

ساخت آنتی بادی تک دمینی علیه دمین متصل شونده به گیرنده VEGF با توانایی اتصال به نواحی عملکردی کلیدی آن

سیده شیرین شاهنگیان¹، شیرین جلیلی²، عمار محسنی³، رضا حسن ساجدی^{4*}، صادق حسن نیا⁵،
مجید تقدیر⁶، محمد محمدی⁷، ریحانه سریری⁸

- 1- دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت
- 2- دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
- 3- دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
- 4- 5- دانشیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
- 6- استادیار بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
- 7- استادیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید چمران، اهواز
- 8- استاد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

* تهران، صندوق پستی 14115-175
sajedi_r@modares.ac.ir

چکیده- با توجه به اهمیت مهار VEGF¹ و ویژگی های بی نظیر VHH که آنها را در ردیف نسل جدید داروهای از نوع آنتی بادی قرار داده، هدف از این مطالعه تولید VHH علیه دمین متصل شونده به گیرنده VEGF است تا به این ترتیب از اتصال VEGF به گیرنده اش ممانعت شود. پس از تهیه گنجینه ژنی² قطعات VHH از شتر ایمن، کتابخانه نمایش فاژی³ VHH ساخته شد. برای جداسازی فاژهای نمایشگر⁴ VHH با تمایل بالا به دمین متصل شونده به گیرنده VEGF، غنی سازی⁵ های متوالی سختگیرانه ای انجام گرفت. 52 درصد از کلون های اختصاصی غربال شده به وسیله الیزای فاژ مونوکلونال توالی یکسانی داشتند که حاکی از غنی شدن بالای این کلون بود. ساختار سه بعدی این VHH (VEvhh1) مدل سازی شده و با استفاده از شبیه سازی میانکنش بین مولکولی⁶ آنتی ژن-آنتی بادی بر اساس اطلاعات کریستالوگرافی کمپلکس VEGF/VEGFR2، شبیه سازی دینامیک مولکولی و محاسبات انرژی آزاد MM/PBSA⁷، تصویری از جایگاه اتصال VHH بر روی آنتی ژن ارائه شد. بر اساس نتایج مطالعات، VHH با انرژی اتصال بالایی به جایگاه اتصال به گیرنده VEGF متصل شده و بطور مؤثری آمینواسیدهای کلیدی عملکردی VEGF را پوشش داده، مانع اتصال VEGF به گیرنده آن می شود و احتمالاً فعالیت بیولوژیک آن را مختل می سازد. این مطالعه VEvhh1 را به عنوان کاندید مناسب ضد VEGF و ضد آنژیوژنز معرفی می کند.

1. Vascular Endothelial Growth Factor
2. Gene Repertoire
3. Phage Display Library
4. Phages Displaying Vhh
5. Panning
6. Molecular Docking Simulation
7. The Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area

کلیدواژگان: رگزایی، فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF)، آنتی‌بادی تک‌دومینی (VHH)، تکنولوژی نمایشگر فاژی، شبیه‌سازی میانکشی بین مولکولی.

1- مقدمه

امروزه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال از مهمترین داروهای بیولوژیک در درمان هدفمند بیماری‌هایی همچون سرطان بشمار می‌روند [2,1]. طبق آخرین گزارش‌های جامعه آنتی‌بادی در پایان سال 2014، تاکنون 40 آنتی‌بادی مونوکلونال درمانی توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA)¹ به تصویب رسیده و 7 آنتی‌بادی مونوکلونال نیز در حال گذراندن تست‌های بالینی‌اند.

(http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php) این دسته از داروها با وجود اهمیت‌شان در مقوله درمان و تشخیص، معایبی مانند هزینه بالای تولید، القاء پاسخ ایمنی و عدم نفوذ مؤثر به بافت‌های توموری نشان می‌دهند [4,3]. به‌منظور حل این مشکل‌ها، مهندسی آنتی‌بادی به سمت تولید قطعات کوچکتری همچون Fab² و scFv³ پیش رفت. اما این قطعات نیز از نقطه نظر پایداری، مقاومت در برابر پروتئازها، تجمع به علت لینکرهای سنتتیک موجود در ساختارشان و بازده بیان ضعیف‌هایی نشان دادند [7-5]. دسته‌ای از آنتی‌بادی‌ها که بطور طبیعی در بدن شترسانان تولید می‌شوند، به علت ویژگی‌های منحصر بفردشان بر تمامی مشکلات مذکور فایده‌آمده‌اند [3]. این آنتی‌بادی‌های تک‌دومینی یا VHH کوچکترین قطعه آنتی‌بادی‌اند که تمامیت عملکردی خود را حفظ کرده و به دلیل اندازه بسیار کوچک تحت عنوان نانوبادی⁴ نیز مطرح می‌شوند [8].

ویژگی‌های ارزشمند نانوبادی‌ها از جمله قدرت نفوذ مؤثر به بافت‌ها، پایداری قابل ملاحظه، سهولت پروسه انسانی کردن، بیان کارآمد در میزبان‌های پروکاریوتی، تمایل و

اختصاصی بودن استثنائی‌شان به آنتی‌ژن مربوط، آنها را به‌عنوان کاندیدای درمانی جایگزینی برای آنتی‌بادی‌های معمول معرفی می‌کند [11-9,6].

رگزایی یا آنژیوژنز در بسیاری از شرایط پاتولوژیک همچون رشد تومور، متاستاز⁵، رتینوپاتی دیابتی⁶، دژنراسیون ماکولا⁷، روماتوئید آرتریت⁸ و پسوریازیس⁹ نقش کلیدی ایفا می‌کند [13,12]. مهمترین فاکتور القا کننده آنژیوژنز، فاکتور رشد اندوتلیال رگی¹⁰ (VEGF) می‌باشد که فعالیت بیولوژیک خود را از طریق اتصال به دو گیرنده تیروزین کینازی به نام گیرنده‌های Flt-1 (VEGFR1)¹¹ و KDR (VEGFR2)¹² اعمال می‌کند [15,14].

در فعالیت میتوژنیک، آنژیوژنیک و بطور کلی وقوع سیگنالینگ VEGF، VEGFR2 نقش بسیار مهمتری از خود نشان می‌دهد [13]. به دلیل نقش حیاتی VEGF در آنژیوژنز پاتولوژیک، این مولکول به عنوان یک هدف دارویی ارزشمند برای درمان‌های ضدآنژیوژنز مطرح می‌باشد [16].

تاکنون تلاش‌های بسیاری در جهت مهار VEGF صورت گرفته است که از موفق‌ترین آنها، تولید آنتی‌بادی مونوکلونال bevacizumab بر علیه VEGF است. در حال حاضر این آنتی‌بادی در درمان بیماری دژنراسیون ماکولا و بسیاری سرطان‌ها همچون کولورکتال، ریه و کلیه استفاده می‌شود [18,17]. با این وجود bevacizumab نیز از معایب آنتی‌بادی‌های معمول مستثنی نبوده و چالش‌های

5. Metastasis

6. Diabetic Retinopathy

7. Macular Degeneration

8. Rheumatoid Arthritis

9. Psoriasis

10. Vascular Endothelial Growth Factor

11. VEGF Receptor 1 (Fms-Like Tyrosine Kinase-1)

12. VEGF Receptor 2 (Kinase Domain Region)

1. U.S. Food and Drug Administration

2. Fragment Antigen-Binding

3. Single-Chain Variable Fragment

4. Nanobody

روش‌ها

2-2- تولید آنتی‌ژن، ایمن کردن حیوان و بررسی پاسخ

ایمنی خونی

پس از بیان دمین متصل شونده به گیرنده VEGF، تاخوردگی مجدد⁶ آن و حصول اطمینان از تاخوردگی صحیح، پروتئین نوترکیب به‌عنوان ایمونوژن و آنتی‌ژن در ادامه مطالعه مورد استفاده قرار گرفت [13]. پروتئین نوترکیب در 6 نوبت با فواصل زمانی سه هفته‌ای به صورت زیرجلدی و عضلانی به ترتیب در مقادیر 200 و 300 میکروگرم به شتر تزریق شد. به استثنای تزریق اول که از ادجوانت کامل فروند استفاده گردید، در سایر تزریق‌ها ایمونوژن پروتئینی با ادجوانت ناقص فروند امولسیفیه شد. به‌منظور ارزیابی القاء پاسخ ایمنی علیه پروتئین مورد نظر، قبل و بعد از ایمنی‌زایی از حیوان خون‌گیری و سرم آن جدا گردید. تیتراژ آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه VEGF با انجام تست الایزا⁷ بر روی آنتی‌ژن مربوطه بررسی شد. آنتی‌بادی‌های شتری اتصال یافته توسط آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی ضد ایمونوگلوبولین شتری ردیابی شدند. لازم به ذکر است برای حصول آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال خرگوشی ضد ایمونوگلوبولین شتری، خرگوش توسط ایمونوگلوبولین که از سرم شتر غیرایمن به کمک ستون پروتئین A/G خالص شده بود، با شش تزریق ایمن گردید. در تزریق اول حدود 0/5 mg ایمونوگلوبولین شتری تخلیص شده به خرگوش تزریق شد. در تزریقات بعدی 0/25 mg ایمونوگلوبولین شتری تخلیص شده به خرگوش تزریق شد. در این ایمنی‌زایی نیز به استثنای تزریق اول که از ادجوانت کامل فروند استفاده گردید، در سایر تزریق‌ها ایمونوژن با ادجوانت ناقص فروند امولسیفیه شد. تزریق‌های یادآور، بار اول، یک ماه بعد و در موارد بعدی هر دو هفته یک بار انجام

مطرح شده، در مورد این آنتی‌بادی نیز صادق است. لذا با توجه به اهمیت مهار آنژیوژنز، نقش اساسی VEGF در این پدیده و خصوصیات فوق‌العاده VHH‌ها نسبت به سایر انواع آنتی‌بادی‌ها، هدف از این مطالعه تولید و غربال‌گری VHH‌ی اختصاصی با تمایل بالا نسبت به VEGF بود.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

استاندارد وزن مولکولی DNA¹ (#SM0331) و (#SM0313)، استاندارد وزن مولکولی پروتئین² (#SM0431)، کیت‌های ساخت cDNA و الحاق DNA از شرکت Thermo Scientific (Vilnius, Lithuania)، کانامایسین، IPTG³، آگارز از شرکت Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)، رزین Ni-NTA⁴ آگارز از شرکت کیاژن (Hilden, Germany)، پلیت 96 خانه‌ای الایزا از شرکت Nunc (MaxiSorp, USA)، کیت‌های استخراج پلاسمید، استخراج RNA، استخراج DNA از ژل آگارز و آنزیم محدودکننده SfiI از شرکت Roche (Mannheim, Germany)، ادجوانت فروند⁵ کامل و ناقص از شرکت Sigma (St Louis, MO, USA)، فایکول از شرکت GE-Healthcare (Piscataway, NJ, USA)، آنتی‌بادی مونوکلونال کونزوگه به HRP علیه باکتریوفاژ M13 از شرکت Amersham Biosciences (Freiburg, Germany)، فاژ کمکی M13KO7 از شرکت New England Biolabs (Beverly, MA, USA) و سایر مواد شیمیایی از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) خریداری شدند.

1. DNA Ladder
2. Protein Marker
3. Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside
4. Nickel-Nitrilotriacetic Acid
5. Freund's Adjuvant

6. Refolding

7. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

نوترکیب دمین متصل شونده به گیرنده VEGF توسط بافر بلاکینگ حاوی آلبومین سرم گاوی (3 درصد) بلاک گردید. پس از انکوباسیون کتابخانه فاژ نوترکیب با آنتی‌ژن تثبیت شده در چاهک‌ها به مدت 2 ساعت، چاهک‌ها توسط بافر PBST (بافر فسفات حاوی 0/05 درصد tween) شستشو داده شدند و فاژهای اتصال یافته به آنتی‌ژن توسط بافر HCl-Glycine (pH: 2/2) رها شده و با بافر تریس (pH: 9) خنثی گردید. در این مرحله به منظور ارزیابی میزان موفقیت غنی‌سازی و تکثیر فاژهای نوترکیب اختصاصی، باکتری *E. coli* سویه TG1 (در فاز رشد لگاریتمی) به وسیله فاژهای جدا شده آلوده گردید. فاژهای تکثیر یافته پس از تغلیظ شدن توسط $^{10} \text{PEG/NaCl}$ به عنوان فاژهای ورودی دور بعدی غنی‌سازی استفاده شدند. مراحل مذکور 6 بار تکرار شد. با این تفاوت که در هر دور غنی‌سازی شرایط شستشوی فاژها (درصد دترجنت tween-20 و تعداد دفعات شستشو) نسبت به دور قبل سخت‌تر گردید. ارزیابی میزان موفقیت در غنی‌سازی فاژها با مقایسه تیتراژ و نیز بررسی قدرت اتصال به آنتی‌ژن فاژهای پلی‌کلونال بدست آمده از هر دور غنی‌سازی انجام شد. قدرت اتصال فاژها به آنتی‌ژن با روش الایزا فاژ پلی‌کلونال² بررسی گردید. به این ترتیب که چاهک‌های پلیت الایزا توسط 0/5 میکروگرم آنتی‌ژن مورد نظر پوشیده شدند و پس از بلاک کردن چاهک‌ها با آلبومین سرم گاوی (3 درصد، فاژهای خروجی هر دور غنی‌سازی (تیتراژ 10^{10}) به مدت 2 ساعت در مجاورت آنتی‌ژن کوت شده انکوبه شدند. بعد از شستشوی فاژهای اتصال نیافته، ردیابی فاژهای متصل شده توسط آنتی‌بادی موشی ضد باکتریوفاژ M13 (1/8000) و به دنبال آن آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به HRP ضد آنتی‌بادی موشی انجام شد. پس از افزودن

می‌شدند. از تزریق سوم تیتراژ سرم خرگوش از نظر وجود آنتی‌بادی علیه Igهای شتری با الایزا چک شدند. به این ترتیب که 5 تا 7 روز بعد از هر تزریق، پس از انجام خون‌گیری از ورید گوش حیوان، سرم جدا شده و از نظر واکنش با آنتی‌بادی‌های شتری چک می‌شد. سپس ایمونوگلوبولین‌های خرگوشی سرم ایمن توسط ستون پروتئین A/G خالص شدند.

2-3- ساخت کتابخانه نمایش فاژی

یک هفته پس از آخرین تزریق، سلول‌های لنفوسیت خون محیطی حیوان ایمن توسط فایکول جدا شده و RNA کل از حدود 10^7 سلول لنفوسیت استخراج گردید. cDNA سنتز شده از روی RNA به عنوان الگوی واکنش PCR اول (دو جفت پرایمر A4، A6، Call001، Call002) استفاده گردید [19]. پس از جداسازی قطعات ژنی تکثیر یافته مربوط به آنتی‌بادی‌های معمول و زنجیره سنگین از یکدیگر بر روی ژل آگارز، قطعات ژنی آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین به عنوان الگوی واکنش nested PCR (پرایمرهای Fr4-SfiI، Fr1-SfiI) استفاده شدند [19]. کتابخانه ژنی استخراج شده توسط آنزیم محدود کننده SfiI هضم، درون فاژمید pComb3X الحاق و با روش الکتروپوریشن به سلول‌های مستعد *E. coli* (TG1) منتقل شد. گنجینه ژنی VHH پس از آلوده‌سازی سلول‌های باکتری (در فاز رشد لگاریتمی) توسط فاژ کمکی M13KO7 بر سطح فاژ بیان گردید. کتابخانه فاژهای نمایشگر VHHها قبل از ورود به مرحله غنی‌سازی تکثیر داده شد و توسط $^{10} \text{PEG/NaCl}$ تغلیظ و تیتراژ گردید [20]. برای غنی شدن کتابخانه، مراحل ساخت آن 4 بار تکرار شد.

2-4- غنی‌سازی کتابخانه VHHهای اختصاصی علیه

VEGF و ارزیابی آن

پلیت کوت (پوشیده) شده توسط 0/5 میکروگرم پروتئین

1. Polyethylene Glycol
2. Polyclonal Phage Elisa

استفاده از برنامه Modeller 9.13 [21] پنجاه مدل اولیه برای VHH منتخب ساخته و ساختار لوپ‌های CDR⁴ آنتی‌بادی توسط مادول loop refine برنامه Modeller بهینه⁵ شد. از بین این مدل‌ها بهترین مدل بر اساس فاکتورهای Errat، ProCheck و Verify 3D (http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/) ضمن مطالعه مقایسه‌ای با الگو انتخاب شد. برنامه ProCheck کیفیت استرئوشیمی ساختار پروتئین را از طریق آنالیز ژئومتری باقی‌مانده-باقی‌مانده و ژئومتری کلی ساختار را نشان می‌دهد، برنامه Errat به آنالیز آماری میانکنش‌های بین انواع اتم‌های مختلف می‌پردازد و برنامه Verify 3D سازگاری مدل اتمی (ساختار سوم) با توالی آمینواسیدی مربوط (ساختار اول) را بر اساس موقعیت و محیط تعیین و نتایج را با یک ساختار مناسب مقایسه می‌کند.

7-2- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی⁶ (MD)

مدل ساختاری انتخاب شده در مرحله مدل سازی در فرایند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بهینه گردید. در این تحقیق شبیه‌سازی به وسیله نرم‌افزار GROMACS 4.5.4 و تحت میدان نیروی GROMOS 43a1 انجام شد [22]. برای محاسبه نیروهای الکتروستاتیک از الگوریتم PME⁷ استفاده شد. مولکول VHH در محیط آبی با مدل SPC⁸ با تعداد ملکول‌های 12086 و حداقل ضخامت 8 آنگستروم به عنوان حلال قرار داده شد. ابتدا سیستم برای 5000 گام به کمک الگوریتم تندترین شیب⁹ تحت روند کمینه‌سازی انرژی قرار گرفت تا میانکنش‌های نامناسب درون ساختاری برطرف شوند و همچنین شرایط ایجاد میانکنش‌های هیدروژنی بین مولکول پروتئینی و ملکول‌های حلال فراهم شود. در این مرحله طی مدت

سویسترای TMB¹ و توقف واکنش با HCl، میزان جذب در 450 نانومتر بررسی شد. این روند بر روی آنتی‌ژن آلبومین سرم گاوی نیز به‌عنوان کنترل انجام شد.

2-5- غربال‌گری² فازهای مونوکلونال با بیشترین تمایل

اتصال به VEGF

به‌منظور انتخاب مونوفازهای با بیشترین اختصاصیت و تمایل به دمن متصل شونده به گیرنده VEGF، 52 کلونی از پلیت‌های تعیین تیترو مربوط به دورهای پنجم و ششم غنی‌سازی بطور تصادفی انتخاب و تکثیر شدند. قدرت اتصال فازهای مونوکلونال تکثیر یافته به آنتی‌ژن با روش الایزا فاز مونوکلونال³ ارزیابی شد. روند این آزمون الایزا مشابه پلی‌کلونال فاز الایزا است، با این تفاوت که در این آزمون به جای گنجینه‌ای از فازهای متنوع، اتصال تنها یک کلون فاژی (تیترو¹⁰) به آنتی‌ژن بررسی می‌شود. تست مذکور بر روی آنتی‌ژن آلبومین سرم گاوی نیز به‌عنوان کنترل انجام شد. پس از غربال‌گری مونوفازهای با تمایل بالای اتصال به VEGF، فازمید نو ترکیب حامل ژن VHH توسط کیت استخراج پلاسמיד از باکتری‌های آلوده به فازهای مونوکلونال مورد نظر استخراج و برای تعیین توالی ارسال گردید. پس از ترجمه توالی نوکلئوتیدی VHH‌ها به توالی پروتئینی، VHH ای که بیشترین تکرار در توالی‌ها را به خود اختصاص داده، یعنی طی روند غنی‌سازی نسبت به سایر VHH‌ها بیشتر غنی شده و در اتصال به آنتی‌ژن اختصاصی موفق‌تر بوده، برای ادامه مطالعات انتخاب شد.

2-6- مدل‌سازی مقایسه‌ای

در این مرحله پس از انتخاب الگوی مناسب به کمک جستجوگر BLASTP بر علیه بانک اطلاعاتی PDB، با

4. Complementarity-Determining Regions

5. Refine

6. Molecular Docking Simulation (MD)

5. Particle Mesh Ewald

8. Simple Point Charge

9. Steepest Descent Algorithm

1. Tetramethylbenzidine

2. Screening

3. Monoclonal Phage ELISA

100 پیکوثانیه دمای سیستم تحت شرایط حجم ثابت به تدریج از 200 تا 300 درجه کلون افزایش یافت. فرایند دینامیک ملکولی تحت شرایط فشار ثابت به مدت 20 نانوثانیه با گام‌های زمانی 2 فمتوثانیه انجام شد و هر 2 پیکوثانیه یک ساختار لحظه‌ای از ملکول ثبت و ذخیره گردید. برای بررسی پایداری شبیه‌سازی و ساختار پارامترهای دانسیته، انرژی کل، دما، انحراف معیار جذر میانگین مربعات (RMSD)¹ و شعاع ژیراسیون آنالیز شدند. از ساختارهای ذخیره شده در بازه زمانی پس از پایداری RMSD، ساختاری میانگین بدست آمد و صحت مدل آن توسط برنامه:

Procheck (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/>) تأیید گردید. در مطالعات تئوری بعدی از این ساختار استفاده شد.

2-8- شبیه‌سازی داکینگ مولکولی²

به‌منظور پیشگویی جایگاه اتصال آنتی‌بادی بر روی آنتی‌ژن و شبیه‌سازی میانکنش آنها از برنامه Cluspro 2.0 (<http://cluspro.bu.edu>) استفاده شد [27-23]. ساختارهای ورودی داکینگ شامل ساختار کریستال دمن متصل شونده به گیرنده VEGF (برگرفته از بانک داده پروتئینی با کد 2VPF: pdb) و مدل ساختاری میانگین و بهینه شده آنتی‌بادی VHH بود. در شبیه‌سازی توسط برنامه Cluspro از Mode مربوط به آنتی‌ژن-آنتی‌بادی استفاده شد. Cluspro الگوریتمی است که در سه مرحله اصلی میانکنش‌های مولکولی و اتصال دو مولکول را مورد مطالعه قرار می‌دهد. در مرحله اول یک داکینگ سخت³ بر اساس روش داکینگ FFT توسط PIPER انجام می‌شود و پس از کمینه‌سازی انرژی⁴، کمپلکس‌ها غربال و دسته‌بندی شده و دسته‌های ناپایدار حذف می‌شوند. در

نهایت به کمک شبیه‌سازی مونت‌کارلو دسته‌های منتخب در مرحله قبل پایدار و بهینه می‌شوند. برترین کمپلکس‌های شبیه‌سازی شده بر اساس جمعیت دسته‌ها و امتیاز Cluspro انتخاب شدند. پس از مشخص شدن جایگاه اتصال احتمالی آنتی‌بادی بر روی آنتی‌ژن، به‌منظور بررسی میزان تمایل آنتی‌بادی به جایگاه اتصال به گیرنده VEGF و توان آنتی‌بادی در پوشاندن ناحیه مذکور، شبیه‌سازی داکینگ هدفمندی توسط نرم‌افزار تحت وب HADDOCK⁵ انجام شد [28].

قبل از شبیه‌سازی داکینگ هدفمند، ابتدا جایگاه پیشنهادی HADDOCK برای اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن تعیین و ارزیابی گردید. در این شبیه‌سازی، برای آنتی‌بادی VHH آمینواسیدهای در دسترس حلال لوپ‌های CDR به‌عنوان آمینواسیدهای فعال در نظر گرفته شدند. آمینواسیدهای منفعل⁶ توسط خود نرم‌افزار مشخص گردیدند. در مورد دمن متصل شونده به گیرنده VEGF نیز آمینواسیدهای در دسترس حلال به‌عنوان آمینواسیدهای منفعل در نظر گرفته شدند و آمینواسید فعالی تعیین نشد. ابتدا 1000 کمپلکس ساخته شد و از بین آنها 200 کمپلکس دارای بیشترین امتیاز انتخاب و از نظر انرژی بهینه سازی شدند. ساختارهای خروجی این مرحله بر اساس RMSD (قراردادی نرم‌افزار) دسته‌بندی شدند. در نهایت بهترین کمپلکس بر اساس معیارهایی مانند امتیاز HADDOCK (معیار قراردادی نرم‌افزار برای انتخاب کمپلکس برتر)، جمعیت دسته‌ها و انحراف ریشه میانگین مربعات نسبت به ساختار با پایین‌ترین انرژی برگزیده و بررسی گردید. در شبیه‌سازی داکینگ هدفمندی که توسط HADDOCK انجام شد، برای VHH آمینواسیدهای در دسترس حلال لوپ‌های CDR و برای VEGF، آمینواسیدهای کلیدی درگیر در اتصال به گیرنده که در دسترس حلال‌اند، به‌عنوان آمینواسیدهای فعال⁷ لحاظ شدند. آنالیز

5. High Ambiguity Driven Protein-Protein Docking

6. Passive Residues

7. Active Residues

1. Root Mean Square Deviations
2. Molecular Docking Simulation
3. Rigid Docking
4. Energy Minimization

کمپلکس‌های برتر طبق اصول قبلی انجام شد. برای تعیین آمینواسیدهای کلیدی VEGF که درگیر در اتصال به گیرنده VEGFR2 می‌باشند، اختلاف سطوح در دسترس مولکول VEGF موجود در ساختار کمپلکس VEGF/VEGFR2 در حضور و عدم حضور VEGFR2 توسط جستجوگر What If محاسبه شد [29]. آمینواسیدهایی که بیشترین امتیاز را به خود اختصاص دادند، به‌عنوان آمینواسیدهای مهم در اتصال VEGF به VEGFR2 مشخص شدند. همچنین برای شناسایی آمینواسیدهایی از VEGF که ضمن اتصال آنتی‌بادی بلوکه شده و پوشش داده می‌شوند، اختلاف سطوح در دسترس مولکول VEGF موجود در ساختار کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی در حضور و عدم حضور آنتی‌بادی محاسبه شد.

9-2- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کمپلکس‌های برگزیده

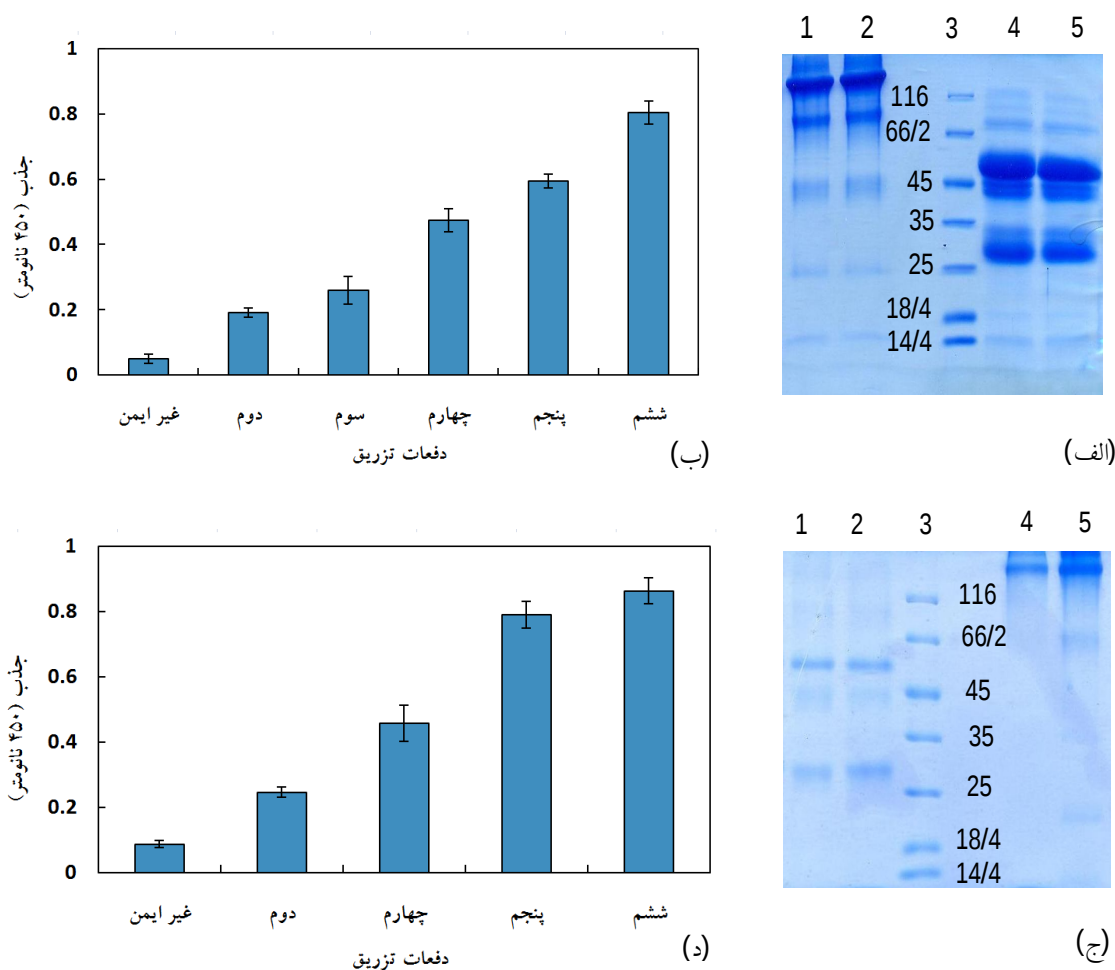
برای بررسی پایداری کمپلکس‌ها و وقوع تغییرات مکانی احتمالی آنتی‌بادی بر روی آنتی‌ژن، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی 10 نانوثانیه‌ای روی کمپلکس‌های برگزیده آخرین شبیه‌سازی داکینگ مولکولی (داکینگ هدفمند) انجام شد. پارامترهایی مانند RMSD، شعاع ژیراسیون، انرژی کل و دانسیته طی زمان بررسی شدند. سپس توسط آنالیز MM-PBSA انرژی آزاد میانکنش آنتی‌بادی-آنتی‌ژن محاسبه گردید [30]. به‌منظور انجام این محاسبات از ساختارهای ذخیره شده طی شبیه‌سازی، ساختارهایی در بازه‌های زمانی 50 پیکوثانیه انتخاب شدند و در نهایت انرژی آزاد و سهم انرژی‌های مرتبط، از ساختارهای انتخاب شده استخراج گردید.

3- نتایج

1-3- بررسی روند ایمنی‌زایی در خرگوش و شتر

برای تولید آنتی‌بادی ثانویه خرگوشی ضد ایمونوگلوبولین‌های شتری، ایمونوگلوبولین‌های شتری از

سرم شتر غیرایمن به وسیله ستون کروماتوگرافی پروتئین (G/A) تخلیص (شکل 1- الف) و به خرگوش تزریق شدند. در شرایط غیراحیایی چهار رشته آنتی‌بادی‌های معمولی و نیز دو رشته آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین از هم جدا نشده و به‌ترتیب وزنی حدود 160 و 100 کیلودالتون نشان می‌دهند. اما در شرایط احیایی چهار رشته آنتی‌بادی‌های معمول از یکدیگر جدا شده، دو رشته سنگین و دو رشته سبک به‌ترتیب در محدوده وزن مولکولی 30 و 50 کیلودالتون مشاهده می‌شوند. دو رشته آنتی‌بادی زنجیره سنگین نیز در شرایط احیایی از هم باز می‌شوند. دو رشته سنگین IgG2 وزنی حدود 46 و دو رشته سنگین IgG3 وزنی حدود 43 کیلودالتون دارند (شکل 1- الف). تیتراژ آنتی‌بادی خرگوشی ضد ایمونوگلوبولین شتری پس از هر بار تزریق به حیوان توسط روش الیزا بررسی گردید. همان گونه که در شکل 1- ب مشاهده می‌شود، پس از تزریق ششم پاسخ ایمنی مناسبی حاصل گردید. بعد از خون‌گیری از حیوان ایمن، ایمونوگلوبولین‌های خرگوشی به‌منظور استفاده در مراحل بعدی تخلیص شدند (شکل 1- ج). دمین متصل شونده به گیرنده VEGF پس از تخلیص طی 6 مرحله با بازه‌های زمانی سه هفته‌ای به شتر تزریق گردید. تیتراژ آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه آنتی‌ژن مذکور در طول روند ایمنی‌زایی ردیابی شد که روندی صعودی نشان داد. افزایش تیتراژ آنتی‌بادی از تزریق دوم تا ششم قابل مشاهده است (شکل 1- د). پس از اطمینان از ایمنی‌زایی مطلوب حیوان علیه آنتی‌ژن مورد نظر، یک هفته بعد از تزریق ششم لنفوسیت‌های خون محیطی شتر تخلیص شدند. در بررسی روند ایمنی‌زایی در خرگوش و شتر، سرم خون غیر ایمن هر دو حیوان نیز به عنوان نمونه کنترل ارزیابی گردید (شکل 1- ب و د).



شکل 1 بررسی روند ایمن شدن خرگوش و شتر و تخلیص ایمونوگلوبولین‌های خرگوشی و شتری. (الف) بررسی خلوص ایمونوگلوبولین‌های شتری با SDS-PAGE در شرایط غیراحیایی (1و2) و احیایی (3و4، 5)- استاندارد وزن مولکولی پروتئین. (ب) روند ایمن شدن خرگوش بر علیه ایمونوگلوبولین‌های شتری با تزریقات متوالی سیری صعودی نشان می‌دهد. نتایج ارائه شده مربوط به رقت 1/16000 سرم ایمن می‌باشد. (ج) بررسی خلوص ایمونوگلوبولین‌های خرگوشی با SDS-PAGE در شرایط احیایی (1و2) و غیراحیایی (3و4، 5)- استاندارد وزن مولکولی. (د) روند ایمن شدن شتر بر علیه دمین متصل شونده به گیرنده VEGF نتایج ارائه شده در این تست الایزا نیز مربوط به رقت 1/16000 سرم ایمن می‌باشد.

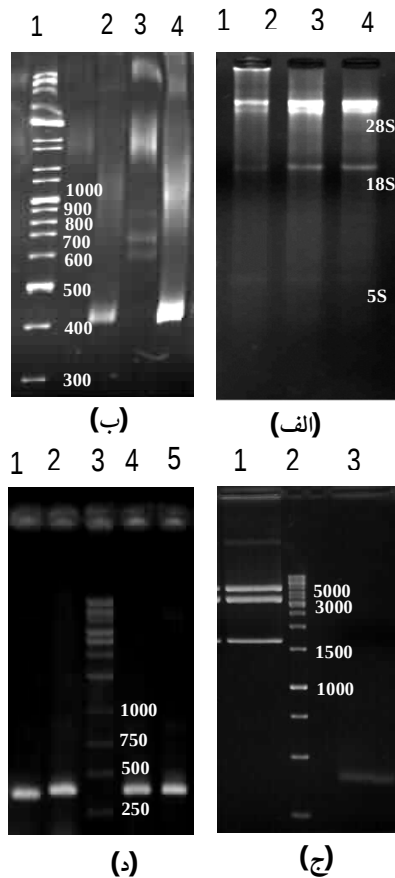
سری اول پرایمرها ناحیه کد کننده بین $^{1}\text{CH2}$ و $^{2}\text{FR1}$ آنتی‌بادی را تکثیر دادند. فقدان ناحیه CH1 در آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتری، منجر به بروز اختلاف وزن مولکولی میان آنتی‌بادی‌های معمول و زنجیره سنگین شده و جداسازی آنها را از آنتی‌بادی‌های معمول میسر کرد. به این ترتیب که محصول PCR اول،

2-3- ساخت کتابخانه آنتی‌بادی تک‌دمینی VHH علیه

دمین متصل شونده به گیرنده VEGF

سلول‌های لنفوسیت توسط شیب غلظت فایکول تخلیص شدند، RNA کل آنها استخراج و بررسی گردید (شکل 2-الف). پس از سنتز کتابخانه cDNA از روی RNA، ژن کدکننده VHH توسط nested PCR تکثیر شد.

1. Constant Heavy Domain
2. Framework Region



شکل 2 مراحل ساخت کتابخانه ژنی VHH (الف) RNA استخراج شده روی ژل آگارز 1 درصد، 1، 2 و 3- از پائین به بالا باندهای 5S، 18S و 28S مشاهده می گردد. (ب) بررسی محصول PCR اول و دوم روی ژل اکریل آمید 7 درصد 1- استاندارد وزن مولکولی DNA، 3- محصول PCR اول. قطعات ژنی از پایین به بالا بترتیب مربوط به آنتی بادی های زنجیره سنگین (600، 700 جفت باز) و آنتی بادی های معمول (900 جفت باز) اند. 2 و 4- محصول PCR دوم که شامل قطعات ژنی VHH (400 جفت باز) است. (ج) بررسی محصول هضم آنزیمی 1- فازمید Pcomb3X و 3- قطعات ژنی VHH توسط آنزیم محدود کننده *SfiI* 2- استاندارد وزن مولکولی DNA. (د) محصول PCR از کلونی های حاوی فازمید نو ترکیب (حامل قطعات ژنی VHH)

همان طور که در شکل 3- الف مشخص است، سیگنال الایزا ناشی از اتصال فازهای پلی کلونال به آنتی ژن

قطعات ژنی با وزن مولکولی 600-700 و 900 جفت بازی می باشند که به ترتیب به آنتی بادی های زنجیره سنگین و آنتی بادی های معمول تعلق دارند. به دلیل نزدیکی وزن مولکولی و به منظور جلوگیری از آلودگی این قطعات ژنی با یکدیگر، جداسازی قطعات بر روی ژل پلی اکریل آمید 7 درصد انجام شد (شکل 2- ب). قطعات ژنی آنتی بادی های زنجیره سنگین (600 و 700 جفت بازی) از ژل استخراج و به عنوان الگوی PCR دوم استفاده شدند. سری دوم پرایمرها نواحی بین FR1 و FR4 را تکثیر می دادند که قطعه ژنی کد کننده تک دامین VHH از آنتی بادی های شتری (400 جفت بازی) می باشد (شکل 2- ب). قطعات ژنی VHH و فازمید pComb3X توسط آنزیم محدود کننده *SfiI* هضم (شکل 2- ج)، ژن های VHH درون قطعه 3400 جفت بازی فازمید الحاق و محصول الحاق به باکتری *E. coli* (TG1) منتقل شد. در نهایت وجود ژن VHH از طریق PCR مستقیم از کلونی ها مورد تأیید قرار گرفت (شکل 2- د).

3-3- غنی سازی گنجینه فاژی نمایشگر VHH های اختصاصی

VEGF و غربالگری آنتی بادی های مونوکلونال

باکتری های نو ترکیب حامل کتابخانه ژنی آنتی بادی های VHH توسط فاژ کمی آلوده گردید و فاژهای نو ترکیب نمایشگر VHH ها وارد دوره های غنی سازی شدند. میزان پیشرفت و موفقیت شش دور غنی سازی توسط الایزا فاژهای پلی کلونال، تیتراسیون فاژهای ورودی و خروجی هر دور غنی سازی و بررسی وجود قطعه ژنی VHH در کلونی های خروجی هر دور ارزیابی شد. بررسی اتصال اختصاصی فاژهای پلی کلونال حاصل از هر دور غنی سازی با استفاده از الایزا علیه آنتی ژن اختصاصی و غیر اختصاصی، نشان دهنده افزایش قدرت اتصال فاژها در دوره های پیش رونده غنی سازی در مقایسه با دوره های قبلی و در نتیجه مؤید موفقیت روند غنی سازی می باشد.

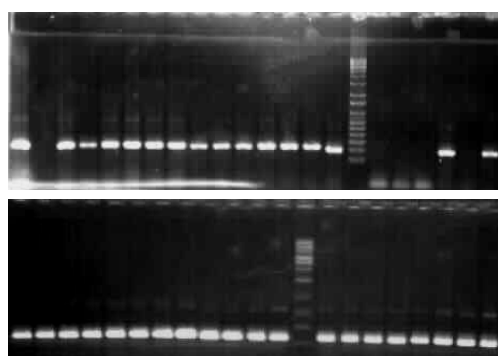
به‌عنوان مثال گنجینه فاژی در دور پنجم غنی‌سازی نسبت به دور چهارم حدود 152 بار غنی شده است (جدول 1).

جدول 1 مقایسه میزان غنی شدن فاژهای نمایشگر VHH اختصاصی بر علیه دمین متصل شونده به رسپتور VEGF در دورهای پیش رونده غنی‌سازی.

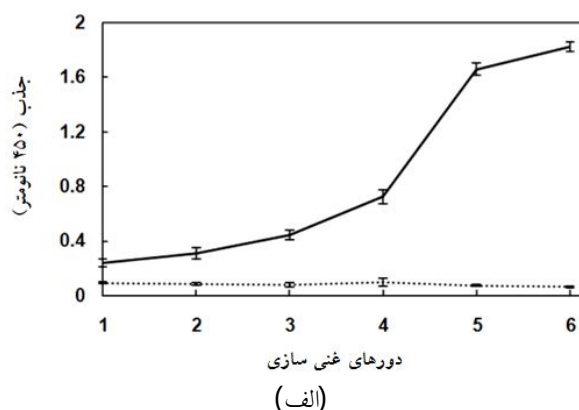
Round of panning	Enrichment fold
2	2/1
3	8/3
4	10/8
5	151/9
6	3/25

اختصاصی از دور اول تا دور ششم طی روندی صعودی افزایش یافت. نتایج نشان می‌دهد که ضمن سخت‌تر نمودن شرایط شستشو (افزایش غلظت دترجنت همراه با افزایش تعداد شستشوها) طی دوره‌های مختلف غنی‌سازی، فاژهای دارای قدرت اتصال بیشتر غربال شده و تکثیر شدند.

از طرف دیگر با بررسی تیتراژهای ورودی و خروجی دوره‌های مختلف غنی‌سازی معیاری به دست می‌آید که میزان غنی‌سازی را در هر دور تخمین می‌زند.



(ب)



دوره‌های غنی‌سازی

(الف)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
VEvhh1	QVQLQQSGGGSVQAGGSLRLSCAAS	G---RTYS	MGWFRQAPGKEREGVAR	IFTVIGATEY	57
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYA	MSWVRQAPGKGLEWVSX	ISXDGGXTYY	60
	FR3	CDR3	FR4		
VEvhh1	ADSVKDRFIISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAMYYC	AAKPRSNNVYWSLPHGYNV	WGQGT		117
VH	ADSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLRAEDTA-YYC	ARX-----XXXXXXXXXXFDY	WGQGT		114
	FR4				
VEvhh1	LVTVSS	123			
VH	LVTVSS	120			

(ج)

شکل 3 بررسی کیفیت غنی‌سازی و توالی آمینواسیدی VHH منتخب. (الف) بررسی تمایل فاژهای نمایشگر VHH های اختصاصی جدا شده علیه VEGF طی هر مرحله غنی‌سازی. (ب) مقایسه کلون‌های منتخب دوره‌های سوم و ششم غنی‌سازی از طریق PCR مستقیم از کلونی‌ها. (ج) توالی آمینواسیدی VEvhh1 و مقایسه با توالی آمینواسیدی VH انسانی. نواحی ثابت FR و بسیار متغیر CDR مشخص گردیده و جایگزینی‌های آمینواسیدی منحصر به فرد VHH ها در ناحیه FR2 متمایز شده‌اند. سیستم‌هایی که با رنگ طوسی مشخص شده‌اند تشکیل دهنده پیوند دی سولفید حفاظت شده در آنتی‌بادی‌ها می‌باشند.

آمینواسیدی، سه VHH مورد نظر بنابر فراوانی تکرارشان به ترتیب VEvh1، VEvh2 و VEvh3 نام‌گذاری شدند که توالی ژن آنها با شماره دسترسی LC010467، LC010468، LC010469 در بانک اطلاعاتی GenBank ثبت گردید. با توجه به اینکه بیشترین تکرارپذیری به VEvh1 تعلق دارد و این آنتی‌بادی در مقایسه با سایرین بیشتر غنی گردیده و تمایل و اختصاصیت زیادی به آنتی‌ژن موردنظر نشان داد، لذا این آنتی‌بادی برای ادامه مطالعات انتخاب شد. توالی آمینواسیدی VEvh1 در شکل 3-ج ارائه شده است.

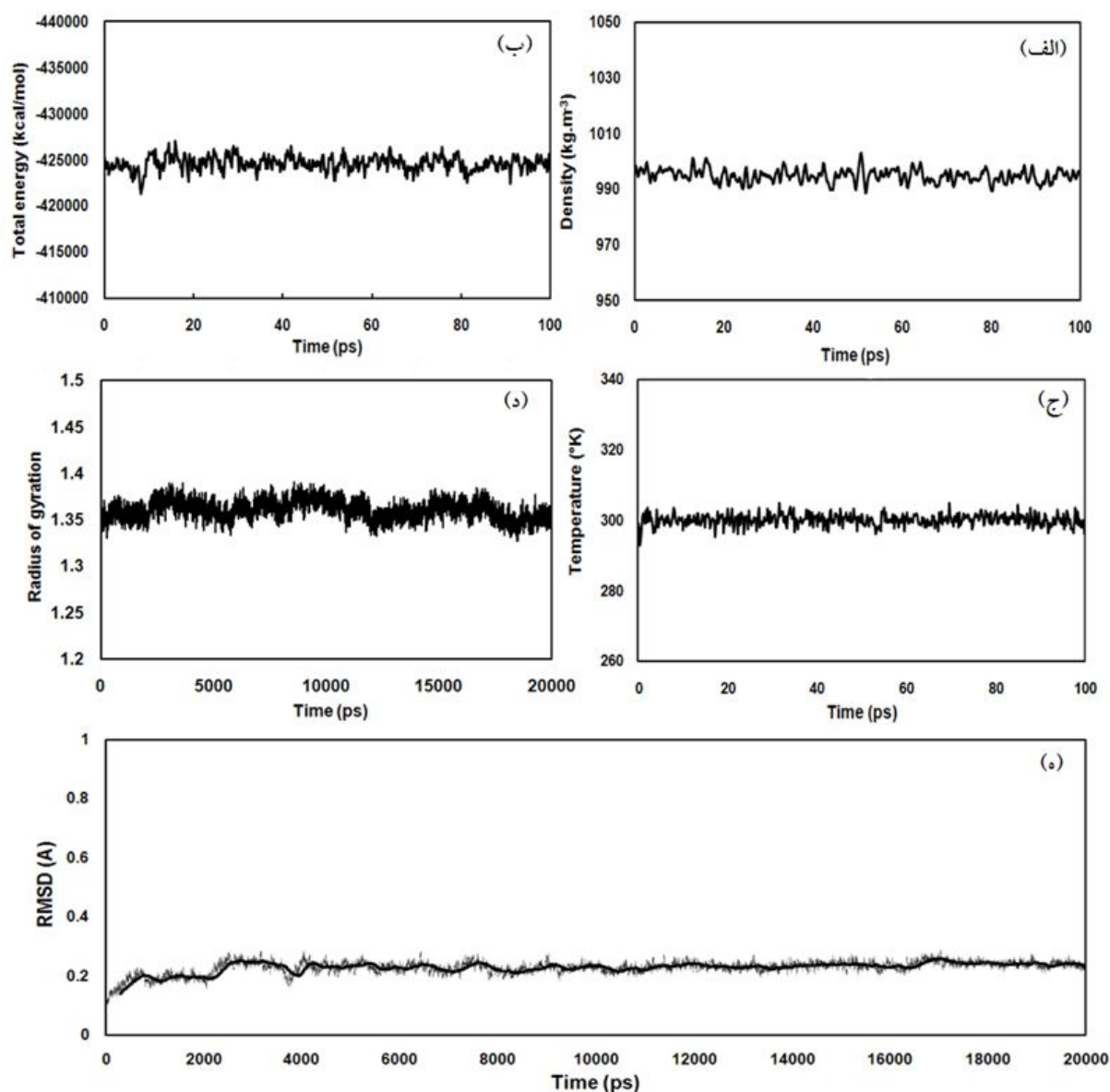
3-4- مدل‌سازی ساختار VHH

در فرایند مدل‌سازی از میان ساختارهای جستجو شده به‌عنوان الگو، آنتی‌بادی VHH علیه لیزوزیم انسانی با کد PDB: 1OP9 که حائز بیشترین درصد همسانی توالی (73 درصد) با VEvh1 بود، انتخاب گردید. مدل‌های ساختاری آنتی‌بادی VEvh1 ساخته شد و بر اساس نتایج حاصل از تست‌های تعیین کیفیت مدل (جدول 2)، مناسبترین مدل انتخاب و برای بهینه‌سازی ساختاری وارد فرایند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی شد. برای اطمینان از پایداری شبیه‌سازی انجام شده تغییرات انرژی کل، دما و چگالی در طی 100 پیکوثانیه شبیه‌سازی در فاز تعادل¹ در شرایط فشار ثابت مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که در شکل 4 ملاحظه می‌شود، پارامترهای مذکور در فاز تعادل رفتار ثابتی نشان می‌دهند که گواهی بر پایداری شبیه‌سازی انجام شده است (شکل 4-الف-ج). از طریق بررسی RMSD و شعاع ژیراسیون از پایداری ساختار و به تعادل رسیدن آن در طول 20 نانوثانیه شبیه‌سازی اطمینان حاصل شد. شعاع ژیراسیون که اطلاعاتی در خصوص فشردگی ساختار و حجم ماکرومولکول فراهم می‌کند، در طول زمان شبیه‌سازی ثابت بوده است (شکل 4-د). RMSD بین ساختارهای ایجاد شده در شبیه‌سازی در بعد

ردیابی ژن VHH در کلونی‌های خروجی هر دور غنی‌سازی از طریق PCR مستقیم از کلونی‌ها نیز نشان می‌دهد در دور چهارم 75 درصد کلونی‌ها حامل ژن آنتی‌بادی بوده‌اند، در حالی که در دور آخر غنی‌سازی این میزان به 100 درصد ارتقا یافته است (شکل 3-ب). تمامی نتایج بدست آمده مؤید موفقیت غنی‌سازی است. از آنجا که نتایج تست‌های مختلف حاکی از غنی‌سازی بیشتر گنجینه آنتی‌بادی‌های اختصاصی در دورهای پنجم و ششم می‌باشد، احتمال جداسازی نانوبادی‌هایی با تمایل و قدرت اتصال بیشتر به آنتی‌ژن اختصاصی در کلون‌های حاصل از این دورها بیشتر است. لذا برای غربال‌گری آنتی‌بادی‌های VHH مونوکلونال با بیشترین تمایل به آنتی‌ژن اختصاصی، تک کلون‌های حاصل از این دو دور غنی‌سازی مورد بررسی قرار گرفتند. 52 کلون از دورهای پنجم و ششم غنی‌سازی بطور تصادفی انتخاب گردیده، تکثیر یافته و فازهای مونوکلونال حاصل تخلیص شدند. نتایج الایزای فازهای مونوکلونال منتخب بر علیه دمین متصل شونده به گیرنده VEGF و مقایسه آن با نتایج مربوط به نمونه‌های کنترل نشان داد که 60 درصد کلون‌ها تمایل و اختصاصیت بالایی به آنتی‌ژن مورد نظر دارند. به این ترتیب که فازهای مونوکلونال با سیگنال الایزای سه برابر نمونه‌های کنترل به‌عنوان فازهای نمایشگر VHH‌های اختصاصی علیه دمین متصل شونده به گیرنده VEGF در نظر گرفته شدند. فازمیدهای نو ترکیب حامل ژن VHH از باکتری‌های آلوده به کلون‌های مونوکلونال غربال شده استخراج شدند، از طریق PCR مستقیم از کلونی‌ها تأیید و سپس برای تعیین توالی ارسال گردیدند. نتایج تعیین توالی نشان دهنده تنها سه توالی متفاوت برای 31 کلون غربال شده بود، به این ترتیب که 16 کلون متفاوت حامل ژن VHH کاملاً مشابه و 9 و 6 کلون متفاوت دیگر نیز توالی‌های تکراری مشابه از ژن VHH نشان دادند. پس از ترجمه توالی نوکلئوتیدی آنتی‌بادی‌های VHH به توالی

محاسبه و استخراج شد. همان‌طور که در شکل 4-ه مشاهده می‌شود، ساختارها پس از سپری کردن زمان 3 نانوثانیه در طی شبیه‌سازی به تعادل می‌رسند.

زمان از مهمترین معیارها برای اطمینان از پایداری ساختار است. تغییرات RMSD مربوط به اتم‌های زنجیره اصلی VEvh1 در طی زمان شبیه‌سازی نسبت به ساختار اولیه



شکل 4 بررسی پایداری شبیه‌سازی و ساختار شبیه‌سازی شده. تغییرات الف) چگالی، ب) انرژی کل، ج) دما در فاز تعادل‌سازی. تغییرات د) شعاع ژیراسیون و ه) RMSD در طول شبیه‌سازی

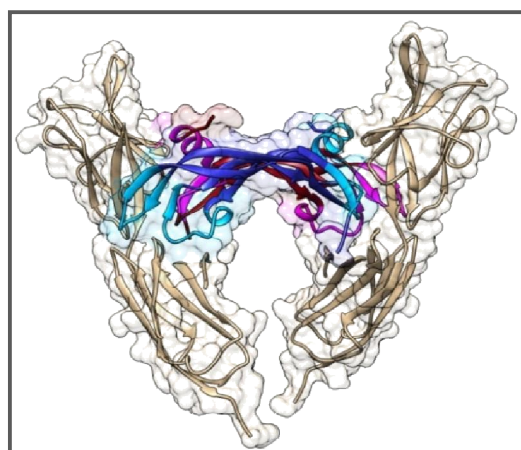
بنابراین ساختار شبیه‌سازی شده از پایداری قابل قبولی برخوردار و بهینه شده است.

3-5- پیشگویی جایگاه اتصال VHH بر روی آنتی‌ژن

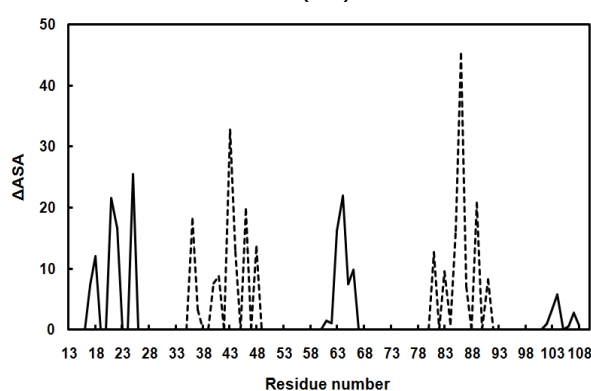
برای پیش‌بینی نحوه میانکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی فرایند

جدول 2 بررسی اعتبار مدل سه بعدی VEvh1 در مقایسه با الگو

Structure	Errat	Procheck	Verify 3D
VEvh1 (Model)	96/42	91/5	> %80
Template	84/82	96	> %80



(الف)



(ب)

شکل 5 شناسایی آمینواسیدهای عملکردی VEGF. (الف)

ساختار کریستال کمپلکس VEGF/VEGFR2 (کد PDB: 3V2A). VEGFR2 با رنگ قهوه‌ای و مونومرهای VEGF با رنگ‌های قرمز و آبی پررنگ نشان داده شده‌اند. جایگاه‌های اتصال به گیرنده VEGF در مونومر آبی رنگ با آبی کم‌رنگ و در مونومر قرمز رنگ با صورتی متمایز شده‌اند. هر مونومر VEGF از یک قطب با یک گیرنده و از قطب دیگر خود با گیرنده دیگر میانکشی می‌دهد. ساختار توسط نرم‌افزار CHIMERA نمایش داده شده است. (ب) اختلاف سطوح در دسترس آمینواسیدهای دو مونومر VEGF در حضور و عدم حضور گیرنده‌های VEGFR2. آمینواسیدهایی از دو مونومر VEGF که در اتصال به یک گیرنده نقش دارند توسط خط (—) و خط چین (---) از یکدیگر متمایز شده‌اند.

6-3- بررسی توانایی آنتی‌بادی در پوشاندن و بلوکه

کردن نواحی عملکردی VEGF

مطالعه جایگاه اتصال پیش‌بینی شده با نرم‌افزار Cluspro

شبیه‌سازی میانکشی بین مولکولی بدون هدف¹ توسط برنامه Cluspro انجام پذیرفت. برترین کمپلکس که حائز پایین‌ترین مقدار انرژی بوده و به پر جمعیت‌ترین دسته منتخب تعلق داشت، مورد بررسی قرار گرفت. در این کمپلکس آنتی‌بادی جایگاه اتصال به گیرنده VEGF را شناسایی کرده و به آن متصل می‌شود.

با محاسبه اختلاف سطوح در دسترس آمینواسیدهای VEGF در حضور و عدم حضور گیرنده با استفاده از ساختار کریستال کمپلکس VEGF/VEGFR2 (شکل 5). (الف)، آمینواسیدهایی از VEGF که در اتصال به VEGFR2 دخیل هستند، مشخص شدند. آمینواسیدهایی که بیشترین تغییر در سطوح در دسترسشان مشاهده می‌شود، بیشترین نقش را در اتصال به گیرنده ایفا می‌کنند (شکل 5-ب). نتایج نشان می‌دهد در اتصال همودایمر VEGF به یک گیرنده، محدوده آمینواسیدی 17-25 و 62-66 از یک مونومر و محدوده‌های آمینواسیدی 36-48 و 81-91 از مونومر دیگر در اتصال نقش دارند (شکل 5-ب).

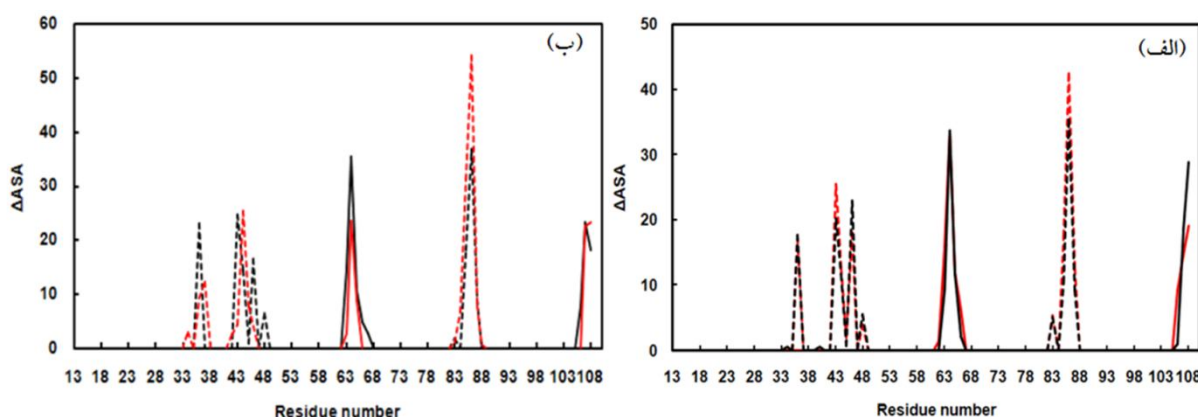
ضمن بررسی دقیق‌تر کمپلکس شبیه‌سازی شده با نرم‌افزار Cluspro و محاسبه اختلاف سطوح در دسترس VHH و VEGF در حالت کمپلکس و برای هر مولکول در حالت آزاد، آمینواسیدهایی که در اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به یکدیگر نقش دارند، نیز شناسایی شدند. مقایسه نمودارهای اختلاف سطوح در دسترس VEGF در کمپلکس‌های VEGF/VEGFR2 (شکل 5-ب) و VEGF/VEvhh1 (شکل 6-الف) نشان می‌دهد آمینواسیدهایی از VEGF که در اتصال به VEvhh1 نقش دارند، همپوشانی بالایی با آمینواسیدهای درگیر در اتصال به گیرنده VEGF دارند. ساختار کمپلکس شبیه‌سازی شده VEGF/VEvhh1 در شکل 7-الف نشان داده شده است.

1. Blind Docking

نشان داد آنتی‌بادی VEvh1 به جایگاه اتصال به گیرنده VEGF متصل می‌شود (شکل 7- الف).

در بررسی دقیق‌تر و هدفمندتری با نرم‌افزار HADDOCK تمایل آنتی‌بادی برای اتصال به آمینواسیدهای کلیدی درگیر در اتصال به VEGFR2 و توانایی آن در پوشش دادن و بلوکه کردن این آمینواسیدها مورد ارزیابی قرار گرفت. شبیه‌سازی میانکشی توسط HADDOCK در دو حالت انجام شد. ابتدا بدون هدف قرار دادن ناحیه خاصی از VEGF به آنتی‌بادی فرصت داده شد تا با محتمل‌ترین جایگاه اتصال به VEGF میانکشی دهد. کمپلکسی به‌عنوان کمپلکس برتر انتخاب شد که بالاترین امتیاز HADDOCK را به خود اختصاص داده، کمترین

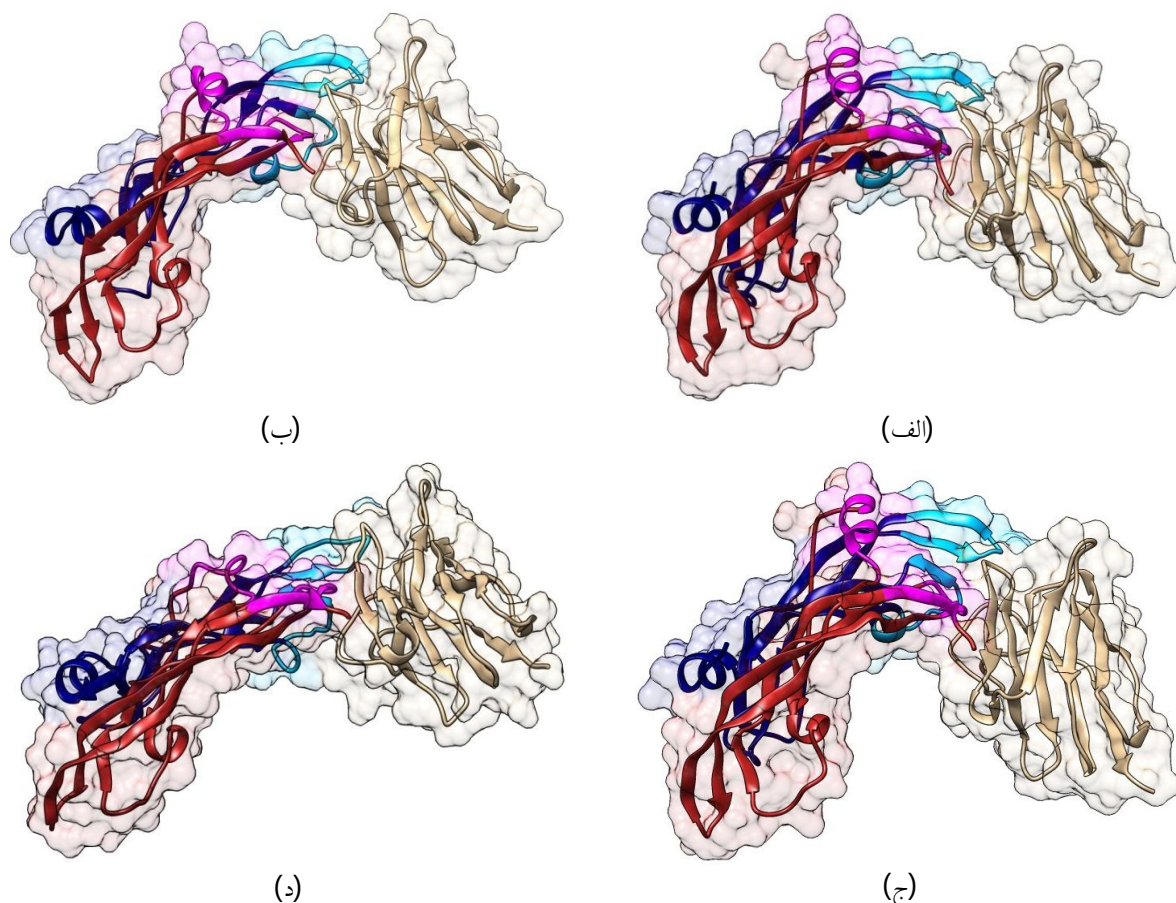
RMSD را نسبت به پایدارترین ساختار شبیه‌سازی شده دارا بوده و متعلق به پرجمعیت‌ترین دسته منتخب با HADDOCK می‌باشد. در موافقت با نتایج بدست آمده توسط Cluspro، در این کمپلکس نیز آنتی‌بادی به ناحیه عملکردی VEGF اتصال می‌یابد (شکل 7- ب). آنالیز سطوح در دسترس آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در حالت کمپلکس و آزاد نشان می‌دهد جایگاه اتصال در کمپلکس‌های منتخب برنامه‌های Cluspro و HADDOCK همپوشانی بسیار زیادی با یکدیگر داشته و لوپ‌ها و آمینواسیدهای مشترک و یکسانی در اتصال دو مولکول داک شده آنتی‌ژن و آنتی‌بادی نقش ایفا می‌کنند (شکل 6- الف).



شکل 6 بررسی جایگاه اتصال آنتی‌بادی VEvh1 بر روی آنتی‌ژن VEGF. (الف) اختلاف سطوح در دسترس آمینواسیدهای VEGF در حضور و عدم حضور آنتی‌بادی و همپوشانی جایگاه اتصال پیش‌بینی شده با cluspro و HADDOCK. نمودارهای مشکی و قرمز به ترتیب مربوط به شبیه‌سازی‌های داکینگ مولکولی توسط cluspro و HADDOCK می‌باشند. نواحی از دو مونومر مختلف VEGF که درگیر در اتصال به آنتی‌بادی‌اند، به وسیله خطوط و نقطه چین‌ها از هم متمایز شده‌اند. (ب) اختلاف سطوح در دسترس آمینواسیدهای VEGF در حضور و عدم حضور آنتی‌بادی و ثابت ماندن جایگاه اتصال پس از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. نمودارهای مشکی و قرمز به ترتیب مربوط به شبیه‌سازی داکینگ هدفمند به وسیله HADDOCK و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بعد از آن می‌باشند. نواحی از دو مونومر مختلف VEGF که درگیر در اتصال به آنتی‌بادی می‌باشند توسط خطوط و نقطه چین‌ها از هم متمایز شده‌اند.

جدول 3 محاسبه انرژی آزاد اتصال آنتی‌ژن/آنتی‌بادی و سهم انرژی‌های مختلف آن به وسیله آنالیز MM/PBSA. (واحد تمامی پارامترها kJ/mol است)

Complex	ΔE^{vdw}	ΔE^{elec}	ΔE^{pol}	$\Delta E^{non-pol}$	$\Delta E^{binding}$	TAS
VEvh1/VEGF	-365/1	-1443/8	732/5	-38/3	-1114/7	4339/02



شکل 7 ساختار کمپلکس VEGF/VEvhh1 پیش‌بینی شده توسط شبیه‌سازی میانکنش بین مولکولی. (الف) ساختار پیش‌بینی شده به وسیله cluspro. (ب) ساختار پیش‌بینی شده توسط HADDOCK. (ج) ساختار پیش‌بینی شده به وسیله شبیه‌سازی هدفمند HADDOCK. (د) ساختار کمپلکس پس از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. در تمامی ساختارهای کمپلکس آنتی بادی به جایگاه اتصال به گیرنده VEGF اتصال یافته است. مونومرهای VEGF با رنگ‌های قرمز و آبی پررنگ نشان داده شده‌اند. جایگاه‌های اتصال به گیرنده VEGF در مونومر آبی رنگ با آبی کمرنگ و در مونومر قرمز رنگ با صورتی متمایز شده‌اند. ساختارها توسط نرم‌افزار CHIMERA نمایش داده شده‌اند.

اتصال به گیرنده VEGF به‌عنوان آمینواسیدهای فعال VEGF در شبیه‌سازی میانکنش بین دو مولکول، نه تنها آنتی‌بادی VEvhh1 توانایی خود را در اتصال به لوپ‌های اتصال به گیرنده VEGF کاملاً حفظ کرده (شکل 7-ج)، بلکه در مقایسه با کمپلکس منتخب شبیه‌سازی قبلی، انرژی اتصال بالاتری حائز گردیده ($-486/73$ kcal/mol در مقایسه با $-423/65$ kcal/mol) و تمایل بیشتری برای اتصال به نواحی عملکردی VEGF نشان می‌دهد که خود مؤید صحت پیش‌بینی لوپ‌های اتصال به گیرنده VEGF به‌عنوان جایگاه

اگرچه سهم اتصال آمینواسیدهای یکسان تا حدودی با یکدیگر متفاوت است. این نتایج اطلاعات بدست آمده از شبیه‌سازی قبلی را تأیید می‌کنند.

در شبیه‌سازی هدفمندی توسط برنامه HADDOCK با تمرکز بر آمینواسیدهای دخیل در اتصال به گیرنده VEGF مطالعات دقیق‌تری در خصوص بلوکه شدن نواحی عملکردی VEGF توسط VEvhh1 انجام شد. آنالیز کمپلکس برگزیده (بر اساس معیارهای امتیاز HADDOCK، RMSD و جمعیت دسته‌های منتخب) نشان داد ضمن هدف قرار دادن آمینواسیدهای دخیل در

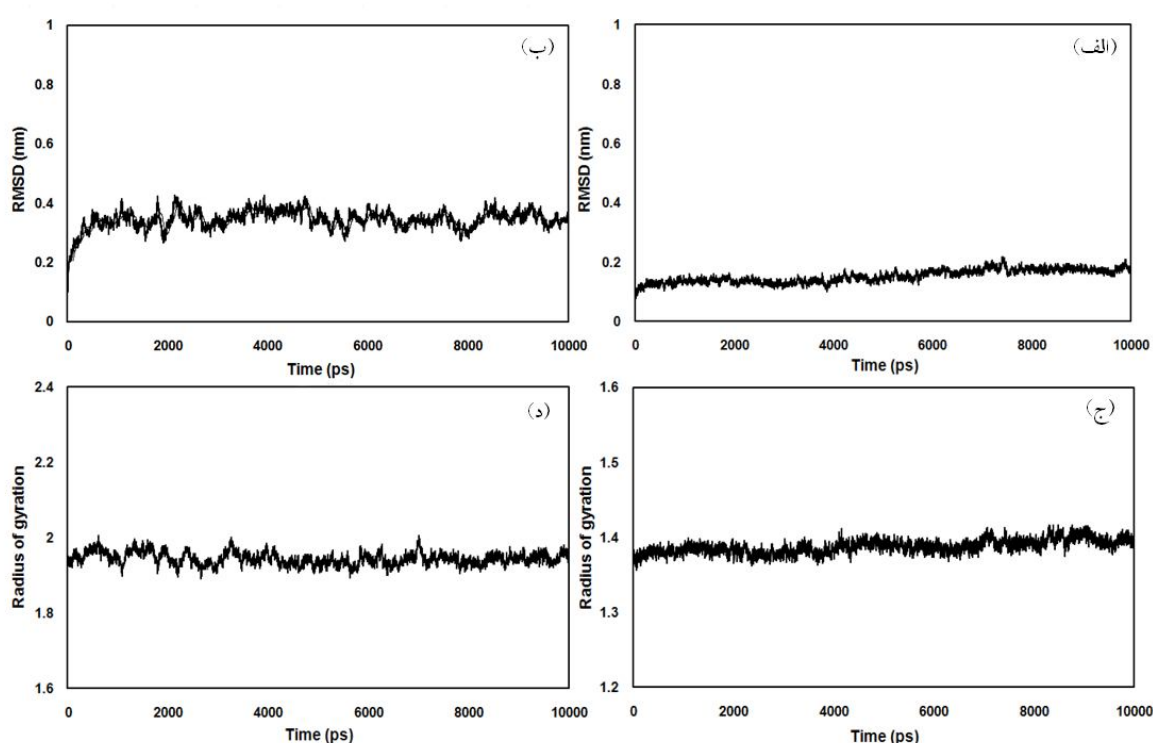
شبیه‌سازی در فاز تعادل، حاکی از پایدار بودن سیستم شبیه‌سازی است. نتایج حاصل از اختلاف سطوح در دسترس (شکل 6-ب) و بررسی ساختار پس از شبیه‌سازی (شکل 7-د) نشان می‌دهد که طی 10 نانوثانیه شبیه‌سازی جایگاه اتصال آنتی‌بادی بر روی آنتی‌ژن تغییر نکرده است. همچنین پایداری پارامترهایی مانند RMSD و شعاع ژیراسیون در طول مدت شبیه‌سازی نشان‌دهنده پایداری ساختار طی این فرایند است.

ثبات RMSD مولکول‌های آنتی‌ژن و آنتی‌بادی نشان می‌دهد که مکان اتصال این دو مولکول در طول مدت شبیه‌سازی تغییر نکرده است که بیانگر پایداری کمپلکس ایجاد شده می‌باشد (شکل 8-الف و ب).

اتصال آنتی‌بادی می‌باشد. بطور کلی نتایج نشان می‌دهند مکان پیش بینی شده، مکانی مناسب برای اتصال VHH با تمایل بالا به VEGF می‌باشد. بررسی اختلاف سطوح در دسترس کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی در حضور و عدم حضور آنتی‌بادی نشان می‌دهد آنتی‌بادی VEVhh1 ضمن اتصال به مولکول VEGF، اغلب آمینواسیدهای کلیدی مسئول در اتصال به گیرنده را پوشش داده و نقش بازدارندگی برای اتصال VEGF به گیرنده ایفا می‌کند (شکل 6-ب).

3-7- مطالعه پایداری کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی

برای بررسی پایداری کمپلکس تشکیل شده بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، فرایند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی 10 نانو ثانیه‌ای بر روی ساختار کمپلکس انجام شد. بررسی تغییرات انرژی کل، دما و چگالی در طی 100 پیکوثانیه



شکل 8 بررسی پایداری ساختار شبیه‌سازی شده. تغییرات RMSD (الف) و VEVhh1 (ب) VEGF طی 10 نانوثانیه شبیه‌سازی.

تغییرات شعاع ژیراسیون (ج) VEVhh1 و (د) VEGF طی شبیه‌سازی

شعاع ژیراسیون دو مولکول که اطلاعاتی در مورد فشردگی ساختار در اختیار قرار می‌دهد حکایت از پایدار بودن ساختار آنها در کمپلکس دارد (شکل 8- ج و د). تأیید مستدل دیگری بر پایداری کمپلکس، ثبات نمودار انرژی میانکشی بین VEGF و VEGH1 در طول شبیه‌سازی است. از ساختارهای ذخیره شده در بازه زمانی پس از به تعادل رسیدن شبیه‌سازی ساختار میانگینی بدست آمد که با تحلیل دقیق MM/PBSA انرژی آزاد اتصال و سهم انرژی‌های مختلف آن محاسبه شد (جدول 3). طبق اطلاعات جدول سهم انرژی الکتروستاتیک در مقایسه با انرژی واندروالس بسیار بیشتر است.

4- بحث

به دلیل نقش کلیدی رگ‌زایی در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک، کنترل این پدیده در روش‌های درمانی بسیار حائز اهمیت است. رگ‌زایی پاتولوژیک در رشد تومور، متاستاز، بیماری‌های ایسکمی، رتینوپاتی دیابتی، دژنراسیون ماکولا، آرتریت روماتوئید و پسوریازیس رخ می‌دهد [13]. در ارتباط با معضل سرطان و رشد تومور، فرایند رگ‌زایی لازمه غذا و اکسیژن‌رسانی به تومور و گذر آن از وضعیت نئوپلازیا به‌هایپرپلازیا بوده و در نهایت منجر به رشد هر چه بیشتر سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی می‌شود [31]. لذا امروزه هدف قرار دادن و مهار رگ‌زایی به‌عنوان راهکار مؤثری در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها و بخصوص سرطان مطرح است [32، 33]. از طرفی از آنجا که رگ‌زایی فیزیولوژیک در افراد بالغ فقط در فرایندهایی مانند ترمیم زخم و تولیدمثل رخ می‌دهد [13]، مهار این پدیده در مقایسه با بسیاری از هدف‌های دیگر عوارض کمتری برای فرد درمان‌شونده به همراه دارد.

فاکتورهای رشد متعددی در القاء پدیده رگ‌زایی نقش ایفا می‌کنند که مهمترین و کلیدی‌ترین آنها فاکتور رشد

اندوتلیال رگی (VEGF) است [14]. بیان این پروتئین همودایمر در تمامی شرایط پاتولوژیک نامبرده به شدت افزایش می‌یابد. 60 درصد سلول‌های سرطانی نیز با چنین راهکاری یعنی بیان و تولید بالای VEGF، رشد و متاستاز تومور را موجب می‌شوند. این فاکتور آنژیوژنیک ضمن القاء تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال، افزایش نفوذپذیری رگی، القاء بیان پروتئازها و گیرنده‌های آنها شرایط لازم برای وقوع رگ‌زایی را فراهم می‌کند [13]. با توجه به نقش اساسی VEGF به‌عنوان حیاتی‌ترین فاکتور دخیل در پدیده رگ‌زایی، این مولکول در زمره اهداف درمانی کلیدی قرار گرفته و مطالعات بسیاری در زمینه مهار آن انجام شده است. از استراتژی‌های مهار VEGF می‌توان به تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه VEGF و گیرنده‌های آن، طراحی موتانت‌های آنتاگونیست VEGF، آنتاگونیست گیرنده VEGF، گیرنده‌های محلول، مهار کننده‌های گیرنده‌های تیروزین کینازی، استراتژی‌های آنتی‌سنس و تولید آپتامر علیه VEGF اشاره کرد [12، 13]. فاکتور رشد اندوتلیال رگی ایزوفرم‌های مختلفی دارد که از لحاظ تعداد آمینواسیدها و قابلیت اتصال به هپارین ماتریکس خارج سلولی با یکدیگر متفاوتند و شامل VEGF₁₂₁، VEGF₁₄₅، VEGF₁₆₅، VEGF₁₈₉ و VEGF₂₀₆ می‌باشند [34]. این پروتئین متشکل از دو دمین به نام‌های دمین متصل شونده به گیرنده و دمین متصل شونده به هپارین است. دمین متصل شونده به گیرنده VEGF که در تمامی ایزوفرم‌های آن وجود دارد، شامل 110 آمینواسید انتهایی آمین بوده و فعالیت VEGF را به واسطه اتصال آن به گیرنده اش رقم می‌زند. VEGF از طریق اتصال به دو گیرنده تیروزین کینازی (VEGFR1 و VEGFR2 (Flk, KDR)، القاء دایمریزاسیون و فسفریلاسیون آنها نقش بیولوژیک خود را ایفا می‌کند [13، 35]. با وجود اینکه تمایل اتصال VEGF به VEGFR1 بیش از VEGFR2 می‌باشد، تقریباً تمامی

فعالیت‌های عملکردی VEGF را VEGFR2 وساطت کرده و عنوان می‌شود VEGFR1 فقط به‌عنوان تله‌ای برای به دام انداختن VEGF عمل می‌کند [36]. روش معمول درمان سرطان در چند دهه اخیر شیمی‌درمانی و رادیوتراپی بوده است که به دلیل ایجاد مقاومت دارویی و سمیت شدید سلولی در بافت‌های سالم، سعی بر اجتناب از این روش‌های درمانی است. از طرف دیگر داروهای شیمی‌درمانی به دلیل نفوذ ضعیف در توده توموری، قادر به درمان مؤثر تومورهای مهاجم نیستند. به‌منظور فایده‌آمدن بر چنین مشکلاتی، محققان بر روی روش‌های درمانی‌ای متمرکز شده‌اند که بطور اختصاصی سلول‌های بدخیم و تومورها را هدف قرار دهند [37].

در سال‌های اخیر درمان هدفمند به وسیله آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بسیار مورد توجه بوده و از مهم‌ترین و موفق‌ترین راهکارها در درمان بدخیمی‌های خونی¹ و تومورهای توپر² می‌باشد. از میان مکانیسم‌هایی که به وسیله آنها آنتی‌بادی‌های مونوکلونال سلول‌های توموری را از بین می‌برند، می‌توان به تأثیر مستقیم آنتی‌بادی بر سلول توموری (به‌عنوان مثال از طریق بلوکه کردن گیرنده)، مکانیسم‌های کشنده سلولی به وسیله سیستم ایمنی و یا اثر اختصاصی یک آنتی‌بادی بر رگزایی تومور اشاره کرد [38]. ماهیت بیماری‌های بدخیمی مانند سرطان رشد بدون وقفه، فرار از مرگ سلولی، توان همانندسازی نامحدود، القاء رگزایی و قابلیت متاستاز می‌باشد [37]. به علت اهمیت فرایند رگزایی در رشد، پیشروی و بقای تومور بسیاری از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال که در راستای درمان سرطان مورد تصویب سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) قرار گرفته‌اند، فاکتورهای رشد و یا گیرنده‌های این فاکتورها را هدف قرار می‌دهند [39]. از بین راهکارهای نام برده در زمینه مهار رگزایی القاء شده

توسط VEGF، موفق‌ترین استراتژی که برای درمان سرطان‌های متعدد به تصویب رسیده است، استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال علیه VEGF ((Bevacizumab (Avastin)) می‌باشد [41,40]. با وجود مزایایی که آنتی‌بادی‌ها به‌عنوان داروهای زیستی در درمان هدفمند سرطان از خود نشان می‌دهند، معایبی نیز همچون ایمنوژنیسیته، هزینه بالای تولید، اندازه بزرگ و به تبع آن عدم نفوذ مؤثر به بافت توموری دارند [4,3]. از ویژگی‌هایی که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای مؤثر واقع شدن در درمان سرطان باید داشته باشند، اختصاصیت، حلالیت بالا، پایداری و اندازه کوچک است. تلاش‌های بسیاری در راستای تولید قطعات آنتی‌بادی با اندازه کوچک، ضمن حفظ ویژگی اتصال به آنتی‌ژن صورت گرفته است که از دستاوردهای آنها تولید قطعاتی مانند Fab و scFv است. این قطعات نسبت به آنتی‌بادی‌های معمول برتری‌هایی مانند افزایش نفوذ توموری، کاهش ایمنوژنیسیته، تسهیل و تسریع تولید را دارند؛ اما به لحاظ جنبه‌هایی مانند پایداری، بازده بیان، تجمع و مقاومت نسبت به پروتئازها نیازمند ارتقای بیشترند [5-7]. قطعه Fab از آنتی‌بادی Bevacizumab بر علیه VEGF، با نام Ranibizumab تولید شد. این قطعه در درمان بیماری چشمی دژنراسیون ماکولا نسبت به bevacizumab موفق‌تر بوده، اما در درمان سرطان کارایی کمتری در مقایسه با آنتی‌بادی کامل از خود نشان داده است [18].

در خانواده شترسانان ایمنوگلوبولین‌های منحصر به فردی در سیستم ایمنی جاندار وجود دارند که فاقد زنجیره سبک‌اند. دمین VHH این آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین که وزن مولکولی حدود 15 کیلودالتون دارد، ضمن حفظ توانایی اتصال به آنتی‌ژن در حد آنتی‌بادی کامل، به علت خصوصیات استثنائی که از خود نشان می‌دهد، تمامی مشکلات مطرح شده در مورد آنتی‌بادی‌های معمول و قطعات مهندسی شده را هموار نموده است. پایداری و

1. Haematological Malignancies
2. Solid Tumor

حلالیت بالا، تولید آسانتر، اندازه کوچک، مقاومت قابل توجه نسبت به حرارت، دترجنت‌ها و پروتئازها، همولوژی زیاد با قطعه VH انسانی، تمایل بالا به آنتی‌ژن، سهولت روند انسانی کردن و مهندسی آن به شکل‌های چندظرفیتی از ویژگی‌های منحصر به فرد این آنتی‌بادی‌ها است [9.6-11]. به دلیل اندازه مولکولی کوچک VHH‌ها در مقایسه با سایر آنتی‌بادی‌ها انتظار می‌رود نفوذ آنها به تومورها و شبکه چشم بیشتر باشد. از طرف دیگر مشخص شده، بیان VEGF در سلول‌های توموری مغز افزایش یافته و رگ‌زایی را در تومور مربوطه القا می‌کند. از میان آنتی‌بادی‌ها VHH‌ها تنها گزینه‌ای هستند که از سد خونی-مغزی عبور می‌کنند. از این رو گمان می‌رود VHH‌های با توان مهار VEGF قادر باشند رگ‌زایی را در تومورهای مغزی نیز مهار کنند [43,42].

با توجه به اهمیت فوق‌العاده مهار رگ‌زایی در درمان سرطان و سایر بیماری‌ها، موفقیت چشمگیر آنتی‌بادی مونوکلونال علیه VEGF در این زمینه و برتری VHH‌ها نسبت به سایر آنتی‌بادی‌ها و قطعات متصل شونده به آنتی‌ژن، در این تحقیق تلاش گردید آنتی‌بادی VHH با اختصاصیت و تمایل بالا بر علیه VEGF تولید شود. دمین متصل شونده به گیرنده VEGF که در واقع توانایی عملکردی VEGF بیشتر در آن گنجانده شده و متضمن راه اندازی سیگنال آنزیم‌ها توسط VEGF است به عنوان ایمونوژن انتخاب گردید. محدود کردن آنتی‌ژن به دمین مذکور به جای کل مولکول VEGF احتمال جداسازی آنتی‌بادی‌هایی را که چنین ناحیه عملکردی مهمی را بلوکه کنند، افزایش داده و چون بر خلاف دمین متصل شونده به هپارین این دمین در تمامی ایزوفرم‌های VEGF وجود دارد، در نهایت آنتی‌بادی به دست می‌آید که بر علیه همه ایزوفرم‌ها فعال باشد. پس از بررسی میزان ایمنی‌زایی و محرز شدن ایمنی مطلوب حیوان توسط ایمونوژن مذکور، به تهیه کتابخانه فاژهای نمایشگر VHH اقدام شد. مراحل

ساخت کتابخانه چندین مرتبه تکرار گردید تا از غنی بودن خزانه آنتی‌بادی اطمینان حاصل شود. سپس فاژهای نمایشگر VHH‌های اختصاصی علیه VEGF در شش مرحله با شرایط سخت جداسازی انتخاب شدند. ضمن پیشروی دورهای غنی‌سازی، شرایط شستشوی فاژهای نمایشگر VHH که به VEGF متصل می‌شدند، نیز سخت‌تر گردید تا امکان جداسازی VHH‌هایی با اختصاصیت و تمایل بیشتر به آنتی‌ژن افزایش یابد. غنی شدن VHH‌های اختصاصی علیه VEGF به کمک روش‌هایی مانند الیزای فاژهای پلی‌کلونال و تعیین تیتراژهای خروجی غنی‌سازی تأیید گردید. از طرفی پس از غربال‌گری مونوفاژها توسط الیزای فاژ مونوکلونال و بررسی توانایی اتصال آنها به VEGF نیز مشخص شد افزایش سختی شرایط هر دور غنی‌سازی در واقع در جداسازی VHH‌هایی با قدرت اتصال بالا مؤثر واقع شده است. نتیجه تعیین توالی VHH‌های منتخب نشان داد 31 کلون غربال شده تنها 3 توالی متفاوت از VHH ارائه کرده و سایر توالی‌ها تکرار همان‌ها می‌باشند. این نتیجه نیز به نوعی مؤید غنی شدن کتابخانه فاژی بر علیه دمین متصل شونده به گیرنده VEGF است، چرا که تکرار پذیری در توالی‌ها نشان می‌دهد طی روند غنی‌سازی کلون‌هایی با اختصاصیت و تمایل بالا به آنتی‌ژن غربال شده‌اند که با وجود سخت‌تر شدن شرایط جداسازی در دورهای مختلف غنی‌سازی همچنان در اتصال به آنتی‌ژن اختصاصی موفق بوده‌اند. با توجه به اینکه VEvh1 بیشترین تکرار توالی را به خود اختصاص داده و در روند غنی‌سازی در رقابت اتصال به VEGF نسبت به سایر VHH‌ها کارایی بیشتری نشان داد، مطالعات بیشتری بر روی این آنتی‌بادی صورت گرفت. در بررسی توالی آمینواسیدی VEvh1، ویژگی‌هایی به چشم می‌خورد که مختص VHH‌ها بوده و در سایر انواع آنتی‌بادی دیده نمی‌شود. به عنوان مثال، در ناحیه FR2، آمینواسیدهای

V42, G49, L50 و W52 توسط (F/Y)42, E49, R50 و (G/F)52 جایگزین شده‌اند. VHH‌های شتری بخشی از پایداری خود را مدیون این جایگزینی‌ها بوده و موتاسیون برخی آمینواسیدهای هیدروفوب به انواع هیدروفیل در این ناحیه موجب می‌شود آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتری در غیاب زنجیره سبک همچنان محلول باقی مانده و کمتر تجمع یابند. بعلاوه CDR3 آنتی‌بادی‌های شتری به گونه‌ای استثنائی طویل است که ناحیه هیدروفوب FR2 را پوشش داده و حلالیت VHH‌ها را افزایش می‌دهد [44]. Vevhh1 نیز حاوی CDR3 طولی با 19 آمینواسید می‌باشد.

در ادامه مطالعه به پیشگویی جایگاه اتصال آنتی‌بادی Vevhh1 بر روی آنتی‌ژن پرداخته شده که لازمه آن در اختیار داشتن اطلاعات ساختاری دو مولکول مذکور بود. این امر با دسترسی به ساختار کریستال آنتی‌ژن در بانک اطلاعاتی پروتئین‌ها و ساخت مدل آنتی‌بادی با مدل‌سازی مقایسه‌ای میسر گردید. پس از ساخت مدل سه بعدی آنتی‌بادی، ساختار آن توسط شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بهینه گردید. با توجه به نقش مهم آنتی‌بادی‌ها در مطالعات پایه و نیز صنایع دارویی، کسب اطلاعاتی در مورد نحوه میانکنش آنها با آنتی‌ژن به درک چگونگی عملکردشان و همچنین طراحی مولکول‌های جدید با ویژگی‌های مطلوب کمک می‌کند. در این راستا شبیه‌سازی میانکنش مولکولی از متداول‌ترین روش‌های امروزی برای پیش‌گویی میانکنش بین دو مولکول است و از مزایای آن سریع و کم هزینه بودن می‌باشد. لذا با استفاده از برنامه شبیه‌سازی داکینگ بی‌هدف جایگاه احتمالی اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از شبیه‌سازی نشان می‌دهد که آنتی‌بادی به جایگاه اتصال به گیرنده VEGF متصل می‌شود. اما آیا ضمن این اتصال آنتی‌بادی قادر به بلوکه کردن و پوشش دادن آمینواسیدهای کلیدی این ناحیه یعنی آمینواسیدهای درگیر

در اتصال به گیرنده می‌باشد؟ برای پاسخگویی به این مطلب و نیز بررسی تمایل اتصال آنتی‌بادی به آمینواسیدهای کلیدی شبیه‌سازی میانکنش هدفمندی توسط نرم‌افزار HADDOCK صورت گرفت. اما پیش از آن در یک مطالعه مقدماتی، جایگاه کلی اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن توسط این نرم‌افزار نیز بررسی گردید. آنالیزها بطور کامل در موافقت با نتایج پیش‌گویی مرحله قبل می‌باشند. به این ترتیب که نه تنها جایگاه کلی پیش‌بینی شده اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی در کمپلکس‌های خروجی منتخب هر دو برنامه مشابه است، بلکه آمینواسیدهایی که در اتصال دو مولکول نقش ایفا می‌کنند نیز یکسانند. در مولکول همودایمر VEGF، مونومرها در جهت مخالف یکدیگر آرایش یافته‌اند، به گونه‌ای که اگر برای هر مونومر VEGF دو قطب مولکولی وجود داشته باشد، در حالت دایمر قطب اول یک مونومر در کنار قطب دوم مونومر دیگر قرار می‌گیرد و به‌عکس. به این ترتیب مولکول همودایمر VEGF دارای دو ناحیه اتصال به گیرنده متقارن است که در دو سمت دایمر قرار گرفته‌اند و هر یک شامل یک قطب از یک مونومر و قطب مخالف از مونومر دیگر می‌باشد. میانکنش این دو ناحیه متقارن متصل شونده به گیرنده VEGF منجر به دایمریزاسیون گیرنده می‌شود که لازمه فسفریلاسیون گیرنده تیروزین کینازی و راه‌اندازی آبشار سیگنال VEGF می‌باشد. برای شناسایی آمینواسیدهای VEGF که درگیر در میانکنش با گیرنده VEGFR2 می‌باشند، اختلاف سطوح در دسترس همودایمر VEGF در وضعیت اتصال و عدم اتصال به گیرنده بررسی شد. اختلاف سطوح در دسترس برای دو مولکول آنتی‌ژن و آنتی‌بادی نیز در حالت کمپلکس و آزاد محاسبه گردید و اطلاعاتی در مورد آمینواسیدهای دخیل در اتصال این دو مولکول در اختیار قرار داد. مقایسه نتایج این دو بررسی نشان داد آمینواسیدهایی از VEGF که درگیر در اتصال به مولکول آنتی‌بادی بوده و توسط

آمینواسیدهای مهم عملکردی VEGF در این ناحیه متصل می‌شود. میانکنش‌های الکتروستاتیک در رقم زدن تمایل بالای VEvh1 به آنتی‌ژن نقش بسیار مهمتری در مقایسه با میانکنش‌های واندروالس ایفا می‌کنند. از طرفی اتروپی مثبت نیز پارامتری تأثیرگذار در منفی‌تر شدن تغییرات انرژی آزاد کمپلکس و پایداری آن می‌باشد. در نهایت اطلاعات حاصل از این مطالعه VEvh1 را به عنوان کاندید ضد آنژیوژنزی معرفی می‌کند که قادر است با بلوکه کردن مهمترین جایگاه عملکردی VEGF، اتصال آن را به گیرنده‌اش مهار کرده و به تبع آن مانع وقوع رگزایی شود. تأیید این پیشنهاد نیازمند مطالعات و بررسی‌های بیشتر است.

5- سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان و دانشگاه تربیت مدرس برای فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی کمال تشکر را دارند.

6- مراجع

- [1] Lordick, F., C. Peschel, and J.R. Siewert, (2005). Antibody-based targeted therapy for gastric cancer. *Gastric Cancer*, 8(4): pp. 206-208.
- [2] Beck, A., et al. (2010). Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology*, 10(5): pp. 345-352.
- [3] Smolarek, D., O. Bertrand, and M. Czerwinski, (2014). Variable fragments of heavy chain antibodies (VHHs): a new magic bullet molecule of medicine? *Zmienne fragmenty przeciwciał ciężkołańcuchowych (VHH): nowa magiczna kula medycyny?* *Journal Cover*, 2014. 68.
- [4] Chames, P., et al., (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*, 157(2): pp. 220-233.
- [5] Quintero-Hernández, V., et al., (2007). The change of the scFv into the Fab format improves the stability and in vivo toxin neutralization capacity of recombinant

VEvh1 بلوکه و پوشانده شده‌اند، همپوشانی بسیار بالایی با آمینواسیدهایی دارند که در اتصال VEGF به گیرنده آن دخالت دارند. بنابراین انتظار می‌رود اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن مانع اتصال VEGF به گیرنده شده و فعالیت بیولوژیک پروتئین را مهار کند. شبیه‌سازی داکینگ هدفمندی با تمرکز بر آمینواسیدهای کلیدی عملکردی VEGF انجام گرفت. نتایج حاصل از این شبیه‌سازی بر نتایج شبیه‌سازی‌های داکینگ بی هدف صحه گذارده و نشان می‌دهد با هدف قرار دادن آمینواسیدهای درگیر در اتصال به گیرنده VEGF در شبیه‌سازی میانکنش بین دو مولکول، ضمن اینکه آنتی‌بادی همچنان به جایگاه پیش‌بینی شده قبلی متصل شده، انرژی اتصال آن به آنتی‌ژن افزایش یافته است. افزایش انرژی اتصال همچنین نشان‌دهنده تمایل بالای آنتی‌بادی برای اتصال به آمینواسیدهای مهم عملکردی VEGF است. در بخش بعدی مطالعات به کمک فرایند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بر روی کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی، پایداری کمپلکس و تمایل آنتی‌بادی در حفظ جایگاه اتصال به آنتی‌ژن ارزیابی شد. بررسی پارامترهای مختلف در ارتباط با سیستم و کمپلکس نشان داد در طول مدت شبیه‌سازی، پایداری کمپلکس حفظ شده و تغییر محسوسی در جایگاه اتصالی هیچ یک از دو مولکول آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در ساختار کمپلکس رخ نداده است که بیانگر تمایل بالای آنها نسبت به جایگاه اتصالشان می‌باشد. انرژی اتصال آنتی‌ژن و آنتی‌بادی نیز با آنالیز MM/PBSA محاسبه شد که مقدار مطلوب و قابل قبولی برای اتصال محکم نشان می‌دهد. این کمپلکس در شبیه‌سازی‌های داکینگ بی‌هدف و هدفمند برترین امتیازها و منفی‌ترین انرژی‌ها را کسب کرده و پس از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نیز انرژی میانکنش بالایی را بخود اختصاص داده است. تمامی نتایج مؤید این مطلب است که VEvh1 با تمایل بالا به ناحیه اتصال به گیرنده VEGF و خصوصاً

- bevacizumab and ranibizumab in age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *International journal of Ophthalmology*, 7(2): p. 355.
- [19] Ebrahimizadeh, W., et al., (2013). Isolation and characterization of protective anti-LPS nanobody against *V. cholerae* O1 recognizing Inaba and Ogawa serotypes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10): pp. 4457-4466.
- [20] Kulkeaw, K., et al., (2009). Human monoclonal ScFv neutralize lethal Thai cobra, *Naja kaouthia*, Neurotoxin. *Journal of Proteomics*, 72(2): pp. 282-270.
- [21] Eswar, N., et al., (2006). Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics*, pp. 5.6. 1-5.6. 30.
- [22] Van der Spoel, D., et al., (2010). Gromacs User Manual version 4.5. 4, Search PubMed: p. 69.
- [23] Kozakov, D., et al., (2013). How good is automated protein docking? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(12): pp. 2159-2166.
- [24] Kozakov, D., et al., (2006). PIPER: An FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 65(2): pp. 392-406.
- [25] Comeau, S.R., et al., (2004). ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, 20(1): pp. 45-50.
- [26] Comeau, S.R., et al., (2004). ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl 2): pp. W96-W99.
- [27] Brenke, R., et al., (2012). Application of asymmetric statistical potentials to antibody-protein docking. *Bioinformatics*, 28(20): pp. 2608-2614.
- [28] De Vries, S.J., M. van Dijk, and A.M. Bonvin, (2010). The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nature Protocols*, 5(5): pp. 883-897.
- [29] Rodriguez, R., et al., (1998). Homology modeling, model and software evaluation: three related resources. *Bioinformatics*, 14(6): pp. 523-528.
- [30] Massova, I. and P.A. Kollman, (2000). Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 18(1): pp. 113-135.
- [31] Folkman, J., et al., (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*, 1989. antibodies. *Molecular Immunology*, 44(6): pp. 1307-1315.
- [6] Cortez-Retamozo, V., et al., (2004). Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Research* (8)64: pp. 2853-2857.
- [7] Revets, H., P. De Baetselier, and S. Muyldermans, (2005). Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5(1): pp. 111-124.
- [8] Deschacht, N., et al., (2010). A novel promiscuous class of camelid single-domain antibody contributes to the antigen-binding repertoire. *The Journal of Immunology*, 184(10): pp. 5696-5704.
- [9] Unciti-Broceta, J.D., et al., (2013). Novel therapy based on camelid nanobodies. *Therapeutic Delivery*, 2013. 4(10): pp. 1321-1336.
- [10] Chakravarty, R., S. Goel, and W. Cai, (2014). Nanobody: The "Magic Bullet" for Molecular Imaging? *Theranostics*, 4(4): p. 386.
- [11] Veggiani, G. and A. de Marco, (2011). Improved quantitative and qualitative production of single-domain intrabodies mediated by the co-expression of Erv1p sulfhydryl oxidase. *Protein Expression and Purification*, 79(1): pp. 111-114.
- [12] Sousa Moreira, I., P. Alexandrino Fernandes, and M. Joao Ramos, (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition-a critical review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 7(2): pp. 223-245.
- [13] Ghavamipour, F., et al., (2014). Development of a highly-potent anti-angiogenic VEGF8-109 heterodimer by directed blocking of its VEGFR-2 binding site. *FEBS Journal*, 281(19): pp. 4479-4494.
- [14] Ferrara, N., (2004). Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The oncologist*, 9(Supplement 1): pp. 2-10.
- [15] Crawford, Y. and N. Ferrara, (2009). VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. *Cell and Tissue Research*, 335(1): pp. 261-269.
- [16] Ueda, Y., et al., (2003). A novel low molecular weight antagonist of vascular endothelial growth factor receptor binding: VEGA1155. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(11): pp. 110-115.
- [17] Su, Y., et al., (2012). Effect of angiogenesis inhibitor bevacizumab on survival in patients with cancer: a meta-analysis of the published literature. *PloS One*, 7(4): p. e35629.
- [18] Zhang, X.-Y., et al., (2014). Comparison of

- receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(8): pp. 2288-2297.
- [40] Hein, M. and S. Graver, (2013). Tumor cell response to bevacizumab single agent therapy in vitro. *Cancer cell International*, 2013. 13(1): p. 94.
- [41] Varol, U., et al., (2014). Tumor characteristics and metastatic sites may predict bevacizumab efficacy in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Molecular and Clinical Oncology*, 2(1): pp. 166-170.
- [42] Stockhammer, G., et al., (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is elevated in brain tumor cysts and correlates with tumor progression. *Acta Neuropathologica*, 100(1): pp. 101-105.
- [43] Li, T., et al., (2012). Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *The FASEB Journal*, 26(10): pp. 3969-3979.
- [44] Thueng-In, K., et al., (2012). Cell penetrable humanized-VH/VHH that inhibit RNA dependent RNA polymerase (NS5B) of HCV. *PloS One*, 7(11): p. e49254.
- 339(6219): pp. 58-61.
- [32] Cao, Y. (2004). *Antiangiogenic cancer therapy*. in *Seminars in cancer biology*. Elsevier.
- [33] Griffioen, A.W. and G. Molema, (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological Reviews*, 52(2): pp. 237-268.
- [34] Neufeld, G., et al., (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*, 13(1): pp. 9-22.
- [35] Tabernero, J., (2007). The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Molecular Cancer Research*, 5(3): pp. 203-220.
- [36] Suzuki, H., et al., (2010). VEGFR2 is selectively expressed by FOXP3^{high} CD4⁺ Treg. *European Journal of Immunology*, 40(1): pp. 197-203.
- [37] Majidi, J., et al., (2009). Target therapy of cancer: implementation of monoclonal antibodies and nanobodies. *Human Antibodies*, 18(3): pp. 81-100.
- [38] Scott, A.M., J.D. Wolchok, and L.J. Old, (2012). Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(4): pp. 278-287.
- [39] Tijink, B.M., et al., (2008). Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor