

تولید انبوه آنتی‌بادی مونوکلونال علیه پپتید خارج سلولی CD20 و ارزیابی اتصال اختصاصی آن به سلول‌های بیان‌کننده CD20

کوشان سینه سپهر^۱، بهزاد برادران^۲، جعفر مجیدی^۳، جلال عبدالعلی زاده^۴

تاریخ دریافت 1392/11/05 تاریخ پذیرش 1393/01/21

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: امروزه با پیشرفت فناوری هیبریدوما در تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال این امکان فراهم شده که به‌واسطه این مواد، مارک‌های مختلف سلولی در سطح سلول‌های نرمال و بدخیم ارزیابی گردد. CD20، فسفوپروتئین غیر گلیکوزیله، یک مارکر مناسب در تشخیص لوسمی و لنفوم‌ها می‌باشد که تقریباً در ۹۵ درصد از سلول‌های B نرمال و بدخیم به جز در سلول‌های اولیه و پلاسماسل، بیان می‌گردد. هدف این مطالعه تولید آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه مارکر CD20 و ارزیابی اتصال اختصاصی آن در سلول‌های بیان‌کننده CD20 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا موش‌های Balb/c در چهار نوبت با ۱۰۰ میکروگرم پپتید خارج سلولی CD20، ایمونیزه گردیدند و سپس فیوژن سلول‌های طحال ایمن‌ترین موش با سلول‌های میلومایی SP2/0 به‌وسیله پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) صورت گرفت. کلون مطلوب برای رقت‌سازی محدود (limiting dilution) انتخاب گردید. تولید انبوه آنتی‌بادی مونوکلونال به روش مایع آسیت صورت گرفت. تخلیص آنتی‌بادی مونوکلونال با روش افینیتی کروماتوگرافی پروتئین A انجام شد و با SDS-PAGE نیز تأیید گردید. اتصال اختصاصی آنتی‌بادی با ارزیابی‌های ایمونولوژیکی مثل الایزا و ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری صورت گرفت.

یافته‌ها: پس از انجام فیوژن سلولی و غربالگری کلون‌ها، یک کلون مطلوب با جذب نوری (OD) حدود ۲ در آزمون الایزا به دست آمد. با تخلیص مایع آسیت با ستون افینیتی کروماتوگرافی پروتئین A، ۵ میلی‌گرم آنتی‌بادی مونوکلونال خالص به دست آمد. نتایج SDS-PAGE خلوص محصول کروماتوگرافی را تأیید نمود. نتایج الایزا و ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری اتصال اختصاصی به CD20 را نیز تأیید نمود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که از آنتی‌بادی مونوکلونال تولیدشده علیه CD20 می‌توان در ارزیابی‌های ایمونولوژیکی نظیر الایزا و ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آنتی‌بادی مونوکلونال، CD20، افینیتی کروماتوگرافی، فلوسایتومتری

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره چهارم، ص ۳۷۲-۳۶۳، تیر ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران - تلفن: ۴۱۱۳۳۶۴۶۶۵

Email: behzad_im@ymail.com

مقدمه

۴۵-۴۰ درصد از لنفوسیت‌ها را شامل می‌گردند (۱). اختلالات نئوپلاستیک سلول‌های B در مراحل مختلف رشد سلول‌های B اتفاق می‌افتد. بنابراین لنفوم‌های سلول B در مورفولوژی، مکانیسم و بروز آنتی‌ژن‌های سطحی سلول B یا ایمونوفنوتایپ بسیار متفاوت هستند (۲-۵). یکی از مارک‌های سلول‌های B که می‌توان از آن برای روند تشخیص لوسمی و لنفوم‌های سلول‌های B و تمایز مراحل مختلف بلوغ سلول‌های

لنفوسیت‌های B به‌عنوان یکی از سلول‌های سیستم ایمنی می‌باشد که سهم عمده‌ای در بدخیمی‌های سلول‌های خونی دارد به‌طوری‌که در حدود ۷۵ درصد کل لوسمی‌های لنفوئیدی و ۹۰ درصد از کل لنفوم‌ها از سلول‌های B منشأ می‌گیرند. سلول‌های B منشأ سلولی ایمنی همورال هستند و در خون ۱۵-۱۰ درصد و در غدد لنفاوی ۲۵-۲۰ درصد و در طحال

^۱ کارشناس ارشد ایمنی شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی پزشکی، تبریز، ایران

^۲ استادیار ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استاد ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴ استادیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲۱ روز بعد از تزریق اول، تزریق یادآور انجام گرفت. تهیه آنتی‌ژن دقیقاً مشابه تزریق اولیه بود، با این تفاوت که در یادآوری‌ها از ادجوانت ناقص فروند استفاده گردید. آنتی‌ژن به‌صورت زیر جلدی در ناحیه پشت گردن و داخل صفاقی تزریق گردید. دومین تزریق یادآوری ۳ هفته پس از اولین تزریق یادآوری صورت گرفت. یک هفته قبل از انجام فیوژن، از ناحیه دم موش‌ها خون‌گیری به عمل آمد و تیتراژ آنتی‌بادی ضدپپتید به روش الایزا بررسی گردید. موشی که دارای بالاترین تیتراژ آنتی‌بادی بود، جهت انجام فیوژن انتخاب شد. سه روز قبل از انجام فیوژن، ۵۰ میکروگرم کونژوگه به‌صورت داخل وریدی (Intravenous Injection) بدون ادجوانت تزریق گردید.

آزمون الایزا/ELISA:

برای تعیین تیتراژ آنتی‌بادی ضد پپتید CD20 در موش‌های ایمن شده از روش الایزا استفاده گردید. ابتدا، چاهک‌های پلیت الایزا (Maxi sorp, Nunc, Denmark) با پپتید-BSA با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در طول شب و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، پوشانده شدند. پس از سه بار شستشو با بافر (PBS-T (0.05% Tween 20)، جایگاه‌های غیراختصاصی داخل هر چاهک با ۲ درصد (Bovine serum albumin) BSA مسدود گردید. پس از شستشوی مجدد، ۱۰۰ میکرو لیتر از رقت‌های مختلف سرم موش به چاهک‌های میکرو پلیت اضافه گردید. سپس سطح میکرو پلیت را با چسب نواری پوشانده و به مدت ۱ ساعت در 37°C قرار داده شد.

پس از شستشو، Rabbit-anti mouse IgG کونژوگه با آنزیم HRP (شرکت فرا طب) را $1/4000$ رقیق نموده، به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از آن به همه چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت ۶۰ دقیقه در 37°C انکوبه شد. پس از شستشو سوبسترای TMB (3, 3', 5, 5'- Tetra Methyl Benzidine) به همه چاهک‌های میکرو پلیت ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و در جای تاریک انکوبه گردید. واکنش رنگی پس از ۱۵ دقیقه، با اسیدسولفوریک ۵ درصد متوقف و جذب نوری (Optical Density) چاهک‌ها با دستگاه ELISA Reader (STAT FAX 303⁺) در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

فیوژن سلولی و تولید سلول هیبریدوما:

یک هفته قبل از فیوژن، سلول‌های SP2/0 میلوما موشی در محیط RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum, Gibco, U.S.A.) $100\ \mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین در انکوباتور 37°C با ۵ درصد CO_2 و رطوبت اشباع، تکثیر شدند. فیوژن سلول‌های طحال موش با سلول‌های SP2/0 با استفاده از Poly Ethylen Glycol

B استفاده نمود، CD20 می‌باشد که تقریباً در ۹۵ درصد از لنفوماهای سلول‌های B نیز بیان می‌گردد (۵-۸).

آنتی‌ژن CD20 یک فسفو پروتئین غشایی ۳۵ کیلو دالتونی است که بر روی pre-B و لنفوسیت B بالغ قرار گرفته است. CD20 در طول توسعه طبیعی سلول‌های B نسبت به مارکرهای دیگر دیرتر ظاهر می‌شود و مقدار غشایی آن به‌طور پیش‌رونده‌ای در طول تمایز افزایش می‌یابد، این شاخص در تنظیم چرخه سلولی، روند تکامل سلول و همچنین به‌عنوان کانال یون کلسیم نیز عمل می‌نماید (۹-۱۱).

در حال حاضر برای تشخیص و تعیین انواع زیرگروه‌های لنفوما و لوسمی‌ها می‌توان از آنالیز ایمونوفنوتایپیک مارکرهای سطحی لنفوسیت‌ها توسط آنتی‌بادی مونوکلونال استفاده نمود که میزان و نوع مارکر می‌تواند نشان‌دهنده نوع بدخیمی و مرحله‌ای که بدخیمی در آن قرار دارد باشد. در استفاده از این روش، فن رایج فلوسایتومتری می‌باشد که از آنتی‌بادی مونوکلونال کونژوگه شده با ماده فلورسانس برای تشخیص مارکرهای سطحی سلول‌ها استفاده می‌گردد. این فن به علت استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال دارای اختصاصیت و حساسیت بالایی است که حتی می‌تواند حضور آنتی‌ژن‌های سطحی را که مقدار آن‌ها کاهش یافته است را اندازه‌گیری نماید (۱۲-۱۴).

با انجام این تحقیق ما سعی در تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه CD20 را داریم تا بتوانیم از آن برای ارزیابی این مارکر در سطح سلول‌ها استفاده نماییم.

مواد و روش‌ها

ایمونیزاسیون:

ایمن‌سازی بر روی چهار موش ماده Balb/c صورت گرفت و یک پپتید سنتتیک از توالی N-terminal و خارج سلولی CD20 (SLVGPTQSF, Modmab, Sweden) انسانی به‌عنوان ایمونوژن انتخاب گردید و یک بنیان سیستمین برای تسهیل کونژوگاسیون با کریر در ناحیه C-terminus قرار داده شد سپس پپتید با Keyhole Limpet (KLH, Thermo, USA) کونژوگه شدند.

تزریق کونژوگه‌های پپتید به‌طور هم‌زمان به چهار موش و در چهار نوبت انجام گرفت. در نوبت اول، برای ایمونیزاسیون اولیه هر موش، ۱۰۰ میکروگرم کونژوگه پپتید-KLH را با ۱۰۰ میکرو لیتر از ادجوانت کامل فروند (Sigma-USA) مخلوط نموده و به هر موش امولسیون مذکور هم به‌صورت زیر جلدی و هم داخل صفاقی تزریق گردید.

PBS (buffered saline) شسته شده بودند به داخل صفاق هر موش تزریق گردید.

۱۰ روز بعد از تزریق سلول‌ها، مایع آسیت تشکیل شده و شکم موش‌ها بزرگ و پوست آن کاملاً کشیده شده بود. در این مرحله با فرو بردن سرسوزن ۱۹ به داخل صفاق موش، مایع آسیت قطره‌قطره در بشر جمع‌آوری گردید. تیتراژ مایع آسیت توسط روش الیزا بررسی گردید.

تخلیص مایع آسیت توسط افینیتی کروماتوگرافی با پروتئین A:

برای تخلیص مایع آسیت ابتدا از سولفات آمونیوم اشباع جهت تغلیظ و تخلیص نسبی استفاده شد و پس از یک شب دیالیز در مقابل PBS برای تخلیص بیشتر از افینیتی کروماتوگرافی A استفاده گردید.

ابتدا ستون Protein A-Sepharose با بافر PBS (pH:7.4, 100mM) شستشو داده شد تا pH بافر خروجی با ورودی یکسان شود. سپس چون کلاس آنتی‌بادی تولیدی از نوع IgG2a بود از بافر تعویض‌کننده (100mM citrate) بافر (buffer, 10mM Tris.Hcl pH:4.5) استفاده کرده و نمونه‌ها توسط fraction collector در لوله‌ها جمع‌آوری گردید. برای Elute سایر ایمونوگلوبولین‌ها از بافر گلیسین (0.1M glycine, PH:2.7) استفاده گردید. جذب لوله‌ها در ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. واکنش‌پذیری آنتی‌بادی تخلیص شده با CD20 روی سلول‌های Raji (10^6 cells/well) و BSA-پیتید (10 μ g/ml) به روش الیزا بررسی گردید.

تأیید خلوص آنتی‌بادی تولیدشده به روش SDS-PAGE: برای تأیید خلوص بودن آنتی‌بادی از SDS-PAGE استفاده شد که نمونه‌های خالص باهم مخلوط شده و در نهایت برای تأیید دوباره SDS-PAGE در شرایط احیا و غیر احیا گذاشته شد. (۱۰۰ میکروگرم) ۸۰ میکرو لیتر از آنتی‌بادی تخلیص شده با ۲۰ میکرو لیتر بافر نمونه مخلوط گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای جوش انکوبه گردید و روی یخ سرد گردید. الکتروفورز با غلظت ژل ۱۲/۵٪ توسط mini-PROTEAN electrophoresis instrument (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) با جریان ۱۰۰ ولت به مدت یک ساعت صورت گرفت و سپس ژل مربوطه با رنگ کوماسی بلو (Sigma) R250 رنگ‌آمیزی گردید.

کونژوگاسیون آنتی‌بادی با FITC: برای این کار ۲ mg/ml از آنتی‌بادی منوکلونال به ۴۵۰ میکرو لیتر بافر واکنش (pH = 9.2 500 Mm Carbonate) اضافه گردید و در مقابل PBS یک شبانه‌روز دیالیز انجام شد. ۱ میلی‌گرم

(Sigma) (PEG1450) و به نسبت ۵:۱ انجام شدند. سپس سلول‌های حاصل از فیوژن در محیط RPM I کامل حاوی ۲۰ درصد سرم جنین گاو و HAT(4x) در پلیت‌های ۹۶ خانه (Nunc, Denmark) در حجم ۱۰۰ میکرو لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور CO2 کشت داده شد. سوپر ناتانت چاهک‌ها ۱۰،۷،۴ و ۱۴ روز پس از فیوژن با محیط HAT4X(Sigma) تعویض گردیدند.

غربالگری و کلونینگ هیبریدوما‌ها:

۱۰ روز پس از کشت سلول‌ها، سوپرناتانت چاهک‌های حاوی سلول‌های هیبریدوما جمع‌آوری شدند و از نظر تولید آنتی‌بادی اختصاصی به روش الیزا مورد بررسی قرار گرفتند. برای این کار به‌طور خلاصه ابتدا چاهک‌های الیزا با ۱۰ μ g/ml از BSA-پیتید پوشیده شدند و سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی چاهک‌های حاوی سلول‌های هیبریدوما به چاهک‌ها اضافه گردید. از چاهک‌های دارای جذب بالا برای کلونینگ به روش رقت محدودکننده (Limiting Dilution) استفاده گردید. در این روش سلول‌ها به‌صورتی رقیق شدند که در هر ۱۰ میکرو لیتر یک سلول قرار بگیرد در نهایت سوپرناتانت تک کلون‌ها با استفاده از الیزا جهت تولید آنتی‌بادی غربالگری گردیدند و تک کلون با بالاترین جذب نوری به‌عنوان کلون مطلوب انتخاب گردید.

تعیین ایزوتایپ آنتی‌بادی:

برای تعیین کلاس و زیر کلاس زنجیره‌های سنگین و سبک آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولیدشده، از کیت الیزا، (Thermo, USA) استفاده گردید. ابتدا مایع رویی کلون به نسبت ۱ به ۱۰ با بافر TBS (Tris Buffer Salin) رقیق گردید. سپس ۵۰ میکرو لیتر از مایع رویی کلون رقیق‌شده به ۸ چاهک مشخص‌شده در کیت ریخته شد (هر یک از چاهک‌ها جهت مشخص نمودن یک ایزوتایپ خاص بکار می‌رود).

۵۰ میکرو لیتر از Goat Anti-Mouse IgG+IgA+IgM با هر چاهک ریخته شد. پس از انکوباسیون در دمای اتاق سوپر ترا TMB به هر چاهک اضافه شد. جذب چاهک‌ها با الیزا ریدر در ۴۵۰ nm اندازه‌گیری شدند و جذب بالای ۰/۲ به‌عنوان مثبت در نظر گرفته شد.

تولید انبوه آنتی‌بادی منوکلونال:

ابتدا ۴ موش Balb/c ۴ الی ۶ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سپس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر پرستان (SIGMA, P1403, UK) به‌صورت داخل صفاقی به هر موش تزریق گردید. ۱۰ روز بعد، سلول‌های هیبریدوما که کاملاً زنده و براق بودند به تعداد 1×10^6 سلول که دوبار با Phosphate

ALL بستری شده در بخش لوسمی بیمارستان شهید قاضی تبریز استفاده شد و از آنتی‌بادی تولیدشده کونژوگه با FITC و آنتی‌بادی تجاری (کنترل مثبت) جهت شناسایی CD20 در نمونه موردنظر استفاده گردید.

ابتدا سلول‌های منونوکلوئر خون فرد بیمار توسط فایکول جدا شد. سپس در دو لوله مجزا و در هر لوله به تعداد 10^6 سلول که در ۵۰۰ میکرو لیتر از PBS به صورت سوسپانسیون در آمده بود ریخته شد. سپس به مقدار مساوی از آنتی‌بادی تولیدشده و تجاری (Dako, Denmark) به لوله‌ها (آنتی‌بادی تولیدشده لوله شماره ۱ و آنتی‌بادی تجاری لوله شماره ۲) اضافه گردید و لوله‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردیدند پس از ۴۵ دقیقه سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD, USA) مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته‌ها

تیتراسیون سرم موش‌های ایمن شده به روش الیزا و با استفاده از پپتید BSA- نشان داد که موش‌ها پس از دریافت سومین دوز آنتی‌ژن، آنتی‌بادی با تیتراژ مناسب علیه پپتید موردنظر تولید کرده‌اند (جدول ۱). بعد از فیوژن، ۵ چاهک مثبت به دست آمد و ۳ چاهک جذب حدود ۱/۵ داشتند که یکی از آن‌ها برای LD استفاده گردید. از یک کلون استفاده شده برای LD یک کلون مطلوب (کلون 2-G8) دارای جذب ۱/۸ به دست آمد و در نهایت تمام مراحل ارزیابی با این کلون صورت گرفت.

(SIGMA) FITC در ۰/۱ میلی‌لیتر محلول Dimethyl DMSO (sulfoxide) بدون آب حل شد. از محلول فوق ۸ میکروگرم برداشته و به ۰/۱ میلی‌گرم آنتی‌بادی اضافه شده و به مدت یک ساعت روی روتاتور قرار داده شد. برای جلوگیری از کاهش فلورسانس ماده فلوروکروم اطراف لوله با فویل آلومینیومی پوشانده شد. برای حذف FITC غیر کونژوگه از آنتی‌بادی کونژوگه، محلول موردنظر به مدت یک شبانه‌روز در مقابل بافر نگهداری (10mM Tris, 150mM NaCl, 0/1% NaH₃PH: 8.2 دیالیز گردید.

رنگ‌آمیزی ایمنو فلورسانس:

سلول‌های Raji به‌عنوان سلول‌های CD20+ و سلول‌های Molt-4 به‌عنوان کنترل منفی تهیه شدند.

سلول‌ها در پلیت‌های جداگانه توسط گلو تار آلدهید 0.25% (glutaraldehyde) کوت شدند و بعد از شستشو (PBS-) از 2times (T) توسط فرمالدئید ۳/۷ درصد فیکس گردیدند سپس از 3% Skim milk برای بلاکینگ استفاده شد.

آنتی‌بادی کونژوگه تولیدشده با رقت ۱/۱۰۰۰ به مدت یک ساعت (پوشانده با فویل و روی روتاتور) به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از شستشو (PBS-T, 3times) در زیر میکروسکوپ فلورسانس بررسی شدند.

آنالیز CD20 در نمونه خون لوسمیک انسانی به روش فلوسایتومتری:

در این مرحله برای بررسی اتصال اختصاصی anti-CD20 به CD20 سطح سلول‌های خون انسانی، در شرایط پاراکلینیک از نمونه خون فرد مبتلا به (Acute lymphoblastic leukemia)

جدول (۱): نتایج بررسی ایمنوئیزاسیون موش‌ها به روش الیزا

Mouse	* NC	M 1	M 2	M 3	M 4
OD	۰/۱	۱/۲	۰/۹	۱/۱	۰/۸

× کنترل منفی (سرم موش ایمن نشده با رقت ۱/۸۰۰۰).
- کلیه سرم‌ها با رقت ۱/۸۰۰۰ می‌باشد.

گردید؛ که پس از ۱۰ روز شکم ۴ موش بزرگ شده و مایع آسیت تشکیل یافت. که به‌وسیله سروسوزن ۱۹ در مرحله اول حدود ۳ ml مایع آسیت به دست آمد و مجدداً بعد از ۳ روز حدود ۳ ml دیگر مایع آسیت جمع‌آوری گردید.

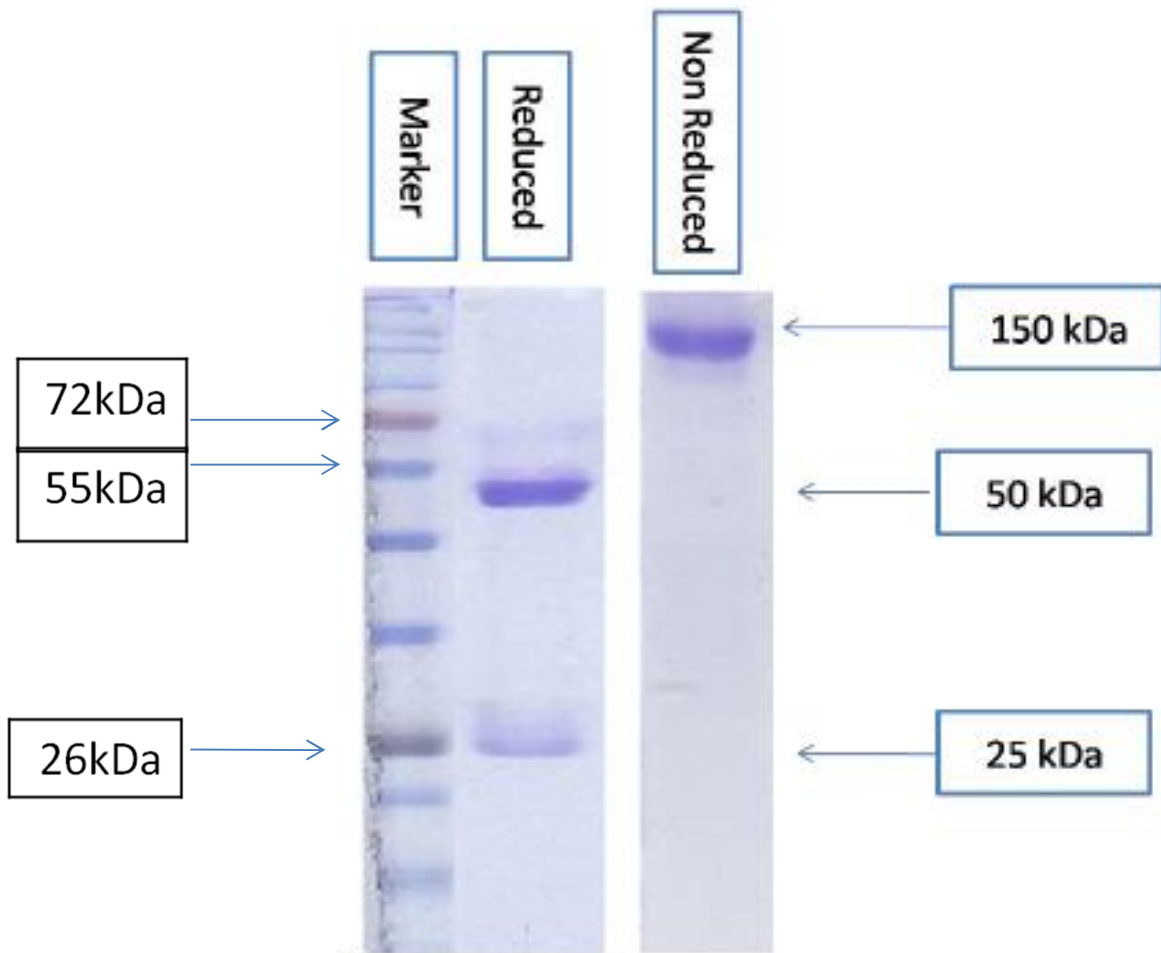
در پروسه تخلیص آنتی‌بادی در ابتدا غلظت پروتئین در مایع آسیت تولیدی حدود ۴۰ mg/۸ ml بود که در مرحله بعد، پس از تخلیص نسبی توسط سولفات آمونیوم اشباع و یک‌شب دیالیز در

ایزوتایپ آنتی‌بادی منوکلونال تولیدی با استفاده از مایع رویی تک کلون مطلوب توسط کیت الیزا انجام شد و نتایج نشان داد که آنتی‌بادی منوکلونال حاصل از کلون 2-G8 از کلاس IgG2a و دارای زنجیره سبک کاپا می‌باشد.

برای تولید انبوه آنتی‌بادی منوکلونال در مایع آسیت ۱۰ روز پس از تحریک صفاق ۴ موش با پرستان، تعداد $10^6 \times 1$ سلول از کلون مطلوب (2-G8) در حال رشد لگاریتمی به هر موش تزریق

SDS - PAGE در شرایط احیا و غیر احیا گذاشته شد. ۲ باند ظاهر شده در *SDS - PAGE* در شرایط احیا در موقعیت‌های ۲۵ و ۵۰ کیلو دالتون نشان‌دهنده زنجیره‌های سبک و سنگین می‌باشد. در شرایط غیر احیا نیز تنها باند ظاهر شده در موقعیت ۱۵۰ کیلو دالتون نشان می‌دهد که آنتی‌بادی به صورت خالص تولید شده است (شکل ۱).

مقابل بافر PBS، غلظت آن‌ها به ۱۸ میلی‌گرم کاهش پیدا کرد و در نهایت پس از شستن ستون افینیتی کروماتوگرافی توسط بافر سیترات در pH: ۴/۵، حدود ۵ میلی‌گرم آنتی‌بادی منوکلونال علیه CD20 با کلاس IgG2a به دست آمد. برای تأیید خالص بودن آنتی‌بادی از *SDS - PAGE* استفاده شد که نمونه‌های خالص باهم مخلوط شده و در نهایت برای تأیید دوباره



شکل (۱): *SDS - PAGE* آنتی‌بادی تخلیص شده در شرایط احیا و غیر احیا. در شرایط احیا دو باند، 50kDa (زنجیره سنگین) و ۲۵kDa (زنجیره سبک) و در شرایط غیر احیا تنها یک باند 150kDa (زنجیره سبک و سنگین) تشکیل گردید.

الایزا جذب نوری ۱/۷ برای پپتید - BSA و جذب نوری ۱/۵ برای سلول‌های راجی با رقت ۱/۱۶۰۰۰ آنتی‌بادی تخلیص شده نشان داد (جدول ۲).

تیتراژ آنتی‌بادی تخلیص شده و مایع آسیت و قابلیت شناسایی مارکر CD20 در سطح سلول‌های راجی و شناسایی پپتید توسط آنتی‌بادی تخلیص شده توسط تست الایزا بررسی گردید. نتایج

جدول (۲): بررسی مقایسه تیتراژ آنتی‌بادی در مایع آسیت و آنتی‌بادی تخلیص شده

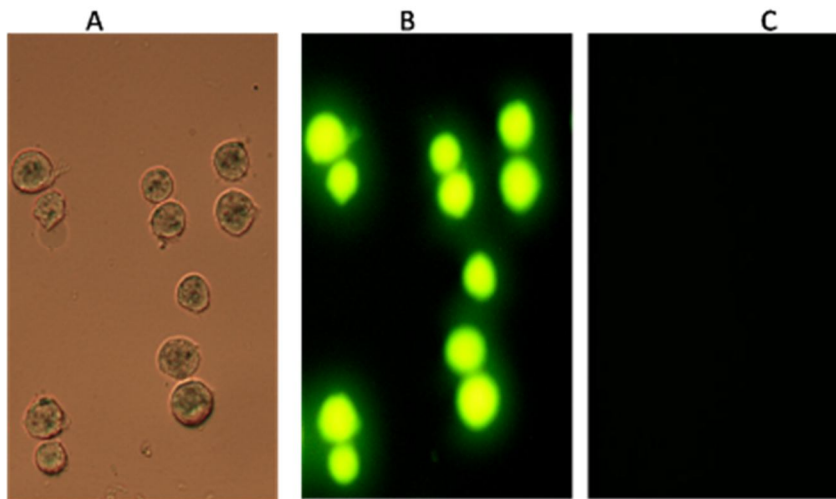
NC	NC*	PC**	Ascetic	Purified	Purified
(SP2/0)	(Non-immune mouse serum)	(Immune mouse serum)	fluid/BSA-Peptide (1/16000 dilution)	Antibody/BSA-Peptide (1/16000 dilution -	Antibody/Raji cell (1/16000 dilution-
۰/۰۷	۰/۰۱	۱/۲	۱/۰۸	۱/۷	۱/۵

× کنترل منفی (سرم موش ایمن نشده با رقت ۱/۸۰۰۰).

×× کنترل مثبت (سرم موش ایمن با رقت ۱/۸۰۰۰).

آنتی‌بادی کونژوگه شده با FITC انکوبه شدند که در نهایت باعث رنگ گرفتن سلول‌های Raji به صورت اختصاصی گردید (شکل ۲).

برای بررسی قابلیت استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس، سلول‌های Raji و Molt-4 با

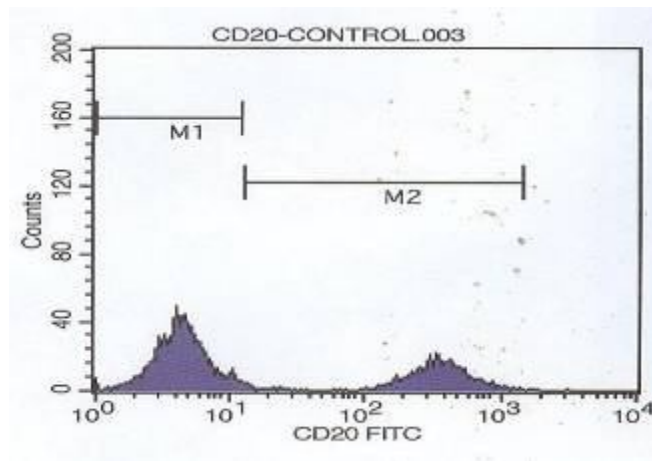


شکل (۲): رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس سلول‌های Raji با آنتی‌بادی تولیدشده

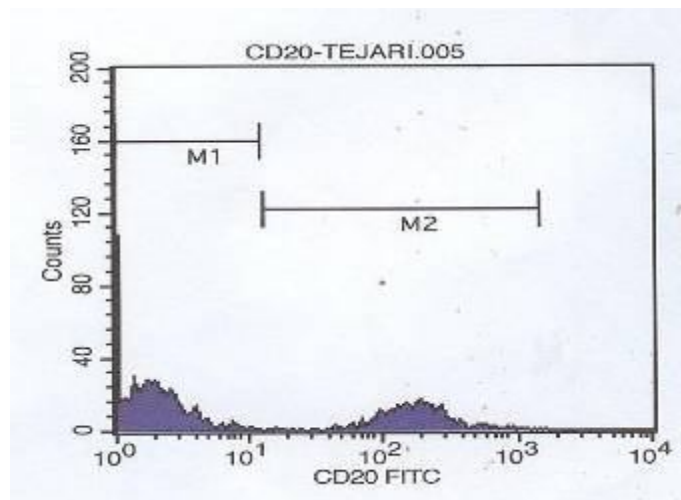
- A. نمای سلول‌های Raji قبل از رنگ‌آمیزی، با میکروسکوپ نوری (۲۰X)
 B. نمای سلول‌های Raji بعد از رنگ‌آمیزی، با میکروسکوپ ایمونوفلورسانس (۲۰X)
 C. نمای سلول‌های Molt-4 (کنترل منفی) بعد از رنگ‌آمیزی، با میکروسکوپ ایمونوفلورسانس (۲۰X)

آنتی‌بادی تولیدشده در مقایسه با آنتی‌بادی تجاری ۳/۶ درصد اختلاف دارد و این نتایج نشان‌دهنده این است که آنتی‌بادی تولیدشده تقریباً معادل آنتی‌بادی تجاری قدرت شناسایی مارکر CD20 در سطح سلول‌های خون انسانی در شرایط تشخیصی پاراکلینیک را دارد.

نتایج فلوسایتومتری نشان‌دهنده اتصال اختصاصی آنتی‌بادی به CD20 می‌باشد. در مقایسه نتایج، میزان CD20 در سلول‌های فرد بیمار توسط آنتی‌بادی تولیدشده در این طرح ۳۱/۳۰ درصد (شکل ۳) و توسط آنتی‌بادی تجاری ۳۴/۹۲ درصد گزارش گردید (شکل ۴). طبق نتایج به‌دست‌آمده توانایی شناسایی



شکل (۳): نتایج فلوسایتومتری نمونه بیمار توسط آنتی بادی تولیدشده: میزان CD20 در سلول های فرد بیمار، توسط آنتی بادی تولیدشده ۳۱/۳۰ درصد گزارش گردید.



شکل (۴): نتایج فلوسایتومتری نمونه بیمار، توسط آنتی بادی تجاری: میزان CD20 در سلول های فرد بیمار، توسط آنتی بادی تجاری ۳۴/۹۲ درصد گزارش گردید.

بحث و نتیجه گیری

امروزه ایمونوفلوروسانس سلول های خونی با استفاده از آنتی بادی منوکلونال کاربرد وسیعی در تشخیص و طبقه بندی اختصاصی لوسمی ها دارد و در واقع شناسایی هر مارکر سلولی توسط آنتی بادی های منوکلونال امکان شناسایی سلول خاصی را در جمعیت های مختلف سلولی که ممکن است از لحاظ شکل ظاهری و نمای میکروسکوپی مشابه و حتی غیرقابل تفکیک باشد فراهم می آورد. در حال حاضر استفاده از آنتی بادی های منوکلونال به عنوان یک ابزار اساسی برای تشخیص های ایمونولوژیک از قبیل

رنگ آمیزی ایمونوفلوروسانس، فلوسایتومتری، الایزا و... کاربرد گسترده ای دارد (۱۵، ۱۶).

در این پروژه، آنتی بادی های منوکلونال ضد CD20 با استفاده از پیتیدی که دارای بخشی از توالی ناحیه خارج سلولی CD20 بود، تولید و خصوصیات آن ها مورد بررسی قرار گرفت. در طراحی این پیتید، سکانس های هیدروفیل در سطح پیتیدها، مناسب بودن پیتید از نظر کونژوگاسیون و نداشتن واکنش متقاطع مورد توجه بوده است. برای افزایش ایمونوسیتی، پیتیدها با پروتئین حامل Kyhole limpet haemocyanin کونژوگه شدند. در تحقیقی مشابه Hadavi و همکاران نیز از پیتید نستین کونژوگه شده با

بودن روش تخلیص می‌باشد. برای بررسی قابلیت شناسایی و اتصال اختصاصی آنتی‌بادی مونوکلونال به CD20 از سه روش الایزا و رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری استفاده گردید. در روش الایزا برای بررسی قابلیت شناخت مارکر CD20 توسط آنتی‌بادی از سلول‌های راجی به‌عنوان سلول‌های بیان‌کننده CD20 استفاده گردید که OD بالا در الایزا نشان‌دهنده قابلیت شناخت CD20 می‌باشد.

همچنین برای بررسی قابلیت شناسایی پپتید توسط آنتی‌بادی، از کونژوگه BSA-پپتید استفاده گردید. علت استفاده از BSA در این مرحله به‌جای KLH حذف واکنش‌های متقاطع آنتی‌بادی با KLH بوده و در واقع نشان داده شد که جذب نوری خوانده‌شده در تست الایزا صرفاً ناشی از واکنش آنتی‌بادی با پپتید بوده است.

در رنگ‌آمیزی فلورسانس نیز سلول‌های راجی به‌عنوان کنترل مثبت و سلول‌های Molt-4 به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و ایجاد رنگ فلورسانس سبز در زیر میکروسکوپ فلورسانس نشانه شناخت CD20 توسط آنتی‌بادی می‌باشد.

ارزیابی اتصال آنتی‌بادی تولیدشده به مارکر CD20 در نمونه ALL به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری و مقایسه نتایج با آنتی‌بادی تجاری در مجموع نشان داد که آنتی‌بادی تولیدشده در این پروژه علاوه بر شناسایی اختصاصی CD20، قدرت مشابهی با آنتی‌بادی تجاری (با اختلاف کمتر از ۴ درصد) در شناخت این مارکر نیز دارد. در نهایت روش‌های مختلف ارزیابی اتصال اختصاصی نشان داد که این محصول علاوه بر اینکه توانایی شناخت اختصاصی CD20 در سطح سل لاین سرطانی را دارد توانایی شناسایی اختصاصی این مارکر را نیز در نمونه‌های خون بیماران لوسمیک در شرایط پاراکلینیک را دارا می‌باشد.

در مجموع به نظر می‌رسد آنتی‌بادی مونوکلونال تولیدشده در این طرح پژوهشی، واکنش گری خوبی علیه CD20 دارد و می‌توان از آن در آزمون‌های مختلفی نظیر الایزا و ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری جهت کاربردهای تحقیقاتی و تشخیصی استفاده نمود.

KLH برای ایمونیزاسیون استفاده نمودند و نتایج ایمونیزاسیون مطلوبی را کسب نمودند (۱۷). در نهایت پایش ایمونیزاسیون با طراحی الایزا صورت گرفت که OD بالا با تیتراژ ۱/۸۰۰۰ نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز بودن ایمونیزاسیون می‌باشد.

در مرحله فیورژن سلول‌های طحال با سلول‌های میلومایی SP2/0 از PEG استفاده شد و سلول‌ها به نسبت ۵ به ۱ مخلوط شدند. از کلون استفاده‌شده برای LD یک کلون مطلوب دارای جذب ۱/۸ به دست آمد و در نهایت تمام مراحل ارزیابی با این کلون مطلوب صورت گرفت.

جهت تحریک صفاق موش با پرستان مقدار مختلف از پرستان استفاده‌شده است ولی در این بررسی از ۰/۵ ml پرستان جهت تحریک صفاق موش استفاده گردید که نتایج خیلی خوبی به دست آمد و تعداد سلول‌های تزریقی به صفاق موش نیز بین ۰/۵ الی ۲ میلیون برای هر موش توصیه‌شده است (۱۸، ۱۹) که در این تحقیق استفاده از 1×10^6 سلول نیز نتیجه بهتری به دست آمد.

از مایع آسیت پس از گذراندن ۲ مرحله شامل تغلیظ با سولفات آمونیوم اشباع و تخلیص با افینیتی کروماتوگرافی پروتئین A، ۵ میلی‌گرم آنتی‌بادی خالص حاصل گردید. این مقدار آنتی‌بادی خالص از موش در مقیاس آزمایشگاهی و با هزینه کم از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا که با این مقدار آنتی‌بادی مونوکلونال می‌توان هزاران تست الایزا، ایمونوبلاتینگ، رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس و فلوسایتومتری انجام داد.

تخلیص به روش افینیتی کروماتوگرافی پروتئین A یک روش ارزان و درعین حال اختصاصی می‌باشد. درعین حال از زیرکلاس‌های IgG موش IgG2a و IgG2b با افینیتی زیاد ولی IgG1 و IgG3 به‌صورت خیلی ضعیف به پروتئین A متصل می‌شوند که با عنایت به مشخص بودن ایزوتایپ آنتی‌بادی تولیدشده (IgG2a) این روش ما را در تخلیص اختصاصی‌تر کمک نمود (۲۰). در مرحله بعد جهت تأیید خلوص، از SDS-PAGE در شرایط احیا و غیر احیا استفاده شد که وجود تنها یک باند kDa ۱۵۰ در شرایط غیر احیا و دو باند ۲۵ kDa و ۵۰ kDa در شرایط غیر احیا، خالص بودن محصول را قویاً تأیید نمود که نشانه مناسب

References:

1. Longo D. Harrison's Hematology and Oncology. 17th ed. McGraw-Hill Professional; 2010.
2. Carter RH. B cells in health and disease. Mayo Clin Proc. 2006. 81(3): 377-84.
3. Salem DA, Abd El-Aziz SM. Flowcytometric immunophenotypic profile of acute leukemia: mansoura experience. Indian J Hematol Blood Transfus 2012;28(2):89-96.

4. Missotten T, Tielemans D, Bromberg JE, van Hagen PM, van Lochem EG, van Dongen JJM, et al. Multicolor flowcytometric immunophenotyping is a valuable tool for detection of intraocular lymphoma. *Ophthalmology* 2013;120(5):991–6.
5. Lin Z-K, Zhang R, Ge Z, Liu J, Wu Y-J, Guo X, et al. (Characteristics of 4 specific target antigens in adult acute lymphoblastic leukemia). *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2013;21(2):289–95.
6. Boyd SD, Natkunam Y, Allen JR, Warnke RA. Selective immunophenotyping for diagnosis of B-cell neoplasms: immunohistochemistry and flow cytometry strategies and results. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013;21(2):116–31.
7. Tbakhi A, Edinger M, Myles J, Pohlman B, Tubbs RR. Flow cytometric immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphomas and related disorders. *Cytometry* 1996;25(2):113–24.
8. Tefferi A, Bartholmai BJ, Witzig TE, Li CY, Hanson CA, Philyky RL. Heterogeneity and clinical relevance of the intensity of CD20 and immunoglobulin light-chain expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1996;106(4):457–61.
9. Almasri NM, Duque RE, Iturraspe J, Everett E, Braylan RC. Reduced expression of CD20 antigen as a characteristic marker for chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 1992;40(4):259–63.
10. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today* 1994;15(9):450–4.
11. Press OW, Farr AG, Borroz KI, Anderson SK, Martin PJ. Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. *Cancer Res* 1989;49(17):4906–12.
12. Gunduz E, Celebioglu M, Meltem Akay O, Uskudar Teke H, Sahin Mutlu F, Gulbas Z. The role of flow cytometry in the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, granulomatous inflammation and reactive lymph node specimens. *J BUON* 2013;18(3):739–45.
13. Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, Sampol J. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. *Cytometry* 1996;26(2):137–47.
14. Stetler-Stevenson M. Flow cytometry in lymphoma diagnosis and prognosis: useful? *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;16(4):583–97.
15. Foon KA, Todd RF 3rd. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986;68(1):1–31.
16. Doggett RS, Wood GS, Horning S, Levy R, Dorfman RF, Bindl J, et al. The immunologic characterization of 95 nodal and extranodal diffuse large cell lymphomas in 89 patients. *Am J Pathol* 1984;115(2):245–52.
17. Hadavi R, Zarnani AH, Ahmadvand N, Mahmoudi AR, Bayat AA, Mahmoudian J, et al. Production of Monoclonal Antibody against Human Nestin. *Avicenna J Med Biotechnol* 2010;2(2):69–77.
18. Hoogenraad NJ, Wraight CJ. The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production. *Meth Enzymol* 1986;121:375–81.
19. Janz S, Püschel W, Raabe F, Storch H. Induction of plasma cell tumours with 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane) and paraffin oil (paraffinum perliquidum) in BALB/c mice simultaneously exposed to sustained antigenic stimulation with bovine serum albumin (BSA). *Arch Geschwulstforsch* 1987;57(1):25–30.
20. Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* 1978;15(7):429–36.

LARGE SCALE GENERATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST EXTERACELLULAR PEPTIDE OF CD20 AND EVALUATION OF SPECIFIC BINDING TO CD20 EXPRESSING CELLS

Koushan Sineh Sepehr¹, Behzad Baradaran^{2}, Jafar Majidi³, Jalal Abdolalizadeh⁴*

Received: 24 Jan, 2014; Accepted: 10 Apr, 2014

Abstract

Background & Aims: Nowadays, by advent of hybridoma technology in monoclonal antibodies production various cell markers could be evaluated in malignant and non-malignant cells. CD20, non-glycosylated phosphoprotein is as an ideal marker in leukemia and B-cell lymphoma diagnosis which is expressed on more than 95% of normal and neoplastic B-cells except for early B-cells and mature plasma. The prime aim of this study was to produce monoclonal antibody against CD20 and evaluation of specific binding to CD20 expressing cells.

Materials & Methods: First, Balb/c mice were immunized 4 times with 100µg peptide from extracellular domain of CD20. Spleen cells of the most immune mouse were fused with SP2/0 by Poly Ethylene Glycol (PEG). The desired clones were selected for limiting dilution (L.D). Large scale of monoclonal antibodies was produced by ascetic fluid method. Monoclonal antibody was purified by Protein-A-Sepharose column affinity chromatography then confirmed by SDS-PAGE. Afterward, evaluation of specific binding of these antibodies was determined by immunological assay such as ELISA and Immunofluorescence and flowcytometry.

Results: After cell fusion and screening, one desired monoclonal achieved with absorbance about 2. Protein-A-Sepharose column affinity chromatography yielded about 5 mg of purified monoclonal antibody. The SDS-PAGE results confirmed purification of antibody. The result of ELISA, direct immunofluorescence staining and flow cytometry confirmed specific attachment to CD20.

Conclusions: These results indicate that such monoclonal antibodies against CD20 can be used in diagnosis of CD20 in the cells surface by immunological assay such as ELISA and Immunofluorescence and flowcytometry.

Keyword: Monoclonal antibodies, CD20, Affinity chromatography, Flowcytometry

Address: Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Tel.: +98 411 3364665

Email: behzad_im@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2014; 25(4): 372 ISSN: 1027-3727

¹ MSc of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

² Assistant Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)

³ Professor, Medical Immunology Department, Immunology Research Center (IRC), Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

⁴ Assistant Professor, Clinical Biochemistry Department, Immunology Research Center (IRC), Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran