کاربرد نانوبادی‌ها در تحقیق، تشخیص و درمان

فاطمه وحدت لاسمی

دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقدمه

ساختار کلی آنتی‌بادی‌های ایمونوگلوبین G از دو زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی سنگین یکسان و دو زنجیرهٔ سبک یکسان تشکیل شده است که در پستانداران بشدت محافظت شده است. زنجیرهٔ سبک این ایمونوگلوبین‌ها از دو دومین و زنجیرهٔ سنگین از چهار دومین تشکیل شده است. توالی N- ترمینال دومین زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی سبک و سنگین بین آنتی‌بادی‌ها اختلاف دارد که به‌عنوان دومین‌های متغیر V_H و V_L معرفی شده‌اند. جفت دومین‌های V_H-V_L قطعات متغیر fv را تشکیل می‌دهند که آنتی‌ژن را شناسایی می‌کنند. سایر توالی‌های H و L شدیداً حفاظت شده‌اند که به ترتیب با CH و CL مشخص می‌شوند.

در سرم شترسانان علاوه بر آنتی‌بادی‌های هتروتترامریک معمول، آنتی‌بادی‌های IgG خاص وجود دارد که به‌عنوان آنتی‌بادی‌های زنجیرهٔ سنگین (HCAbs) شناخته شده‌اند که فاقد زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی سبک و اولین دومین ثابت CH_1 هستند. در ناحیهٔ N- ترمینال زنجیرهٔ سنگینشان یک دومین متغیر اختصاصی دارند که به‌عنوان VHH نام‌گذاری شده‌اند. VHH در یک HCAb ازلحاظ ساختاری و عملکردی هم‌ارز قطعهٔ fab آنتی‌بادی‌های معمول است. این دومین منفرد اختصاصی با ابعادی در حد نانومتر به‌عنوان نانوبادی یا آنتی‌بادی تک‌دومین (SdAb) هم شناخته می‌شود.

مقایسه ساختار دومین VH آنتی‌بادی‌های معمولی و VHH آنتی‌بادی‌های زنجیرهٔ سنگین

1- هر دو دارای توالی‌های متغیر (CDR) هستند که در بین نواحی حفاظت‌شده‌تر (FR) قرار دارند.
2- در VH ناحیه حفاظت‌شده FR_2 در موقعیت‌های 37، 44، 45 و 47 از اسیدآمینه‌های هیدروفوب تشکیل شده است که این اسیدآمینه‌ها با نواحی هیدوروفوب زنجیرهٔ سنگین میانکنش می‌دهند.
3- در VHH، ناحیهٔ FR_2 در موقعیت‌های 37، 44، 45 و 47 از اسیدآمینه‌های هیدورفولیک تشکیل شده است به همین دلیل قادر به اتصال به زنجیرهٔ سبک نیستند.
4- نواحی CDR_1 و CDR_3 در VHH بزرگ‌تر از VH هستند که توسط باند دی‌سولفیدی به یکدیگر متصل شده‌اند.

ویژگی‌های نانوبادی

نانوبادی با اندازهٔ کوچک (KD15) یک جزء شدیداً محلول و پایدار است. طبیعت تک‌دومینی و ویژگی مونومریک آن‌ها امکان کلونینگ آسان، انتخاب سریع از کتابخانه‌های VHH و طراحی ساده قطعات چندظرفیتی و پرتوان متصل‌شونده به آنتی‌ژن را فراهم می‌کند، همچنین VHHها ارتباط با اپی‌توپ‌هایی با ساختار فرورفته (مثل جایگاه فعال آنزیم) را ترجیح می‌دهند و می‌توانند مناطقی را که غیرقابل‌دسترس یا مخفی برای آنتی‌بادی‌های معمول هستند را شناسایی کنند.

ساختار نانوبادی

VHH در ساختمان خود حاوی دو صفحهٔ B است که 4 رشتهٔ بتا در عقب و 5 رشتهٔ B در قسمت جلو قرار گرفته‌اند

مراحل تولید نانوبادی با فناوری نمایش فاژی

1- استخراج و تکثیر ژن زنجیره‌های سنگین
2- کلون‌سازی ژن آنتی‌بادی در وکتور فاژی
3- جداسازی فاژهای بیان‌کنندهٔ مناسب (مرحلهٔ selection و panning)
4- تعیین خصوصیات آنتی‌بادی تولیدشده در مرحلهٔ غربالگری (screening)

مقایسهٔ آنتی‌بادی و نانوبادی

1- آنتی‌بادی‌ها در PH بالا دناتوره می‌شوند، درحالی‌که نانوبادی‌ها مقاوم به دما و PH هستند.

2- آنتی‌بادی‌ها ازنظر سایز بزرگ هستند درحالی‌که نانوبادی‌ها سایز کوچکی دارند.

3- آنتی‌بادی‌ها از 2 زنجیرهٔ سنگین یکسان و 2 زنجیرهٔ سبک یکسان تشکیل شده‌اند درحالی‌که نانوبادی‌ها فاقد زنجیرهٔ سبک هستند.

4-آنتی‌بادی‌ها هیدروفوب هستند درحالی‌که نانوبادی‌ها هیدروفیل‌اند (خاصیت هیدروفیل بودن نانوبادی‌ها در مقاومت به گرما نقش دارد.)

کاربرد نانوبادی‌ها در تحقیق

1- استفاده از VHH متصل به GFP به‌عنوان کروموبادی‌ها

پیشرفتی که در مورد VHHها در زمینهٔ تحقیق صورت گرفته است به وجود آمدن کروموبادی‌ها می‌باشد. کروموبادی‌ها از یک VHH که به پروتئین فلورسنت سبز فیوز شده، تشکیل شده‌اند. کروموبادی‌ها بعد از اتصال به آنتی‌ژن اختصاصی‌شان به‌عنوان ردیاب برای تعیین موقعیت هدف‌های داخل سلولی به کار می‌روند.

کروموبادی‌ها همچنین در میکروسکوپ‌های با رزولوشن خیلی بالا برای مشخص کردن موقعیت پروتئین‌ها بکار می‌روند؛ به این علت که وقتی آنتی‌بادی‌های با طول کامل به رنگ‌های اورگانیک متصل می‌شوند به خاطر فاصلهٔ بین رنگ اورگانیک و محل واقعی پروتئین به‌خوبی قابل‌تشخیص نیست اما VHHها به خاطر اندازه کوچکشان وقتی رنگ به آن‌ها متصل می‌شود محل دقیق پروتئین‌ها را به‌خوبی مشخص می‌کنند.

2- استفاده از VHHها برای تخلیص پروتئین

VHHها به خاطر پایداری، طبیعت مونومریک و ثابت ماندن بر روی بسترهای جامد به‌عنوان لیگاندهایی برای تخلیص پروتئین بکار می‌روند. VHHهای ضد IgG انسانی برای تلخیص IgG از خون استفاده می‌شوند، همچنین در تکنولوژی Capture – select C-tag یک tag پپتیدی جدید که فقط از چهار اسیدآمینه تشکیل شده است را به قسمت C- ترمینال پروتئین موردنظر اضافه می‌کنند و از VHHهای ضد C-tag برای تلخیص مؤثر پروتئین استفاده می‌کنند. این موضوع نشان داد که برخلاف آنچه که انتظار می‌رود که VHHها اپی‌توپ‌هایی با فرورفتگی را ترجیح می‌دهند، می‌توانند بر ضد های پپتیدی (خطی) کوچک هم ساخته شوند.

3- استفاده از VHHها برای رسوب‌گذاری ایمنی

مگنتوزوم‌ها که اورگانل‌های غشادار در باکتری‌های مگنتوتاکنیک هستند حاوی ذرات مگنتیک می‌باشند که در میدان مغناطیسی می‌توانند جهت‌گیری کنند. با بیان VHH همراه با مگنتوزوم، مگنتوزوم‌های پوشیده با VHH می‌توانند به‌عنوان عوامل capturing در یک میدان مغناطیسی باعث رسوب‌گذاری ایمنی و جداشدن پروتئین موردنظر شوند.

4- استفاده از VHH به‌عنوان اینتربادی‌ها برای غیرفعال‌سازی پروتئین هدف

VHHها مولکول‌های پایداری هستند که اغلب به جایگاه کاتالیتیک متصل می‌شوند، آن‌ها همچنین در شرایط in vivo به‌عنوان اینتربادی‌ها استفاده می‌شوند که با شکل و عمل پروتئین مداخله می‌کنند. مداخله با عمل پروتئین از طریق ایجاد یک VHH مهاری بر ضد آنزیم شاخه‌ساز در نشاسته در سیب‌زمینی ثابت شده است. با وارد کردن این VHHها به پلاستید سیب‌زمینی مقدار آمیلوز در عصاره به‌واسطه مهار اختصاصی آنزیم توسط VHH افزایش یافت. اینترابادی‌ها همچنین می‌توانند به‌عنوان deGradeFP با شکل پروتئین مداخله کنند. در deGradeFP یک VHHبه دومین F-boxآنزیم یوبیکوئیتین لیگاز فیوز می‌شود. در شرایط in vivo در اثر اتصال به آنتی‌ژن، آنتی‌ژن پلی‌یوبیکوئیتینه شده و برای تخریب وارد پروتئازوم می‌شود.

5- استفاده از VHH به‌عنوان فاکتور X

تعیین ساختارهای پروتئینی از طریق کریستالوگرافی اشعهٔ برای پروتئین‌های غشایی و کمپلکس‌های پروتئینی بزرگ سخت است، برای این منظور چاپرون‌های کریستالیزه‌کننده، به شکل آنتی‌بادی و قطعات آنتی‌بادی مانند VHH به وجود آمدند.

کاربرد نانوبادی‌ها در تشخیص

1- استفاده از VHH در تشخیص پاتوژن

اگرچه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌توانند آنتی‌ژن را با حساسیت بالا تشخیص دهند، امّا اختصاصیت لازم را ندارند، درصورتی‌که VHH دارای حساسیت و اختصاصیت بالا در تشخیص پاتوژن می‌باشد؛ به‌عنوان مثال VHHها به‌خوبی می‌توانند عفونت‌های بروسلا و یرسینا را از هم تشخیص دهند، امّا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال چنین توانایی را ندارند.

2- استفاده از VHH در تشخیص HIV

از یک معرف آگلوتیناسیون بر اساس VHH برای تشخیص استفاده می‌شود، این معرف در اثر فیوژن یک آنتی‌ژن HIV مانند P_{24} با VHH اختصاصی سلول‌های قرمز خون به وجود می‌آید. در افراد HIV^+ به علت وجود آنتی‌بادی‌های ضد P24 این معرف موجب آگلوتیناسیون می‌شود.

3- استفاده از VHHها در تصویربرداری غیرتهاجمی

آنتی‌بادی‌هایی که پروتئین‌های مرتبط با تومور را مورد هدف قرار می‌دهند و با رادیونوکلئوتیدها لیبل شدند به‌عنوان ردیاب برای تصویربرداری غیرتهاجمی تومور از طریق PEC و SPEC بکار می‌روند. این ردیاب‌ها باید سیگنال شدید، اختصاصیت بالا به هدف، پایداری بالا، حلالیت بالا و ایموژنیستی کم داشته باشند. به‌علت نیمه‌عمر طولانی آنتی‌بادی‌هایی با طول کامل، تصویربرداری با کنتراست کافی چند روز بعد از تزریق انجام می‌شود، بنابراین به رادیونوکلئوتیدهایی با طول عمر طولانی نیاز داریم که این خود سمیت را افزایش می‌دهد، ازاین‌رو VHHها به خاطر انتقال سریع از خون به بافت، نفوذ خوب به داخل تومور و حذف سریع ردیاب‌های اضافی از کلیه، امکان تصویربرداری با حساسیت بالا در طی چند ساعت بعد از تزریق را فراهم می‌کنند.

استراتژی‌های درمانی نانوبادی

نانوبادی‌ها می‌توانند به پروتئین‌های ترانس ممبرین که به‌عنوان هدف‌های سرطانی محسوب می‌شوند، باند شوند. این پروتئین‌ها شامل رسپتور فاکتور رشد اپیدرمی و C-Met می‌باشند. نانوبادی‌ها همچنین مستقیماً می‌توانند به هدف‌های خارج سلولی باند شوند که در داخل بافت توموری دارای عملکرد می‌باشند، که این هدف‌ها شامل HGF و کموکاین‌ها می‌باشند.

طبقه‌بندی نانوبادی‌های ضدسرطان

1- نانوبادی‌های برهنه

2- نانوبادی‌ها با دومین افکتور (شامل توکسین و آنزیم)

3- نانوبادی‌هایی که بر روی سطح نانوپارتیکل‌ها شامل لیپوزوم‌ها، میسل‌ها و پلی‌پلکس‌ها قرار می‌گیرند.

روش‌های انتقال نانوبادی‌ها به بدن

1-انتقال خوراکی

2- انتقال داخل وریدی

3- انتقال داخل حفره شکمی

4- انتقال به داخل تومور

برای استفاده خوراکی و داخل حفره شکمی، نانوبادی‌ها باید طوری طراحی شوند که نسبت به شرایط سخت مانند پروتئازها و PH اسیدی مقاوم باشند. به خاطر اینکه نانوبادی‌ها معمولاً در هنگام تزریق داخل وریدی پایدار هستند، بنابراین در حال حاضر این روش برای مطالعات درمان سرطان در شرایط in vivo به کار می‌رود.

تزریق داخل وریدی نانوبادی

فاز اول در درمان سرطان نانوبادی تزریق داخل وریدی آن است که تزریق همیشه در نزدیکی تودهٔ توموری انجام نمی‌شود، درنتیجه لازم است که مواد تزریق‌شده یک مدت زمان کافی را در سیستم گردش خون طی کنند تا به تومور برسند. یک سری از نانوبادی‌های برهنه و نانوبادی‌های با دومین افکتور که از نظر اندازه کوچک‌تر هستند توسط کلیه پاک‌سازی می‌شوند. براثر پاک‌سازی توسط کلیه و احتباس در کلیه کونژوگه‌های توکسین– نانوبادی ممکن است موجب سمیت کلیه شود. برای جلوگیری از این سمیت باید احتباس کلیه‌ای نانوبادی به حداقل برسد. یک روش برای کاهش تجمع و احتباس در کلیه کمتر کردن میزان فیلتراسیون از طریق افزایش اندازه نانوبادی می‌باشد که موجب افزایش نیمه‌عمر و شانس جذب بهتر توسط تومور می‌شود. این افزایش اندازه می‌تواند از طریق گلیکوزیلاسیون یا پلی‌اتیلن گلایکوزاسیون نانوبادی‌ها و یا اتصال غیرکووالان آن‌ها به پروتئین‌های سرمی مانند آلبومین صورت گیرد که موجب افزایش نیمه‌عمر و احتباس کمتر در کلیه می‌شود. سیستم کبدی– صفراوی مسیر اصلی دفع داروهایی است که برای پاک‌سازی توسط کلیه خیلی بزرگند مانند نانوبادی‌های متصل به نانوپارتیکل‌ها.

انتقال از خون به بافت و نفوذ به تومور

فاز دوّم انتقال دارو از خون به بافت و نفوذ در داخل تومور است. این انتقال از طریق diffusion صورت می‌گیرد. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به خاطر اندازهٔ بزرگشان نمی‌توانند از طریق diffusion به بافت توموری نفوذ کنند، بنابراین در درمان سرطان مناسب نیستند. اگر بخشی از تومور در معرض دارو قرار بگیرد تومور به‌طور کامل ریشه‌کن نمی‌شود و احتمال رشد مجدد تومور وجود دارد که از این نظر نانوبادی‌ها نسبت به آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برتری دارند.

واکنش نانوبادی‌ها با هدف

در مورد همهٔ انواع نانوبادی‌ها مرحلهٔ نهایی قبل از مکانیسم عمل، اتصال واقعی نانوبادی به مولکول هدف می‌باشد که این اتصال از طریق نانوبادی‌ها صورت می‌گیرد. این اختصاصیت برای درمان ضروری است تا اثرات جانبی به حداقل برسد. بعد از باند شدن نانوبادی به رسپتور هدف، یک اندوسیتوز خیلی آهسته اتفاق می‌افتد که حدوداً 24 ساعت طول می‌کشد. برای اندوسیتوز سریع استفاده از نانوبادی‌های بای‌پاراتوپیک پیشنهاد شده است. نانوبادی‌های بای‌پاراتوپیک از دو نانوبادی مختلف تشکیل شده‌اند که به پروتئین هدف یکسان متصل می‌شوند و موجب اندوسیتوز سریع‌تر و در مرحلهٔ بعدی تخریب در لیزوزوم می‌شوند که موجب رها شدن دارو از نانوبادی می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نانوبادی‌ها برای کاربردهای بیوتکنولوژی مهم هستند و به‌علت تولید با پایداری بالا در میکروارگانیسم‌ها ازنظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه‌اند. اساساً به علت اندازهٔ کوچک و طبیعت مونومریک نسبت به آنتی‌بادی‌های معمول برتری دارند.