹۰/۳/۲۷

آخرین اصلاحات: ۱۳۹۰/۷/۱۲

پذیرش: ۱۳۹۰/۷/۲۵

مقدمه

سرطان یکی از تهدیدهای مهم سلامتی در جهان است. روش‌هایی مختلف و متنوع برای درمان سرطان ارائه و به کار می‌رود، در بین این روش‌ها ایمنی/تراپی از عوارض جانبی کمتری بهره‌مند بوده، جزو روش‌های انتخابی محسوب می‌شوند. هدف ایمنی‌تراپی تومور، تقویت پاسخ‌های ایمنی میزبان در مقابل تومور (ایمنی فعال) و یا تزریق آنتی‌بادی‌ها یا سلول‌های T مختص تومور (ایمنی غیرفعال) است (۱). در بین روش‌های متنوع ایمنی‌تراپی، به نظر می‌رسد که T سل تراپی سرطان یکی از کارآمدترین روش‌ها باشد.

T سل تراپی سه روش عمده دارد که از مهم‌ترین‌های آن رسپتورهای کایمیریک است (۲-۳).

رسپتورهای کایمیریک از سه جزء اصلی تشکیل شده‌اند:

۱- قطعه سیگنال‌دهنده

این قطعه با اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی موجب تحریک واکنش‌های سلولی می‌شود. در مطالعات، اغلب از رشته CD3 ζ یا زنجیره γ از گیرنده FC استفاده شده‌است. برای عملکرد بهینه و ایجاد سیگنال دوم مولکول CD28 به قطعات فوق متصل شده‌است. تحریک کمکی با CD134(OX40) نشان داده‌است که تکثیر و تولید سایتوکاین و ایمنی توموری را افزایش می‌دهد و تکامل سلول‌های T خاطره‌ای را بیشتر می‌کند (۴-۶).

OX40 سیگنالی طولانی‌مدت و قوی برای فعالیت سلول‌های T فراهم می‌کند که برای حفظ پاسخ ایمنی حیاتی است و بدین ترتیب، دامن سیتوپلاسمی سه قسمتی CD28-OX40-CD3 ζ دارای فعالیت کامل بوده، تکثیر و سیگنال‌های حیاتی برای فعالیت ضد توموری را فراهم خواهد کرد (۱، ۷-۸).

۲- بازوی خارج سلولی فضا‌ساز

این قسمت، اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی را تسهیل می‌کند. اغلب از نواحی CH2، CH3 و ناحیه لولا از

مولکول IgG1 یا CD8 آلفا استفاده می‌شود. در این تحقیق از دو نوع بازوی خارج سلولی فضا‌ساز استفاده شده‌است که تفاوت آنها در تعداد نواحی لولا می‌باشد. یکی از بازوهای فضا‌ساز یک تکرار از منطقه لولا و دیگری دو تکرار را شامل می‌شود.

۳- مولکول متصل شونده به آنتی‌ژن (Antibody) برای این منظور از قسمت‌های متغیر آنتی‌بادی که وظیفه شناسایی آنتی‌ژن بر عهده آنهاست استفاده می‌شود. در این تحقیق از قسمت متغیر آنتی‌بادی شتری (VHH) استفاده شده‌است (۹-۱۰). با توجه به اینکه سازه کایمیریک نسل دوم CD3 ζ -CD28-hing-VHH (pcCAR) در این گروه را بیشتر، آقایی بختیاری و همکاران انجام داده‌بودند (۱۱)، در این تحقیق با ساخت سازه اندودومینی چندبخشی برای بهبود و پایداری پاسخ سلول‌های T در مواجهه با سلول‌های سرطان سینه کوشیده‌ایم؛ برای دستیابی بدین هدف برآنیم تا با استفاده از روش SOE PCR و اولیگونوکلوئوتیدهای همپوشان، قطعه کمک محرک OX40 تکثیر و به همراه قطعات CD28 و CD3 ζ ، به صورت یک قطعه پیوسته جایگزین قطعه CD28-CD3 ζ و بدرون سلول‌های T (Jurkat) وارد شود؛ سپس بیان گیرنده در سطح mRNA با روش semi quantitative RT PCR و عملکرد آن با کیت سنجش IL-2 بررسی و با سازه فاقد قطعه کمک محرک OX40 مقایسه شود؛ بنابراین فرض می‌کنیم با تقویت سیگنالینگ گیرنده و استفاده از نانوبادی ضد MUC1 بتوانیم گیرنده‌ای کارآمد و کاراتر را بسازیم تا بتوانیم روش بهتری برای درمان سرطان به ارمغان بیاوریم.

مواد و روش‌ها:

طراحی پرایمر SOE-PCR:

این پرایمرها شامل بخش پرایمر معکوس قطعه CD28 به علاوه ۹۷ باز آلی اضافی شامل توالی OX40 و قسمت هم‌پوشان است و نیز پرایمر مستقیم قطعه CD3 ζ به علاوه

با آنزیم‌های Xho1 و Xba1 هضم‌شود. قطعه ورودی نیز توسط ایندو آنزیم هضم‌شوند سپس با آنزیم T4 DNA Ligase فرایند درج انجام‌شد.

تایید درج

محصول حاصل از درج با روش الکتروپوریشن به درون میزبان اشرشیا کولی TG1 ترانسفورم شد و کلون‌های مثبت طی فرایند PCR colony مشخص شدند. Colony PCR با پرایمرهای P2 و P3 انجام‌شد و وکتور اولیه فاقد OX40 به‌عنوان کنترل در کنار کلون‌ها با پرایمرهای P2 و P3 تکثیر شد. محصول PCR کلون‌های مثبت حدود ۱۲۷ جفت باز سنگین‌تر از کلون‌های منفی است و برای تایید ثانویه کلون‌های مثبت بعد از تخلیص پلاسمید با آنزیم محدود کننده Pst1 هضم شد. از کلون‌های مثبت قطعه ۵۲۷ جفت بازی و از کلون‌های منفی قطعه ۴۰۰ جفت بازی خارج شد و برای تایید نهایی کلون‌های مثبت، توالی یابی شدند.

انتقال سازه دارای OX40 به سلول‌های T (Jurkat)
به‌منظور انتقال سازه‌ها از محلول لیپوفکتامین و طبق پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده‌شد.

۱-۶- مراحل ترانسفکشن توسط Lipofectamine 2000
۱- یک روز قبل از ترانسفکشن محیط کشت آنتی بیوتیک دار سلول‌ها با محیط بدون آنتی‌بیوتیک با FCS ۱۰٪ تعویض شد چون در حین ترانسفکشن سلول‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها تراواترند و این سبب سمیت سلولی آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود، میزان FCS هم باید کم باشد. ۲ مایکرولیتر از لیپوفکتامین 2000 با ۵۰ مایکرولیتر محیط کشت RPMI-1640 ناقص مخلوط شد. ۰/۸ مایکرولیتر از هریک از سازه‌های تعیین توالی شده با ۵۰ مایکرولیتر محیط کشت RPMI-1640 ناقص مخلوط و به آرامی، محیط کشت را تکان می‌دهیم.

در مرحله بعد هر دو به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌شود؛ سپس، این دو را با هم مخلوط کرده، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌کنیم. محیط‌های سلول‌ها عوض شده، محیط تازه RPMI-1640 حاوی

۴۷ باز آلی اضافه شامل توالی باقی‌مانده OX40 و قسمت هم‌پوشان می‌باشد.

For CD28+OX40:

5'CCTGCTCCTCTTGGATGGGGGTCCGGAAA
CTGCCTCCCCAGGGGGCTTGTGGGCATCGGG
GGGCAGCCTCTGGTCCCTCCGGAGCAGGTACA
GGGCGGAGCGATAGGCTGCGAAGTC 3'

Rev CD3 ζ +OX40:

5'CCATCCAAGAGGAGCAGGCCGACGCCAC
TCCACCCTGGCCAAGATCAGAGTGAAGTTCAG
CAGGAGC 3'

این دو پرایمر در انتهای 3' به تعداد ۱۸ جفت باز هم پوشان هستند. این دو پرایمر در SOE-PCR استفاده‌شد.

تکثیر دو نیمه ژن OX40:

در مرحله اول قطعه CD28 با پرایمرهای P3 و P4 طی فرایند PCR از روی سازه pcDNA3.1/Hygro-VHH- hinge-CD28-CD3 ζ (pcCAR) تکثیر شد سپس قطعه CD3 ζ با پرایمرهای P1 و P2 طی فرایند PCR از روی سازه نامبرده تکثیر شد. توالی پرایمرها عبارت‌اند از:

P1: 5'- AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGC - 3'

P2: 5'- TGCTCTAGATGGCTGTTAGCGAGG - 3'

P3: 5' -

CCGCTCGAGTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTT

G - 3'

P4: 5'- GGAGCGATAGGCTGCGAAGTC - 3'

پرایمرهای For-OX40 و P3 روی قطعه CD28 طی فرایند PCR قطعه CD28+OX40 و پرایمرهای Rev+OX40 و P2 روی قطعه CD3 ζ طی فرایند PCR قطعه CD3 ζ +OX40 را سنتز می‌کند. قطعه CD28+OX40 حدود ۳۰۷ جفت باز و قطعه CD3 ζ +OX40 حدود ۳۹۲ جفت باز است.

SOE-PCR:

قطعات CD28+OX40 و CD3 ζ +OX40 را به‌علاوه مواد لازم اولیه جهت تکثیر DNA در دمای اتصال مناسب انکوبه کرده و بعد از آن پرایمرهای P2 و P3 به همراه Taq DNA polymerase و بافراضافه شد. محصول این PCR، قطعه CD28-OX40-CD3 ζ (۶۹۰ جفت باز) است.

درج قطعه CD28-OX40-CD3 ζ در وکتور (pcCAR):

جایگاه‌های برش اطراف CD28-CD3 ζ در وکتور pcCAR عبارت‌اند از Xho1 و Xba1. آنزیم Xba1+ dam است که باید وکتور در میزبان dam- تکثیر شود و سپس

5'- CTGTCAGGAAAGGAGAAATC - 3' BA
Reverse(20 nt)

ارزیابی تحریک و تولید IL-2 به واسطه رسیپتورهای کایمیریک

تعداد 7×10^3 سلول A431 و T47D و MCF7 (به‌عنوان سلول‌های MUC1+) و NIH3T3 (به‌عنوان MUC1-) در پلیت ۹۶ خانه به‌صورت دوپلیکیت برده شد؛ سپس سلول‌های ترانسفکت شده با سازه‌های pcCARs به‌صورت دوپلیکیت روی سلول‌های هدف که MUC1+ و MUC1- بودند برده شد. قبل از مجاورت سلول‌های Jurkat با سلول‌های سرطانی، تحریک اولیه برای فعال شدن سلول‌های T توسط آنتی‌ژن‌های MUC1 تخلیص شده، انجام شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محلول رویی این سلول‌ها جمع‌آوری شد و به هر چاهک الایزا میزان ۵۰ μl اضافه شد سپس با کیت الایزا شرکت R&D میزان IL-2 تولیدشده طبق پروتکل شرکت R&D اندازه‌گیری شد.

نتایج

ساخت سازه با روش SOE-PCR

با استفاده از روش PCR قطعات CD28 و CD3 ζ سنتز شدند و با استفاده از پرایمرهای SOE قطعات CD28+OX40 و CD3 ζ +OX40 تکثیر شدند (شکل ۱-۱ و ۲). با روش SOE PCR قطعه CD28-OX40-CD3 ζ سنتز شد (شکل ۱-۳). قطعه مذکور در وکتور pcCAR جایگزین شد. کلون‌های مثبت با colony PCR و هضم آنزیمی و توالی‌یابی تأیید شد.

FCS ۱درصد به آن اضافه شد. کمپلکس نهایی را قطره قطره در نقاط مختلف هر چاهک ریخته، پلیت چند بار عقب و جلو می‌شود. بعد از انجام ترانسفکشن باید ۴ تا ۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با ۵ درصد CO2 انکوبه شود.

انتخاب سلول‌های ترانسفکت شده با آنتی بیوتیک‌هایگرومایسین

پس از گذشت ۲۴ ساعت از انتقال سازه به سلول‌ها، از هر چاهک پلیت حاوی سلول‌های Jurkat، 3×10^3 سلول در ۳ چاهک پلیت ۹۶ خانه برای انتخاب توسط آنتی‌بیوتیک ریخته شد. درباره سلول‌های Jurkat غلظت $800 \mu\text{g/ml}$ از آنتی‌بیوتیک‌هایگرومایسین به مدت دو هفته اعمال شد، پس از گذشت این مدت سلول‌های ترانسفکت شده باقی می‌مانند.

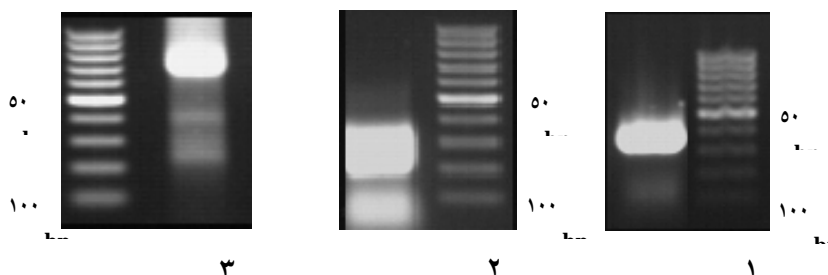
بررسی بیان سازه در سلول‌های T

به‌منظور بررسی بیان ژن، واکنش semi-quantitative RT PCR روی سلول‌های بدون تیمار آنتی بیوتیکی صورت گرفت. تعداد 5×10^5 از سلول‌های ترانسفکت شده و نیز 5×10^5 سلول Jurkat به‌عنوان کنترل جداسازی شد و به‌منظور خارج کردن کامل محیط کشت، با محلول PBS استریل شسته شد. تخلیص RNA با استفاده از کیت MN صورت گرفت و ساخت cDNA با استفاده از کیت Fermentase انجام شد. ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

Semi-quantitative RT PCR با پرایمرهای P2 و P3

انجام شد و پرایمرهای ژن بتا اکتین عبارت‌اند از:

5'- AGTAGGCTTTGTGGTTGATG - 3' BA
Forward(20 nt)

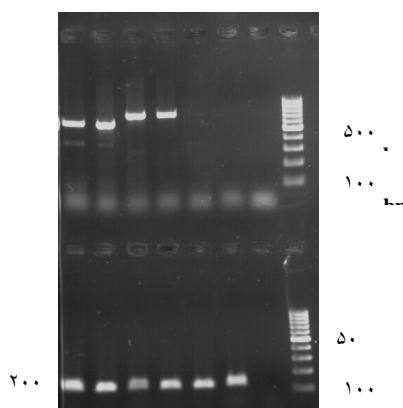


شکل ۱: در ستون (۱) تصویر قطعه CD28+OX40 (۳۰۷ جفت باز). ستون (۲) تصویر قطعه CD3 ζ +OX40 (۳۹۲ جفت باز). ستون (۳) تصویر قطعه CD28-OX40-CD3 ζ (۶۹۰ جفت باز) حاصل از SOE-PCR.

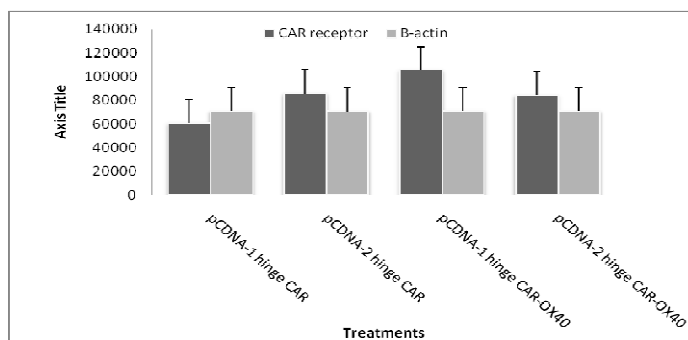
با quantitative RT PCR ناحیه CD28-OX40-CD3 پرایمرهای P1 و P3 و تکثیر و میزان بیان با نرم افزار UVitec اندازه گیری شد که نتایج میزان بیان در نمودار ۱ گزارش شده است.

انتقال سازه به سلول های Jurkat و ارزیابی بیان در سطح RNA:

بعد از انتقال سازه نهایی به سلول های T (Jurkat)، بیان سازه با تخلیص RNA و تکثیر cDNA گیرنده کایمیریک تأیید شد (شکل ۲). در فرایند semi



شکل ۲. نتایج حاصل از semi-quantitative RT PCR. ستون ۱: گیرنده کایمیریک یک لولا و فاقد قطعه OX40 (pCDNA-1 hinge CAR). ستون ۲: گیرنده کایمیریک دو لولا و فاقد قطعه OX40 (pCDNA-2 hinge CAR). ستون ۳: گیرنده کایمیریک یک لولا دارای قطعه OX40 (pCDNA-1 hinge CAR-OX40). ستون ۴: گیرنده کایمیریک دو لولا دارای قطعه OX40 (pCDNA-2 hinge CAR-OX40). ستون ۵: وکتور pCDNA3.1 (hinge CAR-OX40). ستون ۶: نمونه کنترل منفی (سلول بدون پلاسمید). و ردیف پایین عیناً همین نمونه هاست ولی با پرایمرهای β -actin.



نمودار ۱. میزان بیان سازه های این تحقیق (ستون های مشکی) در قیاس با بیان ژن داخلی B-actin (ستون های خاکستری). در سلول های Jurkat بعد از ترانسفکشن.

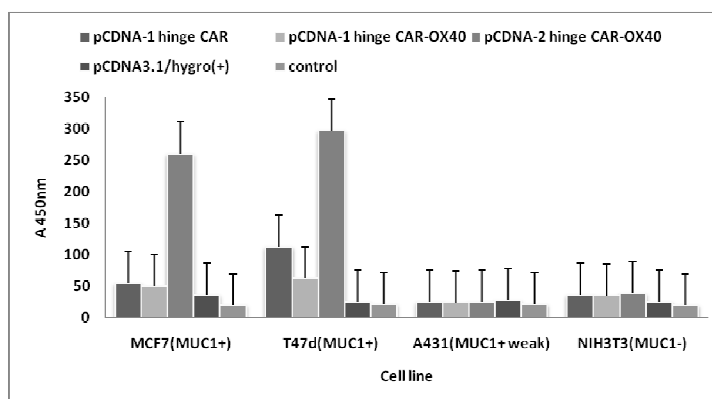
نشان می دهد که گیرنده های کایمیریک تولید شده عملکرد داشتند و در نتیجه، میانکنش با آنتی ژن های سطحی MUC1، تحریک شده اند. در این پروژه نتایج نشان می دهد که سازه pcCAR حاوی قطعه کمک محرک OX40، بیشتر تحریک شده و میزان IL-2 بیشتری تولید کرده، در نتیجه عملکرد بهتری دارد که احتمالاً به دلیل وجود قطعه OX40 است که سیگنال قوی تر و پایدارتری ایجاد می کند. نتایج غلظت IL-2 توسط کیت الیزا در زیر آورده شده است (شکل ۳ و نمودار ۲).

نتیجه بررسی تحریک و تولید IL-2 به واسطه رسپتورهای کایمیریک

میزان IL-2 تولید شده توسط سلول های Jurkat ترانسفکت شده با وکتور کنترل pCDNA3.1/HYGRO(+) تقریباً معادل سلول کنترل فاقد پلاسمید بود که در مقایسه با انواع دارای سازه pcCAR، میزان تولید IL-2 بسیار کم و ناچیز بود. مقایسه نتایج سلول های NIH3T3 که MUC1 هستند با سایر سلول ها که MUC1+

جدول ۱. میزان تولید IL-2 در دو رده سلولی MUC1+ (MCF7, A431) و یک رده سلولی با بیان بسیار ضعیف MUC1 (T47D) و یک رده سلولی MUC1- (NIH3T3).

سلول	نوع تیمار	میانگین OD	غلظت IL-2 (pg/ml)
	pCDNA-2 hinge CAR	۰/۲۳۲	۵۵/۱۳
	pCDNA-1 hinge CAR-OX40	۰/۲۱۳	۵۰/۶۱
MCF7	pCDNA-2 hinge CAR-OX40	۰/۵۰۹	۲۶۰/۴۹
	pCDNA3.1/HYGRO(+)	۰/۰۷۰۵	۳۶/۰۶
	Control	۰/۰۶۲	۲۰/۵۰
	pCDNA-2 hinge CAR	۰/۰۴۸	۲۴/۵۵
	pCDNA-1 hinge CAR-OX40	۰/۰۴۶	۲۳/۵۲
A431	pCDNA-2 hinge CAR-OX40	۰/۰۸۸	۲۵
	pCDNA3.1/HYGRO(+)	۰/۰۹۹	۲۸/۱۲۵
	Control	۰/۰۶۴	۲۱
	pCDNA-2 hinge CAR	۰/۳	۱۱۲/۹۵
T47D	pCDNA-1 hinge CAR-OX40	۰/۲۶۱	۶۲/۰۲
	pCDNA-2 hinge CAR-OX40	۰/۵۸۲	۲۹۷/۸۵
	pCDNA3.1/HYGRO(+)	۰/۰۸۸	۲۵
	Control	۰/۰۶۳	۲۰/۸۳
	pCDNA-2 hinge CAR	۰/۱۵۳	۳۶/۳۵
	pCDNA-1 hinge CAR-OX40	۰/۱۴۶	۳۴/۶۹
NIH3T3	pCDNA-2 hinge CAR-OX40	۰/۱۶۳	۳۸/۷۳
	pCDNA3.1/HYGRO(+)	۰/۰۸	۲۵
	Control	۰/۰۶	۲۰/۲۰



نمودار ۲. میزان تولید IL-2 در دو رده سلولی MUC1+ (MCF7, A431) و یک رده سلولی با بیان بسیار ضعیف MUC1 (T47D) و یک رده سلولی MUC1- (NIH3T3).

حاوی سازه pCDNA-1 hinge CAR در هم‌کشتی با سلول‌های T47D حدود ۲/۵ برابر IL-2 بیشتری تولید کردند اما سلول Jurkat حاوی سازه pCDNA-1 hinge CAR-OX40 در مقایسه با سلول Jurkat حاوی سازه pCDNA-1 hinge CAR در هم‌کشتی با سلول‌های MCF7 میزان IL-2 کمتری تولید کرده و حدود ۰/۵ برابر

با توجه به نمودار رسم‌شده میزان IL-2 تولیدی از سلول‌های دارای سازه pCDNA-2 hinge CAR-OX40 در مقایسه با سلول Jurkat حاوی سازه pCDNA-1 hinge CAR در هم‌کشتی با سلول‌های MCF7 حدود ۵ برابر IL-2 بیشتری تولید کردند و در سلول Jurkat حاوی سازه pCDNA-2 hinge CAR-OX40 در مقایسه با سلول Jurkat

کاهش داشته‌است.

بحث

در طی دهه گذشته، ایمونوتراپی یکی از محورهای مورد توجه در درمان سرطان بوده‌است. پیشرفت‌های دانش ما از سیستم ایمنی و نیز شناسایی آنتی‌ژن‌های موجود بر روی سلول‌های توموری باعث پیشبرد استراتژی‌های جدید در ایمونوتراپی شده و ایمونوتراپی را به یکی از اختصاصی‌ترین روش‌های درمان سرطان تبدیل کرده است (۱۲). در بین روش‌های ایمونوتراپی، T سل تراپی همواره مورد توجه محققان قرار گرفته است (۱۳-۱۵). بر طبق مطالعات انجام‌شده گیرنده‌های کایمیریک به سه نسل تقسیم می‌شود:

نسل اول CARها دارای دومین سیگنالینگ بودند که از بخش سیتوپلاسمی CD3 ζ یا زنجیره γ از گیرنده FC استفاده شد. Eshhar و همکاران توانستند قابلیت لیز کنندگی سلول هدف توسط سلول‌های بیان‌کننده این CARها را اثبات کنند (۱۶). نسل دوم CARها دارای هر دو قسمت CD28 و CD3 ζ بود که در ارائه‌های مختلفی از گیرنده‌ها با خصوصیات عملکردی متفاوت گسترش یافته‌اند (۲، ۱۷). تاکنون، نسل اول CARها در فاز I کلینیکال در بیماران با سرطان تخمدان، سرطان کلیه، لنفوما و نوروبلاستوما آزمایش شده‌است که این بیماران پاسخ‌های متوسطی نشان داده‌اند (۱۵، ۱۸).

نسل دوم CARها اکنون در حال وارد شدن به عرصه کلینیکال می‌باشد مانند بدخیمی‌های B سل و سایر سرطان‌ها که عرصه مهمتری برای این شیوه محسوب خواهد شد (۱۹). اخیراً، گیرنده‌های سه بخشی که دارای موتیف‌های سیگنالینگ CD3 ζ ، CD28 همراه با 4-1BB یا OX40 هستند گزارش شده‌است که به‌عنوان نسل سوم CARها به حساب می‌آیند (۲۰). این گیرنده‌ها نشان‌دادند که عملکردهای موثر *in vitro* بهتری نسبت به گیرنده‌های دو بخشی دارند و نیز قدرت فعالیت p13Kinase/Akt شروع شده در ارتباط با آنتی‌ژن در این نسل، بهبود یافته است (۲۱).

Hombach و همکاران نشان‌دادند که تحریک کمکی به‌واسطه CD134 (OX40) سبب افزایش تکثیر و تولید

سایتوکاین و واکنش علیه تومور می‌شود و تکامل T سل‌های خاطره‌ای نیز بیشتر می‌شود (۲۰، ۲۲)؛ همچنین June و همکاران ثابت کردند که CD134 (OX40) بیان Bcl-2 و Bcl-XL را افزایش می‌دهد و تصور می‌شود که این کار برای حیات طولانی‌مدت سلول‌های T (CD4+) لازم است (۲۳). سیگنالینگ CD28 تحریک اولیه را برای تکثیر فراهم می‌کند درحالی‌که سیگنالینگ CD134 (OX40) بعد از آن به سلول‌های T موثر اجازه می‌دهد که زنده بمانند و به تکثیر خود ادامه دهند. OX40 سیگنال طولانی‌مدت و قوی برای فعالیت سلول‌های T فراهم می‌کند که برای حفظ پاسخ ایمنی حیاتی است (۱۱، ۲۴-۲۵).

در این تحقیق نسل سوم رسپتورهای کایمیریک را ایجاد کردیم. رسپتور کایمیریکی که ت آقایی بختیاری و همکاران، آن را ساخته‌اند، حاوی VHH علیه MUC1 بود و فاقد قطعه کمک محرک OX40 است؛ این قطعه را با روش SOE PCR به سازه ساخته‌شده آقایی بختیاری و همکاران وارد کرده، عملکرد و میزان بیان آن با کیت IL-2 و semi-quantitative RT PCR اندازه‌گیری شد که نتایج موید آن است که عملکرد و بیان سازه دارای OX40 بیشتر شده‌است. با توجه به نتایج ارزیابی IL-2 و semi-quantitative RT PCR می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که میزان بیان سازه‌های pCDNA-1-hinge-CAR-OX40 و pCDNA-2-hinge-CAR-OX40 برابرند اما عملکرد سازه pCDNA-2-hinge-CAR-OX40 بیشتر است که احتمالاً به علت ناحیه Hinge با دو لولا می‌باشد و باعث می‌شود تا شکل‌گیری فضایی بهتری داشته باشد و در نتیجه عملکرد بهتری خواهد داشت.

با در نظر گرفتن کلیه مباحث فوق و خصوصیات ویژه VHH امید است که این تحقیق بتواند گامی در زمینه حل مشکلات کاربردی گیرنده‌های کایمیریک باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی است و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی - دانشگاه تربیت مدرس و نیز کمیته زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس به طرح تصویب شده دکتر فاطمه رهبری زاده (TMU-88-8-67) انجام شده‌است.

منابع

1. Gaynor M. The new war on cancer: against all causes. *Explore (NY)*. 2005;1:302-5.
2. Schumacher TNM. T-cell receptor gene therapy. *Immunol*. 2002;2:512-9.
3. Sadelain M. Targeting tumors with genetically enhanced T lymphocytes. *Nature Rev cancer*. 2003;3:35-42.
4. Hombach A. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 ζ signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 ζ signaling receptor molecule *Immunol* 2001;167:6123-31.
5. Maher J Brentjens RJ et al. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR ζ /CD28 receptor. *Nature biotechnol*. 2002;20:70-5.
6. Biagi E Marin V et al. Chimeric T-cell receptors: new challenges for targeted immunotherapy in hematologic malignancies. *Hematology*. 2007;381-88.
7. Finney HM Akbar AN et al. Activation of Resting Human Primary T Cells with Chimeric Receptors: Costimulation from CD28, Inducible Costimulator, CD134, and CD137 in Series with Signals from the TCR Chain. *Immunology*. 2004;172:104-13.
8. Pule MA, Straathof KC et al. A Chimeric T Cell Antigen Receptor That Augments Cytokine Release and Supports Clonal Expansion of Primary Human T Cells. *Mol Ther*. 2005;12: 933-41.
9. Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. *Molecular Biotechnology* 2001;74:277-302.
10. Revets H De Baetselier P et al. Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5:111-24.
11. Bakhtiari SH Rahbarizadeh F et al. Anti-MUC1 nanobody can redirect T-body cytotoxic effector function. *Hybridoma (Larchmt)*. 2009;28:85-92.
12. Leisegang M Turqueti-Neves A et al. T-cell receptor gene-modified T cells with shared renal cell carcinoma specificity for adoptive T-cell therapy. *Clin Cancer Res*. 2010 Apr 15;16(8):2333-43.
13. Yee C. Adoptive T-cell therapy of cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2006;20:711-33.
14. Tey SK Bollard CM et al. Adoptive T-cell transfer in cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol*. 2006;84:281-9.
15. Dudley ME Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:666-75.
16. Gross G Gorochov G et al. Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with antibody type-specificity. *Transplant Proc*. 1989;21:127-30.
17. Kronfeld K Hochleitner E et al. B7/CD28 costimulation of T cells induces a distinct proteome pattern. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4:1876-87.
18. Finney HM Lawson AD et al. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *Immunol*. 1998; 161:2791-7.
19. Macary PA Too CT et al. Targeting tumours by adoptive transfer of immune cells. *Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33:569-74.
20. Hombach A Abken H. Costimulation tunes tumor-specific activation of redirected T cells in adoptive immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56:731-7.
21. Bobisse S Rosato A et al. T-cell receptor gene transfer by lentiviral vectors in adoptive cell therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2007;7:893-906.
22. Kieback E Uckert W. Enhanced T cell receptor gene therapy for cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2010 May;10(5):749-62.
23. June C. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *Clin Invest*. 2007;117:1204-12.
24. Madrigal AJ Rusakiewicz S et al. Immunotherapy with alloreactive T-cells? *Hematol J*. 2004;9:1-5.
25. Guinn BA Kasahara N et al. Recent advances and current challenges in tumor immunology and immunotherapy. *Mol Ther*. 2007;15:1065-71.

Daneshtar

Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
Seventeenth Year,
No.95
October, November
2011*

Received: 16/6/2011

Last revised: 3/10/2011

Accepted: 16/10/2011

Synthesis of chimeric T cell receptor with OX40 co-stimulatory receptor targeted against breast cancer cells

Sepideh Khaleghi¹, Fatemeh Rahbarizadeh^{*2}, Keyhan Azadmanesh³, Mohammadjavad Rasaei⁴, Farnoush Jafari⁵

1. M.Sc. Student, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran.

2. Assistant Professor, Fatemeh Rahbarizadeh, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran.

3. Assistant Professor, department of AIDS and Hepatitis, pastuer Institute of Iran, Tehran, Iran.

4. Professor, Mohammad Javad Rasaei, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran.

5. Ph. D. Student, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran.

E-mail: rahbarif@modares.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Chimeric antigen T cell receptors provide a good approach for adoptive immunotherapy of cancer. In this new kind of chimeric T cell receptor, nanobodies are replaced as variable fragment of T cell receptor. Nanobodies (VHH) are the smallest fragments of antibodies that have great homology to human VH and low immunogenic potential. VHH-hing-CD28-CD3 ζ construct was made in our laboratory. Tumor cells rarely provide costimulatory signals and hence CAR receptors that transmit just a CD3 ζ signal can only initiate target cell killing and interferon γ release and fail to induce full activation. Although incorporation of a CD28 component results in IL-2 (Interlukin 2) release and limited proliferation, T cell activation remains incomplete. To optimize CAR signaling, tripartite endodomains were constructed which consist of CD28-OX40-CD3 ζ . During T cell activation, OX40 transmits a potent and prolonged T cell activation signal and it is crucial for maintaining an immunological response.

Materials and Methods: We designed overlapping primers that contain 60% of OX40 sequence, then, CD28-Ox40-CD3 ζ region was synthesized by SOE-PCR, consequently, it was replaced with CD28-CD3 ζ region in VHH-Hing-CD28-CD3 ζ construct. Then, this construct was transfected in Jurkat T cells, so IL-2 secretion and T cells proliferation were increased.

Results: CD28-OX40-CD3 ζ tripartite cytoplasmic domain provided a full complement of activation, proliferation, and survival signals for enhanced anti-tumor activity.

Conclusion: With IL-2 and semi-quantitative RT PCR, it is concluded that mRNA expression of pCDNA-1-hinge-CAR-OX40 and pCDNA-2-hinge-CAR-OX40 constructs are the same but the function of pCDNA-2-hinge-CAR-OX40 construct is more than the others.

Key words: chimeric T cell receptor, Nanobody, Ox40, T lymphocyte