

## مقایسه عملکرد چهار سلول T مهندسی شده با رسپتور کایمیریک حاوی نانوبادی ضد HER2 در مواجهه با سلول‌های سرطانی سینه

نویسندگان: فاطمه رحیمی‌جمانی<sup>۱</sup>، فاطمه رهبری‌زاده<sup>۲\*</sup>، محمدعلی شکرگزار<sup>۳</sup>، فریدون مهبودی<sup>۴</sup>

۱. استادیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استاد بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴. دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول: فاطمه رهبری‌زاده E-mail: Rahbarif@modares.ac.ir

### چکیده

مقدمه و هدف: به‌کارگیری سیستم ایمنی فرد بیمار و سلول‌های T (به‌عنوان بازوی قدرتمند سیستم ایمنی) در ازبین‌بردن سلول‌های سرطانی، از جمله روش‌های درمانی امیدبخش محسوب می‌شود؛ در این راستا، سلول‌های T مهندسی شده بیان‌کننده رسپتورهای کایمیریک دارای نانوبادی (آنتی‌بادی تک‌دومینی شتری) که قادر به شناسایی آنتی‌ژن سرطانی HER2 هستند، راهکاری مؤثر در درمان هدفمند سرطان سینه است.

مواد و روش‌ها: از نانوبادی‌های ضد آنتی‌ژن HER2، به‌عنوان قطعه شناساگر آنتی‌ژن در رسپتورهای کایمیریک  $\zeta$ CD3 $\zeta$ -CD28-OX40-CD3 $\zeta$  (طویل) و  $\zeta$ CD3 $\zeta$ -CD28-OX40-CD3 $\zeta$  (کوتاه) در سطح سلول‌های T استفاده شد. میزان بیان رسپتورها در غشای سلول‌های T ترانسفکته با روش RT-PCR بررسی شد. عملکرد سلول‌های T مهندسی شده در مواجهه با سلول‌های سرطانی سینه براساس میزان تولید اینترلوکین ۲ و ازبین‌بردن سلول‌های سرطانی براساس میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز، ارزیابی شد.

نتایج: رسپتورهای کایمیریک با ناحیه فضا‌ساز طویل و قطعه کمک سیگنالی OX40 با نانوبادی‌های RR<sub>6</sub> و RR<sub>16</sub> که ناحیه نزدیک غشایی HER2 را شناسایی می‌کردند، باعث عملکرد بهتر سلول‌های T در مواجهه با سلول‌های سرطانی سینه شدند. درحالی‌که نانوبادی‌های RR<sub>4</sub> و RR<sub>10</sub> که ناحیه دیستال آنتی‌ژن HER2 را مورد هدف قرار می‌دادند نتایجی بهتر را با سازه‌های کایمیریک دارای ناحیه فضا‌ساز کوتاه نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به خصوصیت اتصال نانوبادی، می‌توان رسپتورهای کایمیریک کاراتری طراحی کرد که سلول‌های T مهندسی شده دارای این رسپتورها، قدرتی بالا در شناسایی سلول‌های سرطانی سینه و ازبین‌بردن آنها داشته باشند.

واژگان کلیدی: سلول‌های T مهندسی شده، رسپتور کایمیریک، نانوبادی، فاکتور رشد اپیدرمالی ۲

## مقدمه

سرطان به عنوان دومین عامل منجر به مرگ در کشورهای توسعه یافته از لحاظ اقتصادی و سومین عامل منجر به مرگ در کشورهای در حال توسعه (پس از تصادفها و بیماریهای قلبی-عروقی)، حائز اهمیت است (۱). هدف اصلی در درمان سرطان، ریشه کن کردن همیشگی سلولهای سرطانی است با در نظر گرفتن این نکته که حداقل عوارض جانبی را روی بافتهای سالم برجای گذارد (۲). روشهای متداول دارویی، شامل شیمی درمانی و رادیوتراپی، اشکالهایی از قبیل سمیت، مقاومت و عدم اختصاصیت دارند (۳). با افزایش یافته‌ها در خصوص عملکرد سلول ایمنی و بیولوژی تومور، هم-اکنون مشخص شده است که یک سیستم ایمنی فعال، نقش حیاتی در پیشگیری و درمان سرطان ایفا می‌کند (۲). استفاده از آنتی بادی و لئوسیت‌های T به عنوان دو بازوی مهم سیستم ایمنی در از بین بردن سلولهای توموری، توجه بسیاری را به خود معطوف کرده است (۴). به کارگیری ژن‌های کدکننده زنجیره‌های آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی آنتی ژن توموری در ساختارهایی با عنوان رسپتور کایمیریک و بیان این رسپتورها در سطح سلولهای T، به ایجاد سلولهایی با قدرت قابل ملاحظه منجر شد (۳ تا ۶). رسپتور کایمیریک شامل قسمت خارج سلولی که به طور معمول، قطعه آنتی بادی scFv<sup>۱</sup> (نواحی متغیر زنجیره‌های سبک و سنگین از آنتی بادی که با یک لینکر انعطاف پذیر به هم وصل شده‌اند) ضد آنتی ژن مورد نظر است، نواحی فضا ساز، درون غشایی و درون سیتوپلاسمی (اشتقاقی از اجزای سیگنالینگ رسپتور سلول T) است (۴، ۷ و ۸). برخلاف نتایج رضایت بخش اولیه، به دلیل پاسخهای ایمنی (منشأ موشی قطعه scFv) و ماندگاری اندک سلولهای T مهندسی شده، این نتایج رضایت بخش در بدن بیماران سرطانی مشاهده نشد (۹ تا ۱۳)؛ در همین راستا از نانوبادی‌ها به عنوان کوچکترین قطعه آنتی بادی شناخته شده و جایگزینی مناسب برای

scFv در رسپتور کایمیریک استفاده شد (۱۴). نانوبادی‌ها به طور تقریبی ۲/۵ نانومتر قطر، ۴ نانومتر طول و وزنی در حدود ۱۵-۱۲ کیلو دالتون دارند و از یک ایمونوگلوبولین دارای قدرت اتصال (آنتی بادی‌های زنجیره سنگین)، مشتق می‌شوند (۱۵ تا ۱۷)؛ این قطعات تک دومینی، همولوژی بالایی با آنتی بادی‌های انسانی دارند و تابه حال به هیچ پاسخ ایمنی در بیماران منجر نشده‌اند؛ از جمله دیگر خصوصیات منحصر به فرد نانوبادی‌ها که به برتری آنها نسبت به آنتی بادی‌های درمانی متداول منجر شده است، شامل توانایی شناسایی اپی توپ‌های مخفی و نامعمول، توانایی اتصال به حفرات یا جایگاه فعال پروتئین‌ها و انعطاف پذیری مناسب برای تبدیل به شکل دارویی است؛ در مجموع، خصوصیات بیوفیزیکی و دارویی مناسب نانوبادی‌ها همراه با قابلیت تبدیل آنها به پروتئین‌های درمانی چندکاره، باعث شده تا از آنها به عنوان نسلی جدید در درمان بر پایه آنتی بادی یاد شود (۱۸).

برای دسترسی بهتر رسپتور کایمیریک در سطح سلول T مهندسی شده به آنتی ژن، پس از قطعه نانوبادی فضا سازهایی طراحی شده است (۸). برای ساخت این ناحیه، اغلب از دومین‌های لولا، CH<sub>2</sub> و CH<sub>3</sub> از آنتی بادی IgG1 استفاده می‌شود (۱۹)؛ در ادامه برای هر چه قوی تر-ساختن سلولهای T مهندسی شده، دومین‌های کمک سیگنالی: CD28، OX40، و سیگنالی CD3 $\zeta$  به قسمت درون سیتوپلاسمی رسپتور کایمیریک نیز اضافه شدند (۲۰ تا ۲۲).

از جمله تارگت‌های مهم در ایمونوتراپی هدفمند سرطان، آنتی ژن<sup>۲</sup> است. HER2 از خانواده رسپتور، معیار رشد اپیدرمالی<sup>۳</sup> (HER) است که در انسان شامل HER1، HER2، HER3 و HER4 است. اعضای خانواده HER از مدیاتورهای ضروری برای تکثیر و تمایز در جنین در حال رشد و بافت‌های بالغان محسوب می‌شوند که بیان بیش از حد و فعالیت نامناسب آنها با توسعه و

<sup>2</sup> - Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

<sup>3</sup> - Epidermal Growth Factor Receptor (HER family)

1-Single-chain variable fragment

اند (۱۴ و ۲۴ تا ۲۷)؛ در همین راستا در این مطالعه برای اولین بار، پنبلی از سلول‌های T مهندسی شده دارای رسپتور کایمیریک با نانوبادی‌های با خصوصیات متفاوت برای شناسایی و دسترسی بهتر به آنتی‌ژن HER2 بر سطح سلول سرطانی سینه تولید شد (۲۸). انتظار می‌رود ویژگی اتصال نانوبادی نقشی بسزا در طراحی رسپتور کایمیریک داشته‌باشد؛ به همین دلیل، انواع نانوبادی‌های ضد آنتی‌ژن HER2 به‌عنوان ناحیه شناساگر رسپتورهای کایمیریک دارای قطعات فضا‌ساز با طول‌های متفاوت از دومین‌های لولا، CH2 و CH3 از آنتی‌بادی IgG به‌کاررفت (شکل ۱).



شکل ۱. نمای شماتیکی از رسپتورهای کایمیریک  $\zeta$ CD3-OX40-CD28- $IgG_3$ - $H_{HER2}$  Nb (۱) و  $\zeta$ CD3-OX40-CD28- $IgG_3$ -HH Nb $_{HER2}$  (۲)

داشته‌اند. درحالی‌که دو نانوبادی  $RR_6$  و  $RR_{16}$  برای اتصال به آنتی‌ژن HER2 با آنتی‌بادی تراستوزومب رقابت داشتند (۱۵ و ۲۸). از نانوبادی‌های به‌دست‌آمده به‌عنوان قطعه شناساگر در رسپتورهای کایمیریک با نواحی فضا‌ساز متفاوت برای تولید انواع سلول‌های T مهندسی شده استفاده شد (۲۵ و ۲۸)؛ بدین ترتیب که پلاسمیدهای pcDNA 3.1/Hygro(+) دارای ساختارهای  $\zeta$ CD3-OX40-CD28- $IgG_3$ -HH Nb $_{MUC1}$  (pCAR-HH) و  $\zeta$ CD3-OX40-CD28- $IgG_3$ - $H_{MUC1}$  Nb (pCAR-H) که پیش‌تر خالقی و همکاران ساخته‌بودند (۲۵)، در باکتری *E. coli* TG1 تکثیر یافته، سپس با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (Macherey-Nagel)، تخلیص شدند. سازه CAR-HH دارای دو تکرار از ناحیه لولا و سازه CAR-H دارای یک تکرار از ناحیه لولا به همراه دومین‌های CH2 و CH3

شدت تعداد زیادی از سرطان‌ها مرتبط است. HER2 از آنتی‌ژن‌های مهم در سرطان به‌شمار می‌آید زیرا که بیان بیش از حد آن، باعث افزایش تکثیر سلول توموری، تشکیل رگ و خاصیت تهاجمی می‌شود. بیان بیش از حد HER2 در ۲۵ تا ۳۰ درصد از سرطان‌های سینه و در سایر سرطان‌ها مانند تخمدان، رحم، معده، کولون، مغز و پانکراس، نشان‌دهنده اهمیت این آنتی‌ژن است (۲۳).

در مطالعاتی متعدد که رهبری‌زاده و همکاران انجام داده‌اند، سلول‌های T مهندسی شده دارای رسپتور کایمیریک با نانوبادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های MUC1 و TAG72، توانایی قابل‌ملاحظه‌ای را در تولید اینترلوکین ۲ (IL2)، تکثیر و از بین بردن سلول‌های سرطانی نشان داده-

## مواد و روش‌ها

### درج قطعه ژنی نانوبادی در ناقل‌ها<sup>۱</sup> (pCARs)

در مطالعه‌ای که همین گروه (رهبری‌زاده و همکاران) انجام داده‌اند، چهار نانوبادی  $RR_4$ ،  $RR_6$ ،  $RR_{10}$  و  $RR_{16}$  از کتابخانه نمایش فاژی به‌دست‌آمده از بافت‌های سرطانی بیماران ایرانی جداسازی، تولید و تعیین خصوصیت شدند. نانوبادی‌های به‌دست‌آمده، سلول‌های سرطانی سینه را در مقایسه با سلول‌های نرمال، شناسایی کرده، مورد هدف قرار می‌دادند (۱۵ و ۲۸). دو نانوبادی  $RR_4$  و  $RR_{10}$ ، توانایی شناسایی اپی‌توپ‌های متفاوت از اپی‌توپ‌های مورد شناسایی آنتی‌بادی تراستوزومب را

1- Vectors

### تأیید درج قطعه ژنی نانوبادی به درون ناقلها (pCARs)

کلون‌های تشکیل‌شده روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، توسط کلونی-PCR با به‌کارگیری آغازگرهای Vhfor2 و Vhbam بررسی و کلون‌های حاوی ژن نانوبادی شناسایی شدند. برای تأیید کلونینگ و درج قطعه ژنی نانوبادی، پلاسمید کلون‌های منتخب تخلیص شد و تحت هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودکننده *XhoI* و *Bam HI* (Fermentase) قرار گرفتند؛ پلاسمیدهای منتخب سپس برای توالی‌خوانی فرستاده شدند (جدول ۱).

از آنتی‌بادی IgG3 در ناحیه فضا‌ساز هستند. قطعات نانوبادی با استفاده از آغازگرهای پیشرو Vhfor2 (5'-GACTAGTGCGGCCGCGTGAGGAGACGGTGACCTG-3') دارای سایت برش آنزیم محدودکننده *Not I* و *Vhbam* معکوس (5'-CGCGGATCCAATGGCCGAKGTSGAGCT-3') دارای سایت برش آنزیم محدودکننده *Bam HI*، تکثیر شدند. هضم آنزیمی پلاسمید و قطعات تکثیرشده نانوبادی‌ها، با آنزیم‌های *Not I* و *Bam HI* (Roche) صورت گرفت. اتصال قطعه ژنی نانوبادی به درون پلاسمید با استفاده از کیت لیگاز (Fermentas)، انجام و محصول نو ترکیب به روش الکتروپوریشن به باکتری *E. coli* TG1، وارد شد.

جدول ۱. فهرست نانوبادی‌ها و سازه‌های کایمیریکی که برای تولید سلول‌های T مهندسی‌شده در این مطالعه به‌کار رفتند.

سازه‌ها (pCARs)	قطعه ژنی نانوبادی
pNb <sub>RR4</sub> -H <sub>IgG3</sub> -CD28-OX40-CD3 $\zeta$	Nb <sub>RR4</sub>
pNb <sub>RR4</sub> -HH <sub>IgG3</sub> -CD28-OX40-CD3 $\zeta$	
pNb <sub>RR6</sub> -H <sub>IgG3</sub> -CD28-OX40-CD3 $\zeta$	Nb <sub>RR6</sub>
pNb <sub>RR6</sub> -HH <sub>IgG3</sub> -CD28-OX40-CD3 $\zeta$	
pNb <sub>RR10</sub> -H <sub>IgG3</sub> -CD28-OX40-CD3 $\zeta$	Nb <sub>RR10</sub>
pNb <sub>RR10</sub> -HH <sub>IgG3</sub> -CD28-OX40-CD3 $\zeta$	
pNb <sub>RR16</sub> -H <sub>IgG3</sub> -CD28-OX40-CD3 $\zeta$	Nb <sub>RR16</sub>
pNb <sub>RR16</sub> -HH <sub>IgG3</sub> -CD28-OX40-CD3 $\zeta$	

سلول‌های Jurkat ( $10^6 \times 2/5$  در هر چاهک) به پلیت شش‌خانه انتقال یافت. ۱۶ میکرولیتر از هریک از پلاسمیدها (۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در ۲۵۰ میکرولیتر محیط RPMI-۱۶۴۰ (بدون سرم و آنتی‌بیوتیک) رقیق شد. برای تشکیل کمپلکس بین DNA و لیپوفکتامین LTX، ۱۵ میکرولیتر از لیپوفکتامین LTX به تیوب‌های دارای پلاسمیدهای رقیق‌شده افزوده شد و انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق صورت گرفت؛ سپس کل مجموعه به چاهک‌های دارای سلول‌ها و محیط کشت افزوده شدند؛ پس از ۴ ساعت، محیط روی سلول‌ها با محیط RPMI-۱۶۴۰ کامل (سرم ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک و گلوتامین) جایگزین شد؛ همچنین فیتوهماگلوتینین (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) و

### انتقال سازه‌های کایمیریک به سلول‌های Jurkat

سلول‌های Jurkat T cell cl. E6.1 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط RPMI-۱۶۴۰ حاوی سرم ۱۰ درصد (FBS) (Gibco)، L-گلوتامین (۲ میلی‌مولار)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) (همگی از Invitrogen) رشد داده شد. برای انتقال سازه‌ها به سلول‌های Jurkat از روش ترانسفکشن با ماده لیپوفکتامین LTX (Invitrogen) به دلیل میزان ترانسفکشن بالا و سایتوتوکسیسیته کمتر، استفاده شد. براساس پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده، در روز انجام ترانسفکشن،

1- Fetal bovine serum (heat-inactivated)

## ارزیابی عملکرد سلول‌های Jurkat در مواجهه با سلول‌های سرطانی سینه

### تولید اینترلوکین دو

برای ارزیابی عملکرد سلول‌های Jurkat از سلول‌های سرطانی سینه <sup>1</sup> SKBR3 (HER2+) و <sup>2</sup> HepG2 (HER2-) استفاده شد. سلول‌های SKBR3 و HepG2 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط DMEM حاوی سرم ۱۰ درصد (FBS)، L- گلوتامین (۲ میلی-مولار)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) کشت داده شدند. پس از رسیدن تراکم سلول‌ها به ۸۰ تا ۹۰ درصد، سلول‌های SKBR3 و HepG2 تریپسینه شدند و با لام نئوبار مورد شمارش قرار گرفتند. <sup>4</sup> سلول در چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. برای تحریک اولیه، سلول‌های Jurkat در ابتدا با آنتی‌ژن HER2 تثبیت شده در چاهک پلیت شش خانه انکوبه شدند؛ پس از ۲۴ ساعت، انکوباسیون، سلول‌های Jurkat پیش‌تحریک شده به مدت ۴۸ ساعت در مواجهه با سلول‌های سرطانی HER2+ و HER2- در پلیت ۹۶ خانه قرار گرفتند (به نسبت ۱ سلول سرطانی/۱۰ سلول Jurkat). مایع رویی سلول‌ها را برداشته، میزان IL2 با کیت Quantikine® (R&D systems) براساس دستورالعمل شرکت سازنده بررسی شد. به طور خلاصه، محلول‌های استاندارد از IL2 (از ۰ تا ۲ هزار پیکوگرم در میلی‌لیتر) ساخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از استاندارد، مایع رویی سلول HER2 مثبت و منفی به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه (پوشش داده شده با آنتی‌بادی اختصاصی IL2) افزوده و انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انجام شد؛ پس از شستشو، ۲۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی پلی کلونال کنژوگه (اختصاصی IL2) افزوده شد و پس از ۲ ساعت انکوباسیون، شستشو انجام شد. ۲۰۰ میکرولیتر سوپسترا افزوده و پس از توقف واکنش با هیدروکلریک اسید، میزان جذب نوری (OD<sup>3</sup>)

فوربول میریستات استات (۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) اضافه شد و انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

## انتخاب سلول‌های ترانسفکت شده با آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین

برای انتخاب سلول‌های ترانسفکت شده پایدار، <sup>۵</sup> سلول در محیط RPMI-۱۶۴۰ دارای غلظت‌های متفاوت (۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از هیگرومایسین در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شد و غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هیگرومایسین انتخاب شد. ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌های ترانسفکته (<sup>۵</sup> ۱۰ سلول به ازای هر چاهک) در محیط کامل دارای هیگرومایسین (۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در پلیت ۲۴- خانه کشت داده شد؛ پس از دو هفته، سلول‌های ترانسفکته باقی مانده، انتخاب شدند.

## بررسی بیان سازه‌های کایمریک در سلول‌های Jurkat

ارزیابی بیان سازه‌های کایمریک در سلول‌های Jurkat با استفاده از روش RT-PCR صورت گرفت. رسوب‌های سلولی حاوی <sup>6</sup> ۱۰ سلول Jurkat نرمال (کنترل) و <sup>6</sup> ۱۰ سلول Jurkat ترانسفکت شده با PBS استریل شستشوداده شده، تخلیص RNA با RNAX-Plus (سیناژن) صورت گرفت. با استفاده از کیت سنتز cDNA (سیناژن)، cDNA ساخته شد. برای انجام RT-PCR، از آغازگرهای P2 (5'-TGCTCTAGATGGCTGTTAGCGAGG-3' و P3 (5'-CCGCTCGAGTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTG-3' برای سنتز قطعه میان نواحی CD28-CD3<sub>ζ</sub> از رسپتورهای کایمریک استفاده شد. از آغازگرهای پیشرو (5'-AGTAGGCTTTGTGGTTGATG-3' و معکوس (5'-CTGTCAGGAAAGGAGAAATC-3) برای تکثیر قطعه ۲۰۰ جفت بازی از ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

1- Human breast cancer cell line  
2- Human hepatocellular liver carcinoma cell line  
3- Optical density

## نتایج

### درج قطعه ژنی نانوبادی در سازه‌های کایمیریک

پلاسمیدهای دارای اجزای رسپتور کایمیریک  $Nb_{MUC1}$  و  $Nb_{MUC1-HH_{IgG3-CD28}}$  و  $H_{IgG3-CD28-OX40-CD3\zeta}$  OX40-CD3 $\zeta$  تخلیص و روی ژل آگارز ۱ درصد ران شد. پلاسمیدهای تخلیص شده که دارای قطعه ژنی نانوبادی MUC1 بودند تحت هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Bam HI* و *Not I* قرار گرفتند؛ پس از ران کردن روی ژل ۱ درصد، قطعه ژنی ۳۸۰ تا ۴۰۰ جفت بازی مشاهده شد (شکل ۲). پس از برش و تخلیص از ژل پلاسمیدها، واکنش لیگاسیون با قطعه ژنی نانوبادی‌های ضد HER2 ( $RR_4$ ,  $RR_6$ ,  $RR_{10}$  و  $RR_{16}$ ) صورت گرفت. برای تأیید سبب کلونینگ قطعه ژنی نانوبادی در ناقل‌ها، کلونی-PCR با آغازگرهای *Vhfor2* و *Vhbam* انجام شد که به مشاهده قطعه ژنی نانوبادی ۳۸۰ تا ۴۰۰ جفت بازی روی ژل آگارز ۱ درصد منجر شد (شکل ۳)؛ همچنین هضم آنزیمی ناقل‌های دارای رسپتورهای کایمیریک به ایجاد یک قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی دارای قطعه نانوبادی (به‌طور تقریبی ۳۸۰ جفت باز) و قطعه فضا‌ساز با طول-های ۷۵۰ جفت باز (*CAR-HH*) و ۷۰۰ جفت باز (*CAR-*) (*H*) از آنتی‌بادی  $IgG3$  روی ژل آگارز ۱ درصد منجر شد (شکل ۴).

### ارزیابی بیان سازه‌ها در سلول‌های Jurkat

بیان سازه‌ها در سلول‌های Jurkat ترانسفکت با تخلیص RNA و تکثیر رسپتورهای کایمیریک تأیید شد. طی روند RT-PCR با استفاده از آغازگرهای P2 و P3 ناحیه میان CD28 و CD3 $\zeta$  از رسپتور تکثیر شد که به ایجاد قطعات با طول تقریبی ۷۰۰ جفت باز انجامید (شکل ۵).

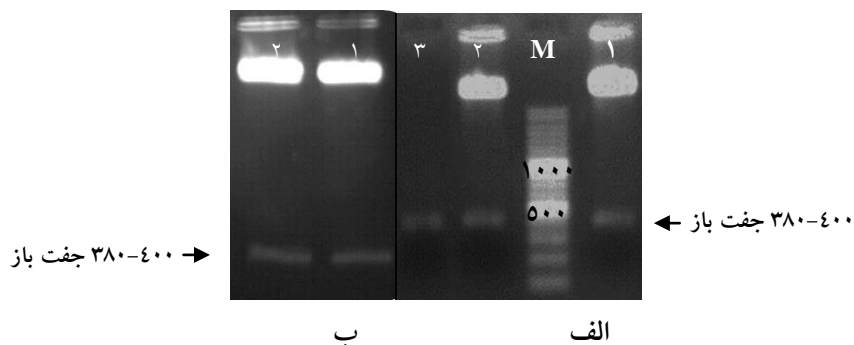
در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه سنجش الایزا (ELISA-Reader) (آمریکا، STAT FAX 2100) خوانده شد.

### ارزیاب بردن سلول‌های سرطانی سینه

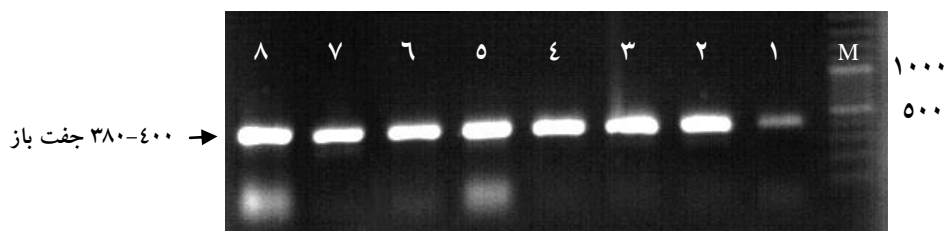
آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آنزیمی پایدار است که در همه انواع سلول‌ها وجود دارد و به محض تخریب غشای پلاسمایی به درون محیط کشت سلولی آزاد می‌شود. LDH با اکسیداسیون لاکتات به پیرووات، باعث احیای  $NAD^+$  به  $NADH + H^+$  می‌شود. در این مطالعه، میزان مرگ سلولی یا سایتوتوکسیسیته به‌واسطه سلول‌های T براساس میزان نشأت LDH به محیط کشت سنجیده شد؛ بدین ترتیب که به‌طور جداگانه سلول‌های Jurkat نرمال و ترانسفکت (۵×۱۰<sup>۵</sup>) با سلول SKBR3 (۱۰<sup>۴</sup>) به مدت ۱۲ ساعت در پلیت ۹۶ خانه انکوبه شد. میزان ترشح LDH در مایع رویی با کیت تجاری پارس آزمون و براساس دستورالعمل شرکت سازنده بررسی شد. به‌طور خلاصه، محلول Working با افزودن یک حجم از کوآنزیم به چهار حجم از سوپسترا تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد؛ پس از انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی-گراد، ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی سلول‌ها به آنها اضافه شد. هر ۱ دقیقه (طی ۳ دقیقه) میزان OD در طول موج ۴۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA Reader (آمریکا، Bio-Tek Instrument) خوانده شد. فعالیت آنزیم LDH (واحد بر لیتر) براساس فرمول:  $16,238 \times$  میانگین سه جذب، محاسبه شد که نشان‌دهنده میزان آسیب به سلول‌ها و نشأت آنزیم LDH است.

### آزمون‌های آماری

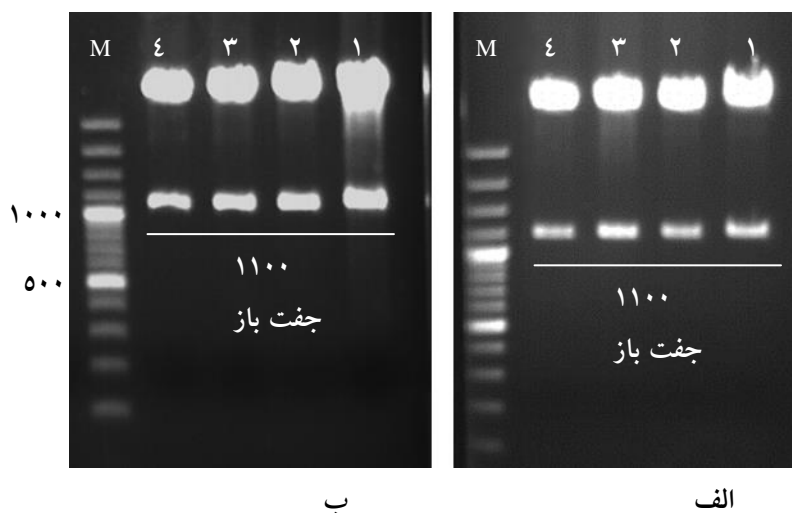
گروه‌های مختلف آزمایش در مطالعه با استفاده از آزمون Kruskal-Wallis مقایسه شدند. مقایسه میان‌گروهی براساس آزمون آماری Mann-Whitney انجام گرفت.  $p\text{-value} < 0/05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.



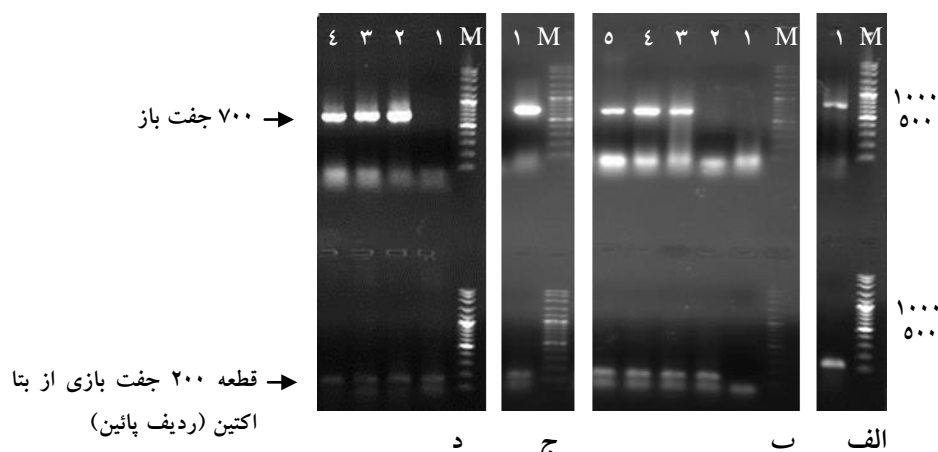
شکل ۲. نتایج الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمیدهای تخلیص شده دارای قطعه ژنی نانوبادی MUC1 با آنزیم‌های *Bam HI* و *Not I* و مشاهده قطعه ژنی ۳۸۰ - ۴۰۰ جفت بازی؛ الف. pCAR-HH (۱)، مارکر (M)، pCAR-H (۲) و نانوبادی RR<sub>4</sub> (۳) و ب. pCAR-HH (۱) و pCAR-H (۲).



شکل ۳. نتایج الکتروفورز کلونی-PCR از کلون های دارای سازه کایمیریک با آغازگرهای Vhfor2 و Vhbam و مشاهده قطعه ژنی نانوبادی ۳۸۰ تا ۴۰۰ جفت بازی. از راست به چپ: مارکر (M)، ناقل دارای سازه CAR-HH به ترتیب دارای نانوبادی های RR<sub>4</sub> (۱)، RR<sub>6</sub> (۲)، RR<sub>10</sub> (۳)، RR<sub>16</sub> (۴) و ناقل دارای سازه CAR-H به ترتیب دارای نانوبادی های RR<sub>4</sub> (۵)، RR<sub>6</sub> (۶)، RR<sub>10</sub> (۷) و RR<sub>16</sub> (۸).



شکل ۴. نتایج الکتروفورز هضم آنزیمی ناقل های دارای سازه های کایمیریک با آنزیم های *XhoI* و *Bam HI* و مشاهده قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی؛ الف. ناقل pCAR-HH به ترتیب دارای نانوبادی های RR<sub>4</sub> (۱)، RR<sub>6</sub> (۲)، RR<sub>10</sub> (۳)، RR<sub>16</sub> (۴) و مارکر (M) و ب. ناقل pCAR-H به ترتیب دارای نانوبادی های RR<sub>4</sub> (۱)، RR<sub>6</sub> (۲)، RR<sub>10</sub> (۳) و RR<sub>16</sub> (۴) و مارکر (M).



شکل ۵. نتایج الکتروفورز حاصل از RT-PCR ناقل‌های دارای سازه‌های کایمیریک و مشاهده قطعه تقریباً ۷۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر CD28-OX40-CD3ζ در ردیف بالا و قطعه ۲۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر بتا اکتین در ردیف پایین؛ الف. مارکر (M) و سلول Jurkat ترانسفکته دارای رسپتور کایمیریک CAR-HH با نانوبادی RR<sub>16</sub> (۱)؛ ب. مارکر (M)، کنترل منفی (۱)، سلول Jurkat نرمال (۲) و سلول Jurkat ترانسفکته دارای رسپتور کایمیریک CAR-HH به ترتیب با نانوبادی‌های RR<sub>4</sub> (۳)، RR<sub>6</sub> (۴) و RR<sub>10</sub> (۵)؛ ج. مارکر (M) و سلول Jurkat ترانسفکته دارای رسپتور کایمیریک CAR-H با نانوبادی RR<sub>4</sub> (۱) و د. مارکر (M)، سلول Jurkat نرمال (۱) و سلول Jurkat ترانسفکته دارای رسپتور کایمیریک CAR-H به ترتیب با نانوبادی‌های RR<sub>6</sub> (۲)، RR<sub>10</sub> (۳) و RR<sub>16</sub> (۴)

RR<sub>16</sub> میزان IL2 بیشتری (۲۰±۶۶۶ و ۱۵±۵۴۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به سلول‌های دارای رسپتور کایمیریک CAR-HH با نانوبادی‌های RR<sub>4</sub> و RR<sub>10</sub> (۲۰±۵۷۰ و ۱۱±۶۶۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) تولید کردند (جدول ۲). همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد، سلول‌های ترانسفکته دارای رسپتور کایمیریک CAR-H با نانوبادی‌های RR<sub>4</sub> و RR<sub>10</sub> (۲۲±۶۳۰ و ۲۵±۵۰۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) بهتر از سلول‌های ترانسفکته دارای رسپتور کایمیریک CAR-H با نانوبادی‌های RR<sub>6</sub> و RR<sub>16</sub> (۱۶±۵۸۵ و ۱۹±۵۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) در تولید IL2 عمل کردند؛ در مجموع، عملکرد سلول‌های Jurkat ترانسفکته دارای رسپتور کایمیریک در ازبین بردن سلول‌های SKBR3 از سلول‌های Jurkat نرمال (به عنوان کنترل) بهتر بوده است (جدول ۲). سلول‌های دارای رسپتورهای کایمیریک CAR-HH با نانوبادی‌های RR<sub>6</sub> و RR<sub>16</sub> توانستند به ترتیب به میزان ۵۸ درصد و ۴۹ درصد از سلول‌های SKBR3 را ازبین ببرند؛ همچنین سلول‌های دارای رسپتورهای کایمیریک CAR-H با نانوبادی‌های RR<sub>4</sub> و RR<sub>10</sub> نیز نتایجی به‌طور تقریبی مشابه با گروه پیشین را نشان دادند (جدول ۲).

#### نتایج حاصل از عملکرد سلول‌های Jurkat

##### ترانسفکته در مواجهه با سلول‌های سرطانی سینه

سلول‌های Jurkat ترانسفکته دارای رسپتور کایمیریک در مواجهه با سلول SKBR3، میزان IL2 بیشتری در مقایسه با سلول‌های Jurkat نرمال فاقد و دارای ناقل pcDNA3.1/HYGRO(+) تولید کردند. سلول‌های ترانسفکته دارای رسپتور کایمیریک ضد آنتی‌ژن HER2 در مواجهه با سلول‌های سرطانی فاقد آنتی‌ژن HER2 (HepG2) فعالیتی نشان‌ندادند. نتایج نشان داد که عملکرد سلول‌های ترانسفکته به شناسایی آنتی‌ژن توسط نانوبادی، وابسته است. در مطالعه پیشین، مشخص شد که نانوبادی‌های RR<sub>4</sub> و RR<sub>6</sub> (M-1)  $5/4 \times 10^{12}$  و  $7/5 \times 10^{12}$  در مقایسه با نانوبادی‌های RR<sub>10</sub> و RR<sub>16</sub> (M-1)  $10^{11} \times 0/2$  و  $10^{11} \times 0/6$  دارای افینیتی بیشتری به آنتی‌ژن HER2 هستند (۱۵ و ۲۸). در این مطالعه به‌کارگیری نانوبادی‌های با افینیتی بالا به عملکرد بهتر سلول‌های Jurkat ترانسفکته با رسپتور کایمیریک در تولید IL2 و سایتوتوکسیسیته منجر شد. در میان رسپتورهای کایمیریک به‌کاررفته در این مطالعه، سلول‌های دارای رسپتور کایمیریک CAR-HH با نانوبادی‌های RR<sub>6</sub> و



جدول ۲. میزان تولید اینترلوکین ۲ و سایتوتوکسیسیته سلول‌های ژورکات دارای رسپتور کایمیریک و نرمال در مواجهه با سلول‌های HER<sup>+</sup> و HER<sup>-</sup>.

HER <sup>-</sup> (سلول HepG2)		HER <sup>+</sup> (سلول SKBR3)		تیمار
درصد سایتوتوکسیسیته	IL2 (pg/ml)	درصد سایتوتوکسیسیته	IL2 (pg/ml)	
۸٪	۴۵±۴	۶٪	۵۰±۵	سلول Jurkat نرمال (کنترل منفی)
۷٪	۳۵±۷	۸٪	۵۲±۶	سلول Jurkat ترانسفکت شده با pcDNA3.1 (کنترل منفی)
۱۴٪	۸۰±۴	۵۶٪	۶۳۰±۲۲	pCAR <sub>RR4</sub> -H
۱۲٪	۶۷±۶	۵۰٪	۵۷۰±۲۰	pCAR <sub>RR4</sub> -HH
۱۳٪	۶۵±۵	۴۹٪	۵۸۵±۱۶	pCAR <sub>RR6</sub> -H
۱۰٪	۸۸±۷	۵۸٪	۶۶۶±۲۰	pCAR <sub>RR6</sub> -HH
۴٪	۳۵±۲	۴۸٪	۵۰۵±۲۵	pCAR <sub>RR10</sub> -H
۵٪	۳۲±۴	۴۱٪	۴۶۵±۱۱	pCAR <sub>RR10</sub> -HH
۴٪	۵۵±۳	۴۴٪	۵۰۰±۱۹	pCAR <sub>RR16</sub> -H
۶٪	۵۰±۴	۴۹٪	۵۴۰±۱۵	pCAR <sub>RR16</sub> -HH

بر اساس آزمون آماری Mann-Whitney، تفاوتی معنی‌دار در تولید اینترلوکین ۲ و میزان سایتوتوکسیسیته میان هریک از سلول‌های ژورکات دارای رسپتور کایمیریک با سلول ژورکات کنترل وجود دارد (p-value < ۰/۰۵).

## بحث

موفقیت ایمونوتراپی سرطان به توانایی عناصر درمانی در شناسایی اختصاصی سلول‌های سرطانی و افینیتی بالا به آنتی‌ژن‌های توموری، بستگی دارد (۲۹)؛ در این راستا به کارگیری قدرت هدف‌گیری و سایتوتوکسیسیته بازوی سلولی سیستم ایمنی در از بین بردن سلول‌های سرطانی، باعث پیشرفتی چشمگیر در درمان سرطان شده است (۴). انتقال اکتسابی سلول‌های T به دلیل نفوذ مؤثر آنها به ناحیه توموری، جایگزینی در ناحیه توموری و توسعه سلول‌های T حافظه، بیشترین موفقیت را نشان داده است (۳۰). با وجود مزایای انتقال اکتسابی سلول‌های T، این روش از محدودیت‌هایی نظیر «جداسازی و تکثیر سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن مورد نظر (روشی سخت و وقت‌گیر) و فرار سلول‌های سرطانی با عدم بیان مولکول‌های MHC» رنج می‌برد (۳۱)؛ برای برطرف کردن این مشکلات، راهکار رسپتور

کایمیریک با به‌کارگیری دو بازوی هم‌وزن و سلولی سیستم ایمنی مطرح شد (۴). نسل‌هایی متعدد از رسپتورهای کایمیریک توسط گروه‌های مختلف، طراحی و بررسی شدند تا در نهایت، نسل سوم دارای قطعات سیگنالینگ CD3 $\zeta$ ، کمک سیگنالی CD28 و OX40 نتایجی بهتر را از لحاظ ماندگاری لنفوسیت‌ها در بدن فرد سرطانی و قدرت از بین بردن سلول‌های سرطانی نشان داد (۲۲)؛ در همین راستا رهبری زاده و همکاران برای بررسی عملکرد سلول‌های T مهندسی شده، انواعی مختلف از نسل‌های دوم (دارای قطعات سیگنالینگ CD3 $\zeta$  و کمک سیگنالی CD28) و سوم از رسپتورهای کایمیریک را با نانوبادی به‌عنوان قطعه شناسایی‌کننده آنتی‌ژن‌های MUC1 و TAG72 (به ترتیب روی سلول‌های سینه و روده)، طراحی کردند. نتایج حاصل از مطالعات متعدد، توسط این گروه، نشان داد که نسل سوم، باعث تولید بیشتر IL2 و تکثیر بالای سلول‌های Jurkat

به دست آمده از مطالعات یاد شده، در این تحقیق نیز سلول‌های دارای رسپتور کایمیریک CAR-H با نانوبادی-های  $RR_4$  و  $RR_{10}$ ، عملکردی مؤثرتر داشتند. می‌توان-نتیجه‌گرفت نانوبادی‌های یاد شده به نواحی دیستال از آنتی‌ژن HER2 متصل می‌شوند و به ناحیه فضا ساز طویل نیازی ندارند.

در این مطالعه از سلول‌های Jurkat به عنوان مدلی برای بررسی عملکرد رسپتورهای کایمیریک ضد آنتی‌ژن سرطانی HER2 استفاده شد. نتایج نشان دادند که سلول‌های Jurkat مهندسی شده با رسپتورهای کایمیریک در مواجهه با سلول‌های سرطانی سینه، توانایی بالایی در تولید IL2 و از بین بردن سلول‌های سرطانی دارند (۳۵). سلول‌های Jurkat از نوع لنفوسیت‌های  $T CD4+$  هستند. در مطالعه‌ای که هومباخ و همکاران انجام دادند، نتایج نشان دادند که لنفوسیت‌های  $T CD4+$  نه تنها از طریق تولید IL2، محیطی مناسب را برای سلول‌های T سایتوتوکسیک به منظور از بین بردن سلول‌های سرطانی فراهم می‌کنند بلکه می‌توانند از طریق مسیر گرانزیم/پرفورین هم به طور مستقیم باعث مرگ سلول‌های سرطانی شوند (۲۲ و ۳۶ تا ۳۸).

سلول‌های سرطانی برای فرار از شناسایی توسط سلول‌های سیستم ایمنی (ضد اپی‌توپی خاص از آنتی‌ژن سرطانی)، آنتی‌ژن‌هایی را بیان می‌کنند که فاقد اپی‌توپ مورد نظر هستند (۳۹). استفاده از سلول‌های T ضد اپی‌توپی خاص، وضعیتی رقابتی و اشباع شده به وجود می‌آورد؛ در نتیجه به دلیل اشباع شدن اپی‌توپ‌ها توسط سلول‌های T، سلول‌هایی که به اپی‌توپ‌های مورد نظر دسترسی ندارند در خون سرگردان می‌مانند و به آنتی‌ژن مورد نظر روی سایر سلول‌ها (سلول‌های سالم) متصل می‌شوند و عوارض جانبی ایجاد می‌کنند (۱۱). در دو مطالعه مختلف، تزریق مقادیر زیاد سلول‌های T مهندسی شده با رسپتورهای کایمیریک دارای scFv ضد آنتی‌ژن‌های HER2 (۱۱) و CD19 (۱۰) به مرگ بیماران منجر شد؛ دلیل دو مرگ یاد شده، اتصال سلول‌های

مهندسی شده می‌شود؛ در ادامه، برای بررسی نقش اتصال نانوبادی به آنتی‌ژن HER2 در عملکرد سلول مهندسی شده دارای رسپتور کایمیریک، انواع رسپتورهای کایمیریک نسل سوم با طول‌های فضا ساز و نانوبادی‌های متفاوت طراحی شدند.

بر اساس مطالعه انجام شده توسط همین گروه، دو نانوبادی  $RR_4$  و  $RR_{10}$  در رقابت با آنتی‌بادی تراستوزومب تغییری در اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن HER2 ایجاد نمی‌کردند در حالی که دو نانوبادی  $RR_6$  و  $RR_{16}$  در رقابت با آنتی‌بادی تراستوزومب باعث جدا شدن آنتی‌بادی از آنتی‌ژن HER2 می‌شدند. اپی‌توپ مورد شناسایی آنتی‌بادی تراستوزومب، روی دومین IV از آنتی‌ژن HER2 (اسید آمینه ۶۲۷-۵۲۹) و نزدیک به غشا قرار دارد (۱۵). همان‌طور که نتایج نشان دادند رسپتورهای کایمیریک CAR-HH (با ناحیه فضا ساز طویل) با نانوبادی‌های  $RR_6$  و  $RR_{16}$  عملکردی بهتر داشتند. در چندین گزارش ثابت شد که رابطه‌ای مستقیم میان ناحیه مورد هدف روی آنتی‌ژن مورد نظر و طول ناحیه فضا ساز در رسپتورهای کایمیریک وجود دارد (۲۰، ۲۵ و ۳۲ تا ۳۴). در تحقیقی که خالقی و همکاران، انجام دادند، نشان داده شد که دو تکرار از ناحیه لولا نه-تنها باعث انعطاف پذیری بهتر رسپتورها شده بلکه با همودایمیریزاسون رسپتورها، آویدیتی آنها برای آنتی‌ژن MUC1، بیشتر شده است (۲۵)؛ همچنین گروه گسست و همکاران گزارش دادند که برای فعال سازی مؤثر و عملکرد بهتر، به فاصله مناسب میان سلول‌های T و آنتی‌ژن هدف نیاز است (۳۳). در مطالعه‌ای دیگر، ویلکی و همکاران، پنبلی از رسپتورهای کایمیریک با ناحیه فضا ساز با طول‌های متفاوت ضد آنتی‌ژن MUC1 طراحی کردند (۲۰)؛ این مطالعه نشان داد که برای دسترسی به نواحی پروگزیمال از آنتی‌ژن هدف، به ناحیه لولای طویل و انعطاف پذیر برای غلبه بر ممانعت فضایی ناشی از تراکم رسپتورها و آنتی‌ژن‌های متعدد موجود در سطح سلول‌های سرطانی نیاز است (۲۰)؛ همگام با نتایج

ارزیابی و سپس در سلول‌های T برگرفته از فرد بیمار بیان‌شوند و کارایی آنها مورد سنجش قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع دکترای تخصصی بیوتکنولوژی دارویی با عنوان تهیه و بررسی عملکرد سلول‌های T بیان‌کننده رسپتور کایمیریک اختصاصی علیه HER2 است که با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران و دانشگاه تربیت مدرس اجرا شده است.

### منابع

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
2. Xue SA, Stauss HJ. Enhancing immune responses for cancer therapy. *Cell Mol Immunol*. 2007;4(3):173-84.
3. Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ. Cancer immunotherapy-revisited. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(8):591-600.
4. Leen AM, Rooney CM, Foster AE. Improving T cell therapy for cancer. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:243-65.
5. Guinn BA, Kasahara N, Farzaneh F, Habib NA, Norris JS, Deisseroth AB. Recent advances and current challenges in tumor immunology and immunotherapy. *Mol Ther*. 2007;15(6):1065-71.
6. June CH. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1204-12.
7. Sadelain M, Riviere I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):35-45.
8. Hombach A, Heuser C, Abken H. The recombinant T cell receptor strategy: insights into structure and function of recombinant immunoreceptors on the way towards an optimal receptor design for cellular immunotherapy. *Curr Gene Ther*. 2002;2(2):211-26.
9. Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*. 2010;24(6):1160-70.
10. Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, Riviere I, Sadelain M. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol Ther*. 2010;18(4):666-8.
11. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*. 2010;18(4):843-51.
12. Russo V, Bondanza A, Ciceri F, Bregni M, Bordignon C, Traversari C, et al. A dual role for genetically modified lymphocytes in cancer immunotherapy. *Trends Mol Med*. 2012;18(4):193-200.
13. Park TS, Rosenberg SA, Morgan RA. Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends Biotechnol*. 2011;29(11):550-7.

مهندسی شده به آنتی‌ژن مورد نظر بر سلول‌های طبیعی و تولید میزان زیاد سایتوکاین‌ها (طوفان سایتوکاینی) در بیماران اعلام شد؛ از جمله راه‌حل‌های پیشنهادی برای هرچه اختصاصی کردن این فرایند (T سل درمانی)، مهندسی سلول‌های T فرد بیمار با رسپتورهای کایمیریک دارای نانوبادی‌هایی متفاوت است که قادر به شناسایی نواحی مختلف HER2 هستند و در مواجهه با سلول‌های فاقد آنتی‌ژن مورد نظر هیچ‌گونه فعالیتی از خود نشان نمی‌دهند. به طوری که هنگام تزریق سلول‌های مهندسی شده به بیمار (اتولوگ)، به جای استفاده از  $10^9$  سلول T مهندسی شده با رسپتور کایمیریک دارای نانوبادی  $RR_4$  ضد اپی‌توپی خاص، از چهار سری سلول T مهندسی شده با رسپتورهای کایمیریک دارای نانوبادی‌های  $RR_4$ ،  $RR_6$ ،  $RR_{10}$  و  $RR_{16}$  که هر یک ناحیه‌ای خاص را شناسایی می‌کنند (به تعداد  $10^3$  سلول از هر سری)، استفاده کرد؛ بدین ترتیب، اکثریت قابل توجه سلول‌ها به اپی‌توپ‌های مورد نظر خود دسترسی خواهند داشت و سلول T آزادی وجود نخواهد داشت که به سلول طبیعی متصل شود و عارضه‌ای ایجاد کند.

در انتها برای عملکرد هرچه بهتر سلول‌های T مهندسی شده، باید به نقش نانوبادی در شناسایی و اتصال به آنتی‌ژن روی سلول‌های سرطانی نیز توجه شود تا براساس آن، بهترین طراحی از رسپتور کایمیریک صورت گیرد. همان طوری که در این مطالعه مشخص شد، رسپتورهای با طول‌های مناسب باعث دسترسی بهتر نانوبادی‌ها به اپی‌توپ مورد نظر روی آنتی‌ژن HER2 و متعاقب آن، عملکرد بهتر سلول‌های مهندسی شده شدند. برای درمانی هرچه هدفمندتر پیشنهاد می‌شود مجموعه‌ای از سلول‌های مهندسی شده دارای انواع رسپتورهای کایمیریک طراحی شده ضد آنتی‌ژن‌های HER2 و MUC1 تولید شود تا سلول‌ها قادر باشند به طور هم‌زمان هر دو آنتی‌ژن یاد شده را در سلول‌های سرطانی شناسایی کرده، از بین ببرند؛ ضمن اینکه برای بررسی بیشتر، رسپتورهای کایمیریک طراحی شده در موش‌های سرطانی شده نیز

14. Iri-Sofla FJ, Rahbarizadeh F, Ahmadvand D, Rasaei MJ. Nanobody-based chimeric receptor gene integration in Jurkat cells mediated by PhiC31 integrase. *Exp Cell Res*. 2011;317(18):2630-41.
15. Jamnani FR, Rahbarizadeh F, Shokrgozar MA, Ahmadvand D, Mahboudi F, Sharifzadeh Z. Targeting high affinity and epitope-distinct oligoclonal nanobodies to HER2 over-expressing tumor cells. *Exp Cell Res*. 2012;318(10):1112-24.
16. Rahimi Jamnani F, Rahbarizadeh F, Shokrgozar MA. Nanobodies: Promising Nanodevices for Immunotherapy (PERSIAN). *Nanotechnology*. 2011;160(11):36-41.
17. Rahbarizadeh F, Rahimi jamnani F, Iri-Sofla FJ. Nanobody, New Agent for Combating Against Breast Cancer Cells. In: Gunduz E, Gunduz M, editors. *Breast Cancer - Current and Alternative Therapeutic Modalities*. Rijeka: InTech; 2011. p. 347-70.
18. Kolkman JA, Law DA. Nanobodies – from llamas to therapeutic proteins. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2010;7(2):139-46.
19. Hombach A, Hombach AA, Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther*. 2010;17(10):1206-13.
20. Wilkie S, Picco G, Foster J, Davies DM, Julien S, Cooper L, et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J Immunol*. 2008;180(7):4901-9.
21. Hombach AA, Abken H. Costimulation by chimeric antigen receptors revisited the T cell antitumor response benefits from combined CD28-OX40 signalling. *Int J Cancer*. 2011;129(12):2935-44.
22. Urba WJ, Longo DL. Redirecting T cells. *N Engl J Med*. 2011;365(8):754-7.
23. Moasser MM. Targeting the function of the HER2 oncogene in human cancer therapeutics. *Oncogene*. 2007;26(46):6577-92.
24. Sharifzadeh Z, Rahbarizadeh F, Shokrgozar MA, Ahmadvand D, Mahboudi F, Jamnani FR, et al. Genetically engineered T cells bearing chimeric nanoconstructed receptors harboring TAG-72-specific camelid single domain antibodies as targeting agents. *Cancer Lett*. 2013;334(2):237-44.
25. Khaleghi S, Rahbarizadeh F, Ahmadvand D, Rasaei MJ, Pognonec P. A caspase 8-based suicide switch induces apoptosis in nanobody-directed chimeric receptor expressing T cells. *Int J Hematol*. 2012;95(4):434-44.
26. Pirooznia N, Hasannia S, Taghdir M, Rahbarizadeh F, Eskandani M. The construction of chimeric T-Cell receptor with spacer base of modeling study of VHH and MUC1 interaction. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:578128. Epub 2011/08/27.
27. Aghaee Bakhtiari SH, Rahbarizadeh F, Hasannia S, Ahmadvand D, Jafari Iri-sofla F, Rasaei MJ. Anti - MUC1 nanobody can redirect T-body cytotoxic effector function. *Hybridoma*. 2009 - accepted.
28. Rahimi Jamnani F, Rahbarizadeh F, Shokrgozar MA, Mahboudi F. Generation and Analysis of T Cells Expressing a HER2-Specific Chimeric Receptor [DISSERTATION], Tehran, IPI. 2012:206.
29. Bergman PJ. Cancer immunotherapy. *Top Companion Anim Med*. 2009;24(3):130-6.
30. Brenner MK, Heslop HE. Adoptive T cell therapy of cancer. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(2):251-7.
31. Curran KJ, Pegram HJ, Brentjens RJ. Chimeric antigen receptors for T cell immunotherapy: current understanding and future directions. *J Gene Med*. 2012;14(6):405-15.
32. Davies DM, Maher J. Adoptive T-cell immunotherapy of cancer using chimeric antigen receptor-grafted T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2010;58(3):165-78.
33. Guest RD, Hawkins RE, Kirillova N, Cheadle EJ, Arnold J, O'Neill A, et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *J Immunother*. 2005;28(3):203-11.
34. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol*. 2004;173(12):7647-53.
35. Bridgeman JS, Hawkins RE, Bagley S, Blaylock M, Holland M, Gilham DE. The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *J Immunol*. 2010;184(12):6938-49.
36. Moeller M, Haynes NM, Kershaw MH, Jackson JT, Teng MW, Street SE, et al. Adoptive transfer of gene-engineered CD4+ helper T cells induces potent primary and secondary tumor rejection. *Blood*. 2005;106(9):2995-3003.
37. Finney HM, Akbar AN, Lawson AD. 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 zeta chain. *J Immunol*. 2004;172(1):104-13. Epub 2003/12/23.
38. Hombach A, Kohler H, Rappl G, Abken H. Human CD4+ T cells lyse target cells via granzyme/perforin upon circumvention of MHC class II restriction by an antibody-like immunoreceptor. *J Immunol*. 2006;177(8):5668-75.
39. Haurum JS. Recombinant polyclonal antibodies: the next generation of antibody therapeutics? *Drug Discov Today*. 2006;11(13-14):655-60.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research  
Journal of Shahed  
University  
Twentieth Year,  
No.106  
August, September  
2013*

Received: 2013/6/21

Last revised: 2013/10/9

Accepted: 2013/10/9

## Functional comparison of four engineered T cells expressing chimeric receptor containing anti-HER2 nanobody against breast cancer cells

Fatemeh Rahimi Jamnani<sup>1</sup>, Fatemeh Rahbarizadeh<sup>2\*</sup>, Fereidoun Mahboudi<sup>1</sup>, Mohammad Ali Shokrgozar<sup>3</sup>

1. Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

2. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3. National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

E-mail: rahbarif@modares.ac.ir.

### Abstract

**Background and Objective:** Harnessing immune system and its powerful arm, T lymphocytes, against tumor cells are yielding promising results in cancer immunotherapy. Using two arms of immune system in the designing of engineered T cells expressing chimeric receptors with anti-HER2 nanobody (camelid single domain antibody) seems to be an effective strategy in the targeted cancer therapy.

**Materials and Methods:** HER2 specific nanobodies were used as a recognition site for constructing chimeric receptors NbHER2-HHlgG3-CD28-OX40-CD3 $\zeta$  (elongated) and NbHER2-HlgG3-CD28-OX40-CD3 $\zeta$  (short) on the membrane of T cells. Expression of chimeric receptors was evaluated by RT-PCR. Function of engineered T cells against cancer cells was assessed by the secretion of interleukin 2 and LDH cytotoxicity assay.

**Results:** Elongated chimeric receptors with nanobodies RR6 and RR16 that target juxtamembranal domain of HER2 antigen functioned better than elongated constructs containing nanobodies RR4 and RR10. In contrast, nanobodies RR4 and RR10 used in the short chimeric receptors showed substantial results.

**Conclusion:** Based on binding properties of nanobody, functional chimeric receptors can be designed and engineered T lymphocytes containing the mentioned receptors can be generated that substantially recognize and kill breast cancer cells.

**Keywords:** Engineered T cells, Chimeric antigen receptor, Nanobody, Epidermal growth factor 2