دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیستم– شماره ۱۰۶
شهریور ۱۳۹۲

مقایسه عملکرد چهار سلول T مهندسی‌شده با رسپتور کایمریک حاوی نانوبادی ضد HER2 در مواجهه با سلول‌های سرطانی سینه

نویسندگان: فاطمه رحیمی‌جمنانی[۱]، فاطمه رهبری‌زاده*[۲]، محمدعلی شکرگزار[۳]، فریدون مهبودی[٤]

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

٤. دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

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

دریافت: ۱۳۹۲/۴/۱
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۲/۷/۱۷
پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱۷

چکیده

مقدمه و هدف: به‌کارگیری سیستم ایمنی فرد بیمار و سلول‌های T (به‌عنوان بازوی قدرتمند سیستم ایمنی) در ازبین‌بردن سلول‌های سرطانی، ازجمله روش‌های درمانی امیدبخش محسوب‌می‌شود؛ در این راستا، سلول‌های T مهندسی‌شده بیان‌کننده رسپتورهای کایمریک دارای نانوبادی (آنتی‌بادی تک دومینی 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 کایمریک ζ3CD-OX40-CD28-HH_{IgG3}-Nb_{HER2} (طویل) و ζ3CD-OX40-CD28-H_{IgG3}-Nb_{HER2} (کوتاه) در سطح سلول‌های T استفاده‌شد. میزان بیان رسپتورها در غشای سلول‌های T ترانسفکته با روش RT-PCR بررسی‌شد. عملکرد سلول‌های T مهندسی‌شده در مواجهه با سلول‌های سرطانی سینه براساس میزان تولید اینترلوکین۲ و ازبین‌بردن سلول‌های سرطانی براساس میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز، ارزیابی‌شد.

نتایج: رسپتورهای کایمریک با ناحیه فضاساز طویل و قطعه کمک سیگنالی OX40 با نانوبادی‌های RR_6 و RR_{16} که ناحیه نزدیک غشایی HER2 را شناسایی‌می‌کردند، باعث عملکرد بهتر سلول‌های T در مواجهه با سلول‌های سرطانی سینه شدند. درحالی‌که نانوبادی‌های RR_4 و RR_{10} که ناحیه دیستال آنتی‌ژن HER2 را مورد هدف قرارمی‌دادند نتایجی بهتر را با سازه‌های کایمریک دارای ناحیه فضاساز کوتاه نشان‌دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به خصوصیت اتصالی نانوبادی، می‌توان رسپتورهای کایمریک کاراتری طراحی‌کرد که سلول‌های T مهندسی‌شده دارای این رسپتورها، قدرتی بالا در شناسایی سلول‌های سرطانی سینه و ازبین‌بردن آنها داشته‌باشند.

واژگان کلیدی: سلول‌های T مهندسی‌شده، رسپتور کایمریک، نانوبادی، فاکتور رشد اپیدرمالی۲

مقدمه

سرطان به‌عنوان دومین عامل منجر به مرگ در کشورهای توسعه‌یافته 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، ریشه‌کن‌کردن همیشگی سلول‌های سرطانی است با درنظرگرفتن این نکته که حداقل عوارض جانبی را روی بافت‌های سالم برجای‌گذارد (۲). روش‌های متداول دارویی، شامل شیمی‌درمانی و رادیوتراپی، اشکال‌هایی ازقبیل سمیت، مقاومت و عدم اختصاصیت دارند (۳). با افزایش یافته‌ها درخصوص عملکرد سلول ایمنی و بیولوژی تومور، هم‌اکنون مشخص شده‌است که یک سیستم ایمنی فعال، نقش حیاتی در پیشگیری و درمان سرطان ایفامی‌کند (۲). استفاده از آنتی‌بادی و لنفوسیت‌های T به‌عنوان دو بازوی مهم سیستم ایمنی در ازبین‌بردن سلول‌های توموری، توجه بسیاری را به خود معطوف‌کرده‌است (٤). به‌کارگیری ژن‌های کدکننده زنجیره‌های آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی آنتی‌ژن توموری در ساختارهایی با عنوان رسپتور کایمریک و بیان این رسپتورها در سطح سلول‌های T، به ایجاد سلول‌هایی با قدرت قابل‌ملاحظه منجرشد (۳ تا ٦). رسپتور کایمریک شامل قسمت خارج سلولی که به‌طور معمول، قطعه آنتی‌بادی scFv[1] (نواحی متغیر زنجیره‌های سبک و سنگین از آنتی‌بادی که با یک لینکر انعطاف‌پذیر به‌هم وصل شده‌اند) ضد آنتی‌ژن موردنظر است، نواحی فضاساز، درون غشایی و درون سیتوپلاسمی (اشتقاقی از اجزای سیگنالینگ رسپتور سلول T) است (٤، ۷ و ۸). برخلاف نتایج رضایت‌بخش اولیه، به دلیل پاسخ‌های ایمنی (منشأ موشی قطعه scFv) و ماندگاری اندک سلول‌های T مهندسی‌شده، این نتایج رضایت‌بخش در بدن بیماران سرطانی مشاهده‌نشد (۹ تا ۱۳)؛ در همین راستا از نانوبادی‌ها به‌عنوان کوچک‌ترین قطعه آنتی‌بادی شناخته‌شده و جایگزینی مناسب برای scFv در رسپتور کایمریک استفاده‌شد (١٤). نانوبادی‌ها به‌طور تقریبی ۲/۵ نانومتر قطر، ٤ نانومتر طول و وزنی در حدود ۱۵-۱۲ کیلو دالتون دارند و از یک ایمونوگلوبولین دارای قدرت اتصال (آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین)، مشتق می‌شوند (۱۵ تا ۱۷)؛ این قطعات تک‌دومینی، همولوژی بالایی با آنتی‌بادی‌های انسانی دارند و تابه‌حال به هیچ پاسخ ایمنی در بیماران منجرنشده‌اند؛ ازجمله دیگر خصوصیات منحصربه‌فرد نانوبادی‌ها که به برتری آنها نسبت‌به آنتی‌بادی‌های درمانی متداول منجرشده‌است، شامل توانایی شناسایی اپی‌توپ‌های مخفی و نامعمول، توانایی اتصال به حفرات یا جایگاه فعال پروتئین‌ها و انعطاف‌پذیری مناسب برای تبدیل به شکل دارویی است؛ درمجموع، خصوصیات بیوفیزیکی و دارویی مناسب نانوبادی‌ها همراه با قابلیت تبدیل آنها به پروتئین‌های درمانی چندکاره، باعث شده تا از آنها به‌عنوان نسلی جدید در درمان برپایه آنتی‌بادی یادشود (۱۸).

برای دسترسی بهتر رسپتور کایمریک در سطح سلول T مهندسی‌شده به آنتی‌ژن، پس از قطعه نانوبادی فضاسازهایی طراحی‌شده‌است (۸). برای ساخت این ناحیه، اغلب از دومین‌های لولا، CH2 وCH3 از آنتی‌بادی IgG1 استفاده‌می‌شود (۱۹)؛ در ادامه برای هرچه قوی‌تر-ساختن سلول‌های T مهندسی‌شده، دومین‌های کمک سیگنالی: CD28, OX40 و سیگنالی CD3ζ به قسمت درون‌سیتوپلاسمی رسپتور کایمریک نیز اضافه شدند (۲۰ تا ۲۲).

ازجمله تارگت‌های مهم در ایمونوتراپی هدفمند سرطان، آنتی‌ژن[2] است. HER2 از خانواده رسپتور، معیار رشد اپیدرمالی[3] (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 محسوب‌می‌شوند که بیان بیش از حد و فعالیت نامناسب آنها با توسعه و

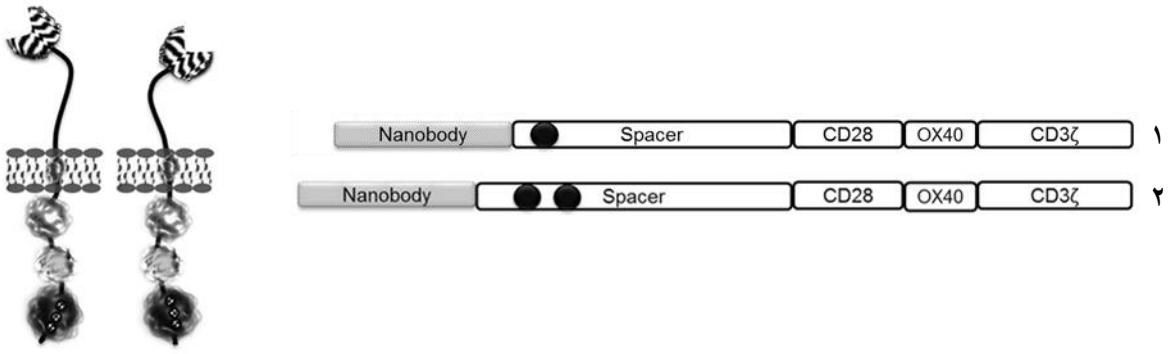
1-Single-chain variable fragment

2 - Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

3 - Epidermal Growth Factor Receptor (HER family)

شدت تعداد زیادی از سرطان‌ها مرتبط است. HER2 از آنتی‌ژن‌های مهم در سرطان به‌شمارمی‌آید زیراکه 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 مهندسی‌شده دارای رسپتور کایمریک با نانوبادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های MUC1 و TAG72، توانایی قابل‌ملاحظه‌ای را در تولید اینترلوکین۲ (IL2)، تکثیر و ازبین‌بردن سلول‌های سرطانی نشان‌داده-اند (۱٤ و ۲٤ تا ۲۷)؛ در همین راستا در این مطالعه برای اولین‌بار، پنلی از سلول‌های T مهندسی‌شده دارای رسپتور کایمریک با نانوبادی‌های با خصوصیات متفاوت برای شناسایی و دسترسی بهتر به آنتی‌ژن HER2 بر سطح سلول سرطانی سینه تولیدشد (۲۸). انتظارمی‌رود ویژگی اتصالی نانوبادی نقشی بسزا در طراحی رسپتور کایمریک داشته‌باشد؛ به همین دلیل، انواع نانوبادی‌های ضد آنتی‌ژن HER2 به‌عنوان ناحیه شناساگر رسپتورهای کایمریک دارای قطعات فضاساز با طول‌های متفاوت از دومین‌های لولا، CH2 و CH3 از آنتی‌بادی IgG به‌کاررفت (شکل ۱).



شکل ۱. نمای شماتیکی از رسپتورهای کایمریک Nb_{HER2}-H_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ (۱) و Nb_{HER2}-HH_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ (۲)

مواد و روش‌ها

درج قطعه ژنی نانوبادی در ناقل‌ها[1] (pCARs)

در مطالعه‌ای که همین گروه (رهبری‌زاده و همکاران) انجام‌داده‌اند، 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، شناسایی‌کرده، مورد هدف قرارمی‌دادند (۱۵ و ۲۸). دو نانوبادی RR_4 و RR_{10}، توانایی شناسایی اپی‌توپ‌های متفاوت از اپی‌توپ‌های مورد شناسایی آنتی‌بادی تراستوزومب را داشته‌اند. درحالی‌که دو نانوبادی RR_6 و RR_{16} برای اتصال به آنتی‌ژن HER2 با آنتی‌بادی تراستوزومب رقابت‌داشتند (۱۵ و ۲۸). از نانوبادی‌های به‌دست‌آمده به‌عنوان قطعه شناساگر در رسپتورهای کایمریک با نواحی فضاساز متفاوت برای تولید انواع سلول‌های T مهندسی‌شده استفاده‌شد (۲۵ و ۲۸)؛ بدین ترتیب که پلاسمیدهای pcDNA 3.1/Hygro(+) دارای ساختارهای Nb_{MUC1}-HH_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ (pCAR-HH) و Nb_{MUC1}-H_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ (pCAR-H) که پیش‌تر *خالقی* و همکاران ساخته‌بودند (۲۵)، در باکتری *E. coli* TG1 تکثیریافته، سپس با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (Macherey-Nagel)، تخلیص‌شدند. 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

1- Vectors

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 معکوس Vhbam (5′-CGCGGATCCAATGGCCGAKGTSGAGCT-3′) دارای سایت برش آنزیم محدودکننده Bam HI، تکثیرشدند. هضم آنزیمی پلاسمید و قطعات تکثیرشده نانوبادی‌ها، با آنزیم‌های *Not I* و *Bam HI* (Roche) صورت‌گرفت. اتصال قطعه ژنی نانوبادی به درون پلاسمید با استفاده از کیت لیگاز (Fermentas)، انجام و محصول نوترکیب به روش الکتروپوریشن به باکتری *E.coli* TG1 ، وارد شد.

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 شناسایی‌شدند. برای تأیید کلونینگ و درج قطعه ژنی نانوبادی، پلاسمید کلون‌های منتخب تخلیص‌شد و تحت هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودکننده *XhoI* و *Bam HI* (Fermentase) قرارگرفتند؛ پلاسمیدهای منتخب سپس برای توالی خوانی فرستاده‌شدند (جدول ۱).

جدول ۱. فهرست نانوبادی‌ها و سازه‌های کایمریکی که برای تولید سلول‌های T مهندسی‌شده در این مطالعه به‌کاررفتند.

قطعه ژنی نانوبادی	سازه‌ها (pCARs)
Nb_{RR4}	pNb_{RR4}-H_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ
	pNb_{RR4}-HH_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ
Nb_{RR6}	pNb_{RR6}- H_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ
	pNb_{RR6}-HH_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ
Nb_{RR10}	pNb_{RR10}- H_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ
	pNb_{RR10}-HH_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ
Nb_{RR16}	pNb_{RR16}- H_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ
	pNb_{RR16}-HH_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ

انتقال سازه‌های کایمریک 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[1]) (Gibco)، L- گلوتامین (۲ میلی‌مولار)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) (همگی از Invitrogen) رشددادەشد. برای انتقال سازه‌ها به سلول‌های Jurkat از روش ترانسفکشن با ماده لیپوفکتامین LTX (Invitrogen) به دلیل میزان ترانسفکشن بالا و سایتوتوکسیتی کمتر، استفاده‌شد. براساس پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده، در روز انجام ترانسفکشن، سلول‌های Jurkat ($۲/۵\times۱۰^{۶}$ در هر چاهک) به پلیت شش‌خانه انتقال‌یافت. 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 افزوده‌شد و انکوباسیون به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق صورت-گرفت؛ سپس کل مجموعه به چاهک‌های دارای سلول‌ها و محیط کشت افزوده شدند؛ پس از ٤ ساعت، محیط روی سلول‌ها با محیط RPMI-۱۶۴۰ کامل (سرم ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک و گلوتامین) جایگزین‌شد؛ همچنین فیتوهماگلوتینین (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) و

1- Fetal bovine serum (heat-inactivated)

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

انتخاب سلول‌های ترانسفکت‌شده با آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین

برای انتخاب سلول‌های ترانسفکت‌شده پایدار، 10^5 سلول در محیط RPMI-۱٦٤۰ دارای غلظت‌های متفاوت (٦۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از هیگرومایسین در پلیت ۲٤ خانه کشت‌داده‌شد و غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هیگرومایسین انتخاب‌شد. ٤۸ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌های ترانسفکته (10^5 سلول به‌ازای هر چاهک) در محیط کامل دارای هیگرومایسین (۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در پلیت ۲٤- خانه کشت‌داده‌شد؛ پس از دو هفته، سلول‌های ترانسفکته باقی‌مانده، انتخاب‌شدند.

بررسی بیان سازه‌های کایمریک در سلول‌های Jurkat

ارزیابی بیان سازه‌های کایمریک در سلول‌های Jurkat با استفاده از روش RT-PCR صورت‌گرفت. رسوب‌های سلولی حاوی 10^6 سلول Jurkat نرمال (کنترل) و 10^6 سلول Jurkat ترانسفکت‌شده با PBS استریل شستشوداده‌شده، تخلیص RNA با RNAX-Plus (سیناژن) صورت‌گرفت. با استفاده از کیت سنتز cDNA (سیناژن)، cDNA ساخته‌شد. برای انجام RT-PCR، از آغازگرهای P2 (5′-TGCTCTAGATGGCTGTTAGCGAGG-3′) و P3 (5′-CCGCTCGAGTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTG-3′) برای سنتز قطعه میان نواحی CD28-CD3ζ از رسپتورهای کایمریک استفاده‌شد. از آغازگرهای پیشرو (5′-AGTAGGCTTTGTGGTTGATG-3′) و معکوس (5′-CTGTCAGGAAAGGAGAAATC-3) برای تکثیر قطعه ۲۰۰ جفت بازی از ژن بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده‌شد.

ارزیابی عملکرد سلول‌های Jurkat در مواجهه با سلول‌های سرطانی سینه

تولید اینترلوکین دو

برای ارزیابی عملکرد سلول‌های Jurkat، از سلول‌های سرطانی سینه SKBR3[1] (HER2+) و HepG2[2] (HER2-) استفاده‌شد. سلول‌های SKBR3 و HepG2 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط DMEM حاوی سرم ۱۰ درصد (FBS)، L- گلوتامین (۲ میلی‌مولار)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) کشت‌داده‌شدند. پس از رسیدن تراکم سلول‌ها به ۸۰ تا ۹۰ درصد، سلول‌های SKBR3 و HepG2 تریپسینه‌شدند و با لام نئوبار مورد شمارش قرارگرفتند. 10^4 سلول در چاهک پلیت ۹٦ خانه کشت‌داده‌شد. برای تحریک اولیه، سلول‌های Jurkat در ابتدا با آنتی‌ژن HER2 تثبیت‌شده در چاهک پلیت شش خانه انکوبه‌شدند؛ پس از ۲٤ ساعت، انکوباسیون، سلول‌های Jurkat پیش‌تحریک‌شده به‌مدت ٤۸ ساعت در مواجهه با سلول‌های سرطانی HER2+ و HER2- در پلیت ۹٦ خانه قرارگرفتند (به‌نسبت ۱ سلول سرطانی/۱۰ سلول Jurkat). مایع رویی سلول‌ها را برداشته، میزان IL2 با کیت Quantikine® (R&D systems) براساس دستورالعمل شرکت سازنده بررسی‌شد. به‌طور خلاصه، محلول‌های استاندارد از IL2 (از ۰ تا ۲ هزار پیکوگرم در میلی‌لیتر) ساخته‌شد. ۱۰۰ میکرولیتر از استاندارد، مایع رویی سلول HER2 مثبت و منفی به چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه (پوشش‌داده‌شده با آنتی‌بادی اختصاصی IL2) افزوده و انکوباسیون به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انجام‌شد؛ پس از شستشو، ۲۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی پلی کلونال کنژوگه (اختصاصی IL2) افزوده شد و پس از ۲ ساعت انکوباسیون، شستشو انجام‌شد. ۲۰۰ میکرولیتر سوبسترا افزوده و پس از توقف واکنش با هیدروکلریک اسید، میزان جذب نوری (OD[3])

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

در طول موج ٤٥٠ نانومتر توسط دستگاه سنجش الایزا (ELISA-Reader) (آمریکا,STAT FAX 2100) خوانده‌شد.

ازبین‌بردن سلول‌های سرطانی سینه

آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آنزیمی پایدار است که در همه انواع سلول‌ها وجوددارد 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 سایتوتوکسیسیتی به‌واسطه سلول‌های T براساس میزان نشت LDH به محیط کشت سنجیده‌شد؛ بدین ترتیب که به‌طور جداگانه سلول‌های Jurkat نرمال و ترانسفکته (۵×۱۰^{۵}) با سلول SKBR3 ($۱۰^{٤}$) به‌مدت ۱۲ ساعت در پلیت ۹٦ خانه انکوبه‌شد. میزان ترشح LDH در مایع رویی با کیت تجاری پارس آزمون و براساس دستورالعمل شرکت سازنده بررسی‌شد. به‌طور خلاصه، محلول Working با افزودن یک حجم از کوآنزیم به چهار حجم از سوبسترا تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه اضافه شد؛ پس از انکوباسیون به‌مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی سلول‌ها به آنها اضافه شد. هر ۱ دقیقه (طی ۳ دقیقه) میزان OD در طول موج ۳٤۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA Reader (آمریکا ,Bio-Tek Instrument) خوانده‌شد. فعالیت آنزیم LDH (واحد بر لیتر) براساس فرمول: ۱٦,۲۳۸ × میانگین سه جذب، محاسبه‌شد که نشان‌دهنده میزان آسیب به سلول‌ها و نشت آنزیم LDH است.

آزمون‌های آماری

گروه‌های مختلف آزمایش در مطالعه با استفاده از آزمون Kruskal–Wallis مقایسه‌شدند. مقایسه میان‌گروهی براساس آزمون آماری Mann–Whitney انجام‌گرفت. p-value <۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار درنظرگرفته‌شد.

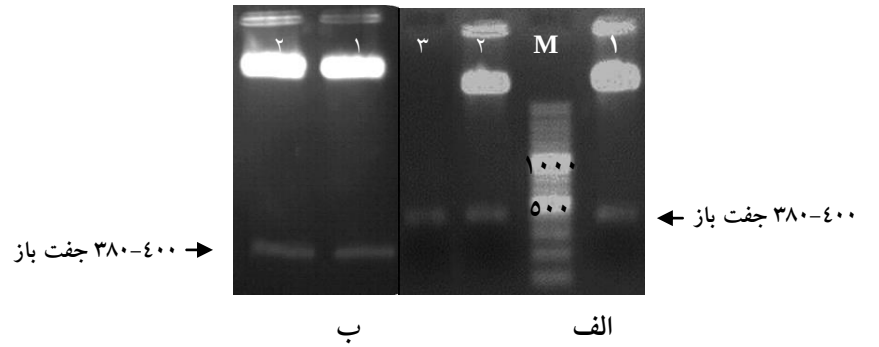
نتایج

درج قطعه ژنی نانوبادی در سازه‌های کایمریک

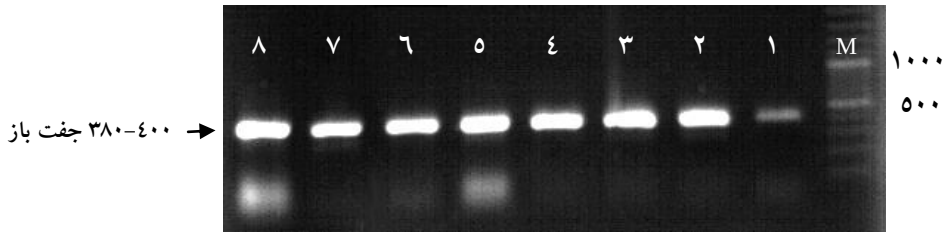
پلاسمیدهای دارای اجزای رسپتور کایمریک Nb_{MUC1}-H_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ و Nb_{MUC1}-HH_{IgG3}-CD28-OX40-CD3ζ تخلیص و روی ژل آگارز ۱ درصد ران شد. پلاسمیدهای تخلیص‌شده که دارای قطعه ژنی نانوبادی MUC1 بودند تحت هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Not I* و *Bam HI* قرارگرفتند؛ پس از ران‌کردن روی ژل ۱ درصد، قطعه ژنی ۳۸۰ تا ٤۰۰ جفت بازی مشاهده‌شد (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}) صورت‌گرفت. برای تأیید ساب کلونینگ قطعه ژنی نانوبادی در ناقل‌ها، کلونی-PCR با آغازگرهای Vhfor2 و Vhbam انجام‌شد که به مشاهده قطعه ژنی نانوبادی ۳۸۰ تا ٤۰۰ جفت بازی روی ژل آگارز ۱ درصد منجرشد (شکل ۳)؛ همچنین هضم آنزیمی ناقل‌های دارای رسپتورهای کایمریک به ایجاد یک قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی دارای قطعه نانوبادی (به‌طور تقریبی ۳۸۰ جفت باز) و قطعه فضاساز با طول‌های ۷۵۰ جفت باز (CAR-HH) و ۷۰۰ جفت باز (CAR-H) از آنتی‌بادی IgG3 روی ژل آگارز ۱ درصد منجرشد (شکل ٤).

ارزیابی بیان سازه‌ها در سلول‌های Jurkat

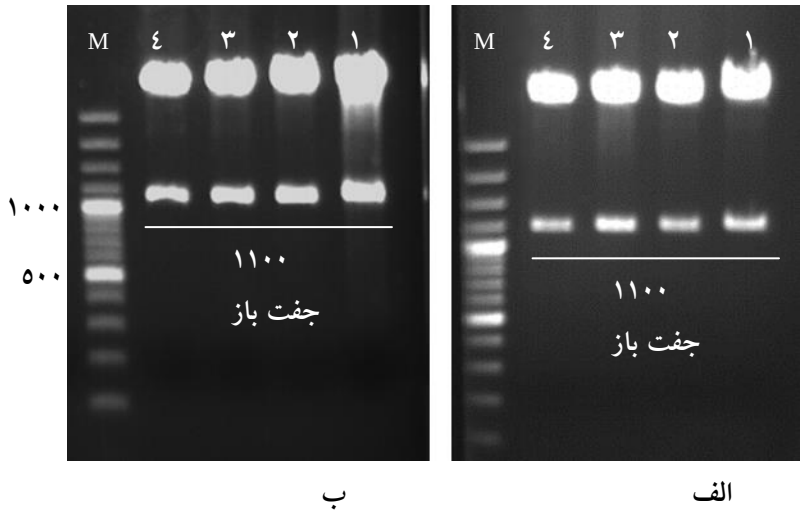
بیان سازه‌ها در سلول‌های Jurkat ترانسفکته با تخلیص RNA و تکثیر رسپتورهای کایمریک تأییدشد. طی روند RT-PCR با استفاده از آغازگرهای P2 و P3 ناحیه میان CD28 و CD3ζ از رسپتور تکثیرشد که به ایجاد قطعات با طول تقریبی ۷۰۰ جفت باز انجامید (شکل ۵).



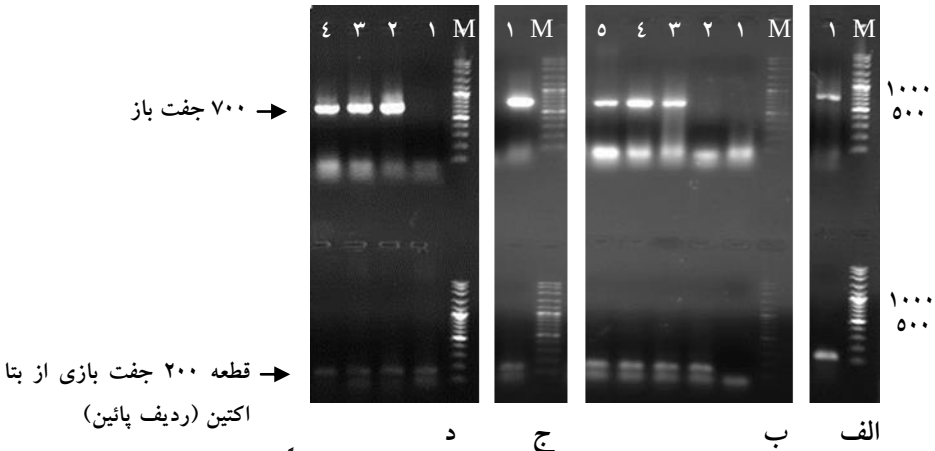
شکل ۲. **نتایج الکترفورز هضم آنزیمی پلاسمیدهای تخلیص‌شده دارای قطعه ژنی نانوبادی MUC1 با آنزیم‌های *Not I* و *Bam HI* و مشاهده قطعه ژنی ۴۰۰ - ۳۸۰ جفت بازی؛ الف. pCAR-HH (۱)، مارکر (M)، pCAR-H (۲) و نانوبادی RR_4 (۳) و ب. pCAR-HH (۱) و pCAR-H (۲).**



شکل ۳. **نتایج الکترفورز کلونی–PCR از کلون های دارای سازه کایمریک 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 به‌ترتیب دارای نانوبادی‌های RR_4 (۱)، RR_6 (۲)، RR_{10} (۳)، RR_{16} (٤) و ناقل دارای سازه CAR-H به‌ترتیب دارای نانوبادی‌های RR_4 (۵)، RR_6 (٦)، RR_{10} (۷) و RR_{16} (۸)**



شکل ٤. **نتایج الکتروفورز هضم آنزیمی ناقل‌های دارای سازه‌های کایمریک با آنزیم‌های *XhoI* و *Bam HI* و مشاهده قطعه ۱۱۰۰ جفت بازی؛ الف. ناقل pCAR-HH به‌ترتیب دارای نانوبادی‌های RR_4 (۱)، RR_6 (۲)، RR_{10} (۳)، RR_{16} (٤) و مارکر (M) و ب. ناقل pCAR-H به‌ترتیب دارای نانوبادی‌های RR_4 (۱)، RR_6 (۲)، RR_{10} (۳) و RR_{16} (٤) و مارکر (M)**



شکل ۵. نتایج الکتروفورز حاصل از RT-PCR ناقل‌های دارای سازه‌های کایمریک 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 کایمریک CAR-HH با نانوبادی RR_{16} (۱)؛ ب. مارکر (M)، کنترل منفی (۱)، سلول Jurkat نرمال (۲) و سلول Jurkat ترانسفکته دارای رسپتور کایمریک CAR-HH به‌ترتیب با نانوبادی‌های RR_4 (۳)، RR_6 (٤) و RR_{10} (۵)؛ ج. مارکر (M) و سلول Jurkat ترانسفکته دارای رسپتور کایمریک CAR-H با نانوبادی RR_4 (۱) و د. مارکر (M)، سلول Jurkat نرمال (۱) و سلول Jurkat ترانسفکته دارای رسپتور کایمریک CAR-H به‌ترتیب با نانوبادی‌های RR_6 (۲) ، RR_{10} (۳) و RR_{16} (٤)

نتایج حاصل از عملکرد سلول‌های Jurkat ترانسفکته در مواجهه با سلول‌های سرطانی سینه

سلول‌های Jurkat ترانسفکته دارای رسپتور کایمریک در مواجهه با سلول SKBR3، میزان IL2 بیشتری در مقایسه با سلول‌های Jurkat نرمال فاقد و دارای ناقل pcDNA3.1/HYGRO(+) تولیدکردند. سلول‌های ترانسفکته دارای رسپتور کایمریک ضد آنتی‌ژن HER2 در مواجهه با سلول‌های سرطانی فاقد آنتی‌ژن HER2 (HepG2) فعالیتی نشان‌ندادند. نتایج نشان‌داد که عملکرد سلول‌های ترانسفکته به شناسایی آنتی‌ژن توسط نانوبادی، وابسته است. در مطالعه پیشین، مشخص شد که نانوبادی‌های RR_4 و RR_6 (M-1 $۵/٤\times۱۰^{۱۲}$ و $۷/۵\times۱۰^{۱۲}$) در مقایسه با نانوبادی‌های RR_{10} و RR_{16} (M-1 $۰/۲\times۱۰^{۱۰}$ و $۰/٦\times۱۰^{۱۰}$) 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 کایمریک در تولید IL2 و سایتوتوکسیسیتی منجرشد. در میان رسپتورهای کایمریک به‌کاررفته در این مطالعه، سلول‌های دارای رسپتور کایمریک CAR-HH با نانوبادی‌های RR_6 و RR_{16}، میزان IL2 بیشتری (۲۰±٦٦٦ و ۱۵±٥٤٠ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) نسبت‌به سلول‌های دارای رسپتور کایمریک CAR-HH با نانوبادی‌های RR_4 و RR_{10} (۲۰±۵۷۰ و ۱۱±٤٦۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) تولیدکردند (جدول ۲). همان‌طورکه جدول ۲ نشان‌می‌دهد، سلول‌های ترانسفکته دارای رسپتور کایمریک CAR-H با نانوبادی‌های RR_4 و RR_{10} (۲۲±٦۳۰ و ۲۵±۵۰۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) بهتر از سلول‌های ترانسفکته دارای رسپتور کایمریک CAR-H با نانوبادی‌های RR_6 و RR_{16} (۱٦±۵۸۵ و ۱۹±۵۰۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) در تولید IL2 عمل‌کردند؛ درمجموع، عملکرد سلول‌های Jurkat ترانسفکته دارای رسپتور کایمریک در ازبین‌بردن سلول‌های SKBR3 از سلول‌های Jurkat نرمال (به‌عنوان کنترل) بهتر بوده‌است (جدول ۲). سلول‌های دارای رسپتورهای کایمریک CAR-HH با نانوبادی‌های RR_6 و RR_{16} توانستند به‌ترتیب به میزان ۵۸ درصد و ٤۹ درصد از سلول‌های SKBR3 را ازبین‌ببرند؛ همچنین سلول‌های دارای رسپتورهای کایمریک CAR-H با نانوبادی‌های RR_4 و RR_{10} نیز نتایجی به‌طور تقریبی مشابه با گروه پیشین را نشان‌دادند (جدول ۲).

جدول ۲. میزان تولید اینترلوکین۲ و سایتوتوکسیسیتی سلول‌های ژورکات دارای رسپتور کایمریک و نرمال در مواجهه با سلول‌های $HER2^+$ و $HER2^-$.

تیمار	$HER2^+$ (سلول SKBR3)		$HER2^-$ (سلول HepG2)	
	(pg/ml) IL2	درصد سایتوتوکسیسیتی	(pg/ml) IL2	درصد سایتوتوکسیسیتی
سلول Jurkat نرمال (کنترل منفی)	۵۰±۵	٪۶	۴۵±۴	٪۸
سلول Jurkat ترانسفکت‌شده با pcDNA3.1 (کنترل منفی)	۵۲±۶	٪۸	۳۵±۷	٪۷
$pCAR_{RR4}$-H	۶۳۰±۲۲	٪۵۶	۸۰±۴	٪۱۴
$pCAR_{RR4}$-HH	۵۷۰±۲۰	٪۵۰	۶۷±۶	٪۱۲
$pCAR_{RR6}$-H	۵۸۵±۱۶	٪۴۹	۶۵±۵	٪۱۳
$pCAR_{RR6}$-HH	۶۶۶±۲۰	٪۵۸	۸۸±۷	٪۱۰
$pCAR_{RR10}$-H	۵۰۵±۲۵	٪۴۸	۳۵±۲	٪۴
$pCAR_{RR10}$-HH	۴۶۵±۱۱	٪۴۱	۳۲±۴	٪۵
$pCAR_{RR16}$-H	۵۰۰±۱۹	٪۴۴	۵۵±۳	٪۴
$pCAR_{RR16}$-HH	۵۴۰±۱۵	٪۴۹	۵۰±۴	٪۶

براساس آزمون آماری Mann–Whitney، تفاوتی معنی‌دار در تولید اینترلوکین۲ و میزان سایتوتوکسیسیتی میان هریک از سلول‌های ژورکات دارای رسپتور کایمریک با سلول ژورکات کنترل وجوددارد (p-value<۰/۰۵).

بحث

موفقیت ایمونوتراپی سرطان به توانایی عناصر درمانی در شناسایی اختصاصی سلول‌های سرطانی و افیننیتی بالا به آنتی‌ژن‌های توموری، بستگی‌دارد (۲۹)؛ در این راستا به‌کارگیری قدرت هدف‌گیری و سایتوتوکسیسیتی بازوی سلولی سیستم ایمنی در ازبین‌بردن سلول‌های سرطانی، باعث پیشرفتی چشمگیر در درمان سرطان شده‌است (٤). انتقال اکتسابی سلول‌های T به دلیل نفوذ مؤثر آنها به ناحیه توموری، جایگزینی در ناحیه توموری و توسعه سلول‌های T حافظه، بیشترین موفقیت را نشان‌داده‌است (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» رنج‌می‌برد (۳۱)؛ برای برطرف‌کردن این مشکلات، راهکار رسپتور کایمریک با به‌کارگیری دو بازوی هومورال و سلولی سیستم ایمنی مطرح شد (٤). نسل‌هایی متعدد از رسپتورهای کایمریک توسط گروه‌های مختلف، طراحی و بررسی‌شدند تا درنهایت، نسل سوم دارای قطعات سیگنالینگ CD3ζ، کمک سیگنالی CD28 و OX40 نتایجی بهتر را از لحاظ ماندگاری لنفوسیت‌ها در بدن فرد سرطانی و قدرت ازبین‌بردن سلول‌های سرطانی نشان‌داد (۲۲)؛ در همین راستا *رهبری‌زاده* و همکاران برای بررسی عملکرد سلول‌های T مهندسی‌شده، انواعی مختلف از نسل‌های دوم (دارای قطعات سیگنالینگ CD3ζ و کمک سیگنالی CD28) و سوم از رسپتورهای کایمریک را با نانوبادی به‌عنوان قطعه شناسایی‌کننده آنتی‌ژن‌های MUC1 و TAG72 (به‌ترتیب روی سلول‌های سینه و روده)، طراحی‌کردند. نتایج حاصل از مطالعات متعدد، توسط این گروه، نشان‌داد که نسل سوم، باعث تولید بیشتر IL2 و تکثیر بالای سلول‌های Jurkat

مهندسی‌شده می‌شود؛ در ادامه، برای بررسی نقش اتصالی نانوبادی به آنتی‌ژن HER2 در عملکرد سلول مهندسی‌شده دارای رسپتور کایمریک، انواع رسپتورهای کایمریک نسل سوم با طول‌های فضاساز و نانوبادی‌های متفاوت طراحی‌شدند.

براساس مطالعه انجام‌شده توسط همین گروه، دو نانوبادی RR_4 و RR_{10} در رقابت با آنتی‌بادی تراستوزومب تغییری در اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن HER2 ایجادنمی‌کردند درحالی‌که دو نانوبادی RR_6 و RR_{16} در رقابت با آنتی‌بادی تراستوزومب باعث جداشدن آنتی‌بادی از آنتی‌ژن HER2 می‌شدند. اپی‌توپ مورد شناسایی آنتی‌بادی تراستوزومب، روی دومین IV از آنتی‌ژن HER2 (اسیدآمینه ٦٢٧-٥٢٩) و نزدیک به غشا قراردارد (١٥). همان‌طورکه نتایج نشان‌دادند رسپتورهای کایمریک CAR-HH (با ناحیه فضاساز 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 فضاساز در رسپتورهای کایمریک وجوددارد (٢٠، ٢٥ و ٣٢تا ٣٤). در تحقیقی که *خالقی* و همکاران، انجام‌دادند، نشان‌داده‌شد که دو تکرار از ناحیه لولا نه‌تنها باعث انعطاف‌پذیری بهتر رسپتورها شده بلکه با همودایمریزاسون رسپتورها، آویدیتی آنها برای آنتی‌ژن MUC1، بیشتر شده‌است (٢٥)؛ همچنین گروه *گست* و همکاران گزارش‌دادند که برای فعال‌سازی مؤثر و عملکرد بهتر، به فاصله مناسب میان سلول‌های T و آنتی‌ژن هدف نیاز است (٣٣). در مطالعه‌ای دیگر، *ویلکی* و همکاران، پنلی از رسپتورهای کایمریک با ناحیه فضاساز با طول‌های متفاوت ضد آنتی‌ژن MUC1 طراحی‌کردند (٢٠)؛ این مطالعه نشان‌داد که برای دسترسی به نواحی پروگزیمال از آنتی‌ژن هدف، به ناحیه لولای طویل و انعطاف‌پذیر برای غلبه بر ممانعت فضایی ناشی از تراکم رسپتورها و آنتی‌ژن‌های متعدد موجود در سطح سلول‌های سرطانی نیاز است (٢٠)؛ همگام با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات یادشده، در این تحقیق نیز سلول‌های دارای رسپتور کایمریک CAR-H با نانوبادی‌های RR_4 و RR_{10}، عملکردی مؤثرتر داشتند. می‌توان نتیجه‌گرفت نانوبادی‌های یادشده به نواحی دیستال از آنتی‌ژن HER2 متصل می‌شوند و به ناحیه فضاساز طویل نیازی‌ندارند.

در این مطالعه از سلول‌های Jurkat به‌عنوان مدلی برای بررسی عملکرد رسپتورهای کایمریک ضد آنتی‌ژن سرطانی HER2 استفاده‌شد. نتایج نشان‌دادند که سلول‌های Jurkat مهندسی‌شده با رسپتورهای کایمریک در مواجهه با سلول‌های سرطانی سینه، توانایی بالایی در تولید IL2 و ازبین‌بردن سلول‌های سرطانی دارند (٣٥). سلول‌های Jurkat از نوع لنفوسیت‌های T CD4+ هستند. در مطالعه‌ای که *هومباخ* و همکاران انجام‌دادند، نتایج نشان‌دادند که لنفوسیت‌های T CD4+ نه‌تنها از طریق تولید IL2، محیطی مناسب را برای سلول‌های T سایتوتوکسیک به‌منظور ازبین‌بردن سلول‌های سرطانی فراهم‌می‌کنند بلکه می‌توانند از طریق مسیر گرانزیم/پرفورین هم به‌طور مستقیم باعث مرگ سلول‌های سرطانی شوند (٢٢ و ٣٦تا ٣٨).

سلول‌های سرطانی برای فرار از شناسایی توسط سلول‌های سیستم ایمنی (ضد اپی‌توپی خاص از آنتی‌ژن سرطانی)، آنتی‌ژن‌هایی را بیان‌می‌کنند که فاقد اپی‌توپ مورد نظر هستند (٣٩). استفاده از سلول‌های T ضد اپی‌توپی خاص، وضعیتی رقابتی و اشباع‌شده به‌وجود می‌آورد؛ درنتیجه به دلیل اشباع‌شدن اپی‌توپ‌ها توسط سلول‌های T، سلول‌هایی که به اپی‌توپ‌های مورد نظر دسترسی‌ندارند در خون سرگردان می‌مانند و به آنتی‌ژن مورد نظر روی سایر سلول‌ها (سلول‌های سالم) متصل می‌شوند و عوارض جانبی ایجادمی‌کنند (١١). در دو مطالعه مختلف، تزریق مقادیر زیاد سلول‌های T مهندسی‌شده با رسپتورهای کایمریک دارای scFv ضد آنتی‌ژن‌های HER2 (١١) و CD19 (١٠) به مرگ بیماران منجرشد؛ دلیل دو مرگ یادشده، اتصال سلول‌های

مهندسی‌شده به آنتی‌ژن مورد نظر بر سلول‌های طبیعی و تولید میزان زیاد سایتوکاین‌ها (طوفان سایتوکاینی) در بیماران اعلام‌شد؛ ازجمله راه‌حل‌های پیشنهادی برای هرچه اختصاصی‌کردن این فرایند (T سل‌درمانی)، مهندسی سلول‌های T فرد بیمار با رسپتورهای کایمریک 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 نشان‌نمی‌دهند. به‌طوری‌که هنگام تزریق سلول‌های مهندسی‌شده به بیمار (اتولوگ)، به‌جای استفاده از 10^9 سلول T مهندسی‌شده با رسپتور کایمریک دارای نانوبادی RR_4 ضد اپی‌توپی خاص، از چهار سری سلول T مهندسی‌شده با رسپتورهای کایمریک دارای نانوبادی‌های RR_4، RR_6، RR_{10} و RR_{16} که هریک ناحیه‌ای خاص را شناسایی‌می‌کنند (به تعداد 10^3 سلول از هر سری)، استفاده‌کرد؛ بدین ترتیب، اکثریت قابل‌توجه سلول‌ها به اپی‌توپ‌های مورد نظر خود دسترسی‌خواهندداشت و سلول T آزادی وجودنخواهدداشت که به سلول طبیعی متصل شود و عارضه‌ای ایجادکند.

درانتها برای عملکرد هرچه بهتر سلول‌های T مهندسی‌شده، باید به نقش نانوبادی در شناسایی و اتصال به آنتی‌ژن روی سلول‌های سرطانی نیز توجه‌شود تا براساس آن، بهترین طراحی از رسپتور کایمریک صورت‌گیرد. همان‌طوری‌که 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 مهندسی‌شده شدند. برای درمانی هرچه هدفمندتر پیشنهادمی‌شود مجموعه‌ای از سلول‌های مهندسی‌شده دارای انواع رسپتورهای کایمریک طراحی‌شده ضد آنتی‌ژن‌های HER2 و MUC1 تولیدشود تا سلول‌ها قادر باشند به‌طور هم‌زمان هر دو آنتی‌ژن یادشده را در سلول‌های سرطانی شناسایی‌کرده، ازبین‌ببرند؛ ضمن اینکه برای بررسی بیشتر، رسپتورهای کایمریک طراحی‌شده در موش‌های سرطانی‌شده نیز ارزیابی و سپس در سلول‌های T برگرفته از فرد بیمار بیان‌شوند و کارایی آنها مورد سنجش قرارگیرد.

تشکر و قدردانی

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

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.

14. Iri-Sofla FJ, Rahbarizadeh F, Ahmadvand D, Rasaee 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, Rasaee 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, Rasaee 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 Twenteeth Year, No.106
August, September 2013

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

Fatemeh Rahimi Jamnani[1], Fatemeh Rahbarizadeh[2*], Fereidoun Mahboudi[1], Mohammad Ali Shokrgozar[3]

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-HHIgG3-CD28-OX40-CD3ζ (elongated) and NbHER2-HIgG3-CD28-OX40-CD3ζ (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

Received: 2013/6/21
Last revised: 2013/10/9
Accepted: 2013/10/9