

ساخت کمپلکس نانوذره ویروسی / هرسپتین با استفاده از لینکرهای شیمیایی و ویروس ایکس سیب زمینی

ندا اسفندیاری*: دانشجو دکتری، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه تهران

مینا کوهی حبیبی: دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه تهران

مسعود سلیمانی: دانشیار، گروه هماتولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

محسن کریمی ارزنانی: استادیار، گروه پزشکی مولکولی انیستیتو پاستور ایران

غلامحسین مصاحبی: استاد، گروه گیاه پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر نگرشی نو در جهتی غیر از بیماری زایی در ویروس‌ها سبب شد، که از این ذرات در علم نانو تکنولوژی استفاده شود. به منظور کاهش عوارض جانبی دارو و کاهش هزینه‌های درمانی، استفاده از نانوذرات در هدفمند کردن مسیر اثر دارو وارد علوم پزشکی شده و جایگاه ویژه‌ای را در درمان بیماری‌ها از جمله سرطان به خود اختصاص داد. از جمله مزایای نانوذرات ویروسی می‌توان به سازگاری طبیعی، استراتژی تکثیر خودکفا و بهینه، قابلیت تجزیه و بالاختصاص قابلیت خالص‌سازی ارزان آن‌ها اشاره کرد. یکی از موارد استفاده از این نانوذرات ساخت کمپلکس نانوذره ویروسی/هرسپتین است. هرسپتین دارویی است که در درمان گروهی از بیماران مبتلا به سرطان پستان (HER2+) استفاده می‌شود.

روش بررسی: در این تحقیق هرسپتین با کمک لینکر شیمیایی EDC/Sulfo-NHS به نانوذرات رشته‌ای ویروس ایکس سیب زمینی متصل گردیده و نانوذره ویروسی دارویی ساخته شده با استفاده از تکنیک‌های SDS-PAGE، Western blot، Zetasizer، ELISA و میکروسکوپ الکترونی بررسی شد.

یافته‌ها: در آزمون SDS-PAGE و Western blot تشکیل باند ۸۲ کیلودالتون دال بر اتصال پروتئین پوششی ۲۷ کیلودالتونی ویروس ایکس سیب زمینی با باند سنگین آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون بود. آزمون الیزای طراحی شده اتصالات نانوذره ویروسی به آنتی‌بادی هرسپتین را نشان داد. در بررسی بار الکتریکی ذرات بوسیله دستگاه Zetasizer، ذرات کنژوگه بار الکتریکی $-۷/۰۵$ ، ذرات ویروس ایکس سیب زمینی $-۲۱/۴$ و هرسپتین $-۱/۴۸$ را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که نانوذره ویروس/هرسپتین بعد از تهیه، ساختار رشته‌ای خود را حفظ کرد. استفاده از این ذرات قادر به کاهش دوز مصرفی دارو و در نتیجه کاهش اثرات جانبی ناشی از دارو می‌شود.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات، نانوذرات ویروسی، ویروس ایکس سیب زمینی، هرسپتین، لینکرهای شیمیایی.

مقدمه

نانوتکنولوژی یکی از علوم نوپایی است که جایگاه ویژه‌ای را در درمان به خود اختصاص داده است. ذرات نانویی، ذراتی با قطر ۱۰-۱۰۰ نانومتر هستند که منشا شیمیایی و زیستی دارند. هدف‌گیری دقیق نقطه اثر دارو، آزاد شدن کنترل شده دارو، افزایش قابلیت انحلال داروها، کاهش عوارض جانبی و سمیت دارویی، جذب بهتر، هدف قرار دادن اختصاصی بافت یا توده بدخیم، طولانی بودن مدت زمان تاثیر دارو، کاهش دفعات تجویز دارو، کاهش سمیت دارویی به دلیل نیاز کمتر به مصرف دارو و کاهش هزینه‌های درمانی از مهم‌ترین مزایای استفاده از نانوذرات در درمان است. از مهم‌ترین نانوذرات شیمیایی می‌توان به نقاط کوانتومی (Quantumdots)، وزیکول‌های پلی‌مری (Polymer Vesicles)، لیپوزوم‌ها (Liposomes)، دندیمرها (Dendrimers) و پروتئین‌هایی با ساختار نانو اشاره کرد. عدم سازگاری بهینه‌زیستی و سمیت نانوذرات شیمیایی (۱۰-۱) سبب گردید که استفاده از نانوذرات زیستی مورد توجه قرار گیرد. نانوذرات ویروسی از گیاهان و یا حیوانات مشتق می‌شوند. نانوذرات ویروسی مشتق از گیاهان احتمال بیماری‌زایی کمتری را برای انسان داشته و نیز عوارض جانبی آن نسبت به نانوذرات ویروسی مشتق از حیوانات، کمتر است. تحقیقات نشان داد که می‌توان از کپسید ویروس‌های میله‌ای یا ایزومتریکی با واحدهای ساختاری چند بعدی به عنوان ذرات نانوزیستی در نانوتکنولوژی دارویی استفاده کرد (۱۲ و ۱۳). نانوذرات ویروسی میله‌ای و ایزومتریکی فاقد قدرت بیماری‌زایی با ساختارهای هندسی منحصر به فرد، منظم و یکنواخت به عنوان ناقلین پروتئین و یا سایر مولکول‌ها توجه محققین را به خود جلب نمود. یکی از مزایای این ساختارها اتصالات موثرتر و محکم‌تر این نانو ذرات با داروها یا سایر مولکول‌ها می‌باشد. دست‌کاری راحت ژنتیکی این ویروس‌ها سبب تولید گونه‌های جهش یافته گردیده است. در نوع جهش یافته مهندسی شده این کپسیدها لیزین و سیستئین در سطح قابل دسترس کپسید پروتئینی واقع شده و اتصال به کمک لینکرهای شیمیایی دو عملکردی هم‌سو و غیر هم‌سو (homo or hetero-biofunctional) امکان پذیر است (۱۴ و ۱۵). یکی از مهم‌ترین مزایای استفاده از نانوذرات ویروسی به جای نانو ذرات شیمیایی امکان اتصال

مولکول‌ها با دقت بالا در مقیاس کم با پروتئین کپسید این ذرات است. استفاده از ذرات ویروس‌های میله‌ای شکل به دلیل دارا بودن سطح محیطی بیشتر نسبت به پارتیکل‌های ایزومتریکی و همچنین پتانسیل بالا برای جایگاه‌های اتصال از توجه ویژه برخوردار بوده و بیشتر مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این دسته از ویروس‌ها به علت مسطح بودن ذره ویروسی، پیوندها به روش موثرتری تشکیل می‌گردند و در نتیجه حساسیت و اختصاصیت اتصال افزایش می‌یابد (۱۰).

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها بوده که تشخیص به موقع و یا زود هنگام آن درمان را امکان‌پذیر می‌نماید (۱۶). بر طبق آمار انیستیتو ملی سرطان ایالت متحده آمریکا، شیوع این سرطان در زنان یک به ازای هر هشت نفر زن است. آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین با نام تجاری تراستوزوماب در درمان نوع متاستاتیک سرطان پستان استفاده می‌شود. این دارو جهت درمان بیمارانی مورد استفاده قرار می‌گیرد، که در بررسی‌های آزمایشگاهی HER2/neu بوده و میزان پروتئین her2 بالایی را دارا می‌باشند.

در این تحقیق نانوذره ویروس گیاهی به عنوان ناقل داروی هرسپتین با اهداف ذکر شده، جهت استفاده در فاز درمانی سرطان پستان در بیماران HER2+ ساخته شد. جهت ساخت این نانوذره از ویروس گیاهی رشته‌ای انعطاف پذیر (Filamentous) ایکس سیب‌زمینی (Potato virus X) با ابعاد ۱۲×۵۱۵ نانومتر و وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون (Accession no.FH461343) و لینکر شیمیایی EDC/Sulfo-NHS استفاده شد. ویروس ایکس سیب‌زمینی در راسته Tymovirales و خانواده Alphaflexiviridae و جنس Potexvirus است (۱۷-۱۹).

مواد و روش‌ها

تهیه ویروس خالص:

برگ گیاهان *N. rustica*, *Nicotiana glutinosa* با ویروس ایکس سیب زمینی مایه زنی شده و به مدت ۲۰-۱۵ روز در گلخانه نگهداری شد. ۶۰-۵۰ گرم برگ گیاهان آلوده شده درون هاون چینی با افزودن ازت مایع

مرکاپتواتانل و ستون Spin Column Biogel p-10 (BioRad) به منظور توقف واکنش لینکر و نانوذره ویروسی و حذف نانوذرات و لینکرهای آزاد در مرحله اول (مرحله انکوباسیون نانوذره ویروس و لینکر) استفاده شد. در شکل شماره ۱ مراحل اتصال لینکر به ویروس و اتصال هرسپتین به آن مجموعه نشان داده شده است.

جدول ۱: مقادیر به کار رفته نانوذره ویروسی، هرسپتین و

لینکرها در بهینه سازی واکنش

Herceptin	Virus	EDC linker	Sulfo NHS linker
50 µg/µl	5 µg/µl	2mM	5 mM
50 µg/µl	5 µg/µl	4 mM	10 mM
50 µg/µl	5 µg/µl	8 mM	20 mM

مراحل انجام کار:

- اضافه کردن لینکرهای EDC/Sulfo-NHS به نسبت ۱ به ۲/۵ با غلظت‌های متفاوت در زمان‌های انکوباسیون مختلف به ویروس به منظور بهینه سازی غلظت لینکرها و زمان مناسب در محیط بافری (MES M=0.1, NaCl M=0.5, pH=6)

- توقف مرحله اول واکنش با استفاده از ۲ مرکاپتواتانل و حذف لینکرها و نانوذرات آزاد با گذراندن از ستون‌های spin column Biogel P-10 (BioRad)

- اضافه کردن آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین به میزان ده برابر محصول مرحله اول (نانوذره ویروس لینکر) با زمان‌های انکوباسیون مختلف جهت بهینه سازی واکنش در محیط بافری فسفات سدیم (0.1M, NaCl 0.1M, pH=7.5)

- حذف هرسپتین‌های آزاد در محیط با گذراندن از ستون‌های spin column Biogel P-10 (BioRad)

بررسی کارایی اتصال:

بررسی اتصال آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین به ذرات ویروسی PVX با استفاده از روش‌های ELISA، Sandwich، SDS-PAGE، Western blot و Zetasizer انجام گرفت.

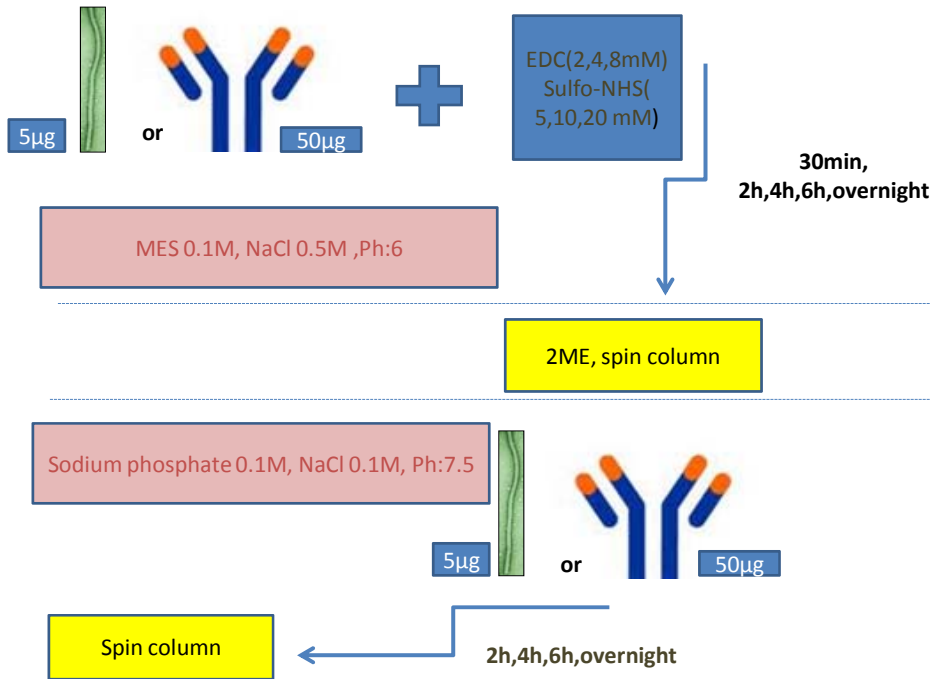
الف) ELISA: نانو پارتیکل‌های ساخته شده به وسیله آزمون الیزای ساندریجی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. الیزا به گونه‌ای طراحی گردید که آنتی‌بادی اختصاصی

خرد شد. عصاره‌گیری با افزودن ۱۲۰-۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=۸، ۰/۱ مولار، ۲- مرکاپتواتانل ۰/۰۲، ۰/۱۰٪ اتانل) عصاره‌گیری شد. محلول به دست آمده با سرعت ۷۸۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ۴°C سانتیفریژ گردید. به فاز رویی به دست آمده ترایتون اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در ۴°C انکوبه گردید. مجدداً با سرعت ۵۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریژ شد. رسوب حذف و بسته به حجم فاز روئی به دست آمده ۰/۲ مولار کلرید سدیم (NaCl) و ۰/۴ پلی اتیلن گلیکول (۸۰۰۰ تا ۶۰۰۰ PEG) اضافه شده، به مدت ۱ ساعت در ۴°C انکوبه گردید. با سرعت ۷۸۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتیفریژ شده و فاز روئی حذف شد. رسوب حاصل در ۸ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار با pH=۸ حاوی ترایتون ۰/۱ حل شده و با بالشک سوکروز ۰/۳۰ (w/v) در سرعت ۷۲۵۰۰ به مدت ۱۵۰ دقیقه سانتیفریژ و فاز رونی حذف گردید. رسوب حاصل در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH=۷/۲) حل شده و جذب ویروس در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. بعد از حصول اطمینان از کیفیت ویروس خالص شده و عدم وجود پروتئین‌های ناخواسته با استفاده از تکنیک SDS-PAGE، ویروس خالص شده در دمای ۲۰°C ذخیره شد (۲۰).

اتصال آنتی‌بادی هرسپتین به ویروس با کمک لینکرهای شیمیایی:

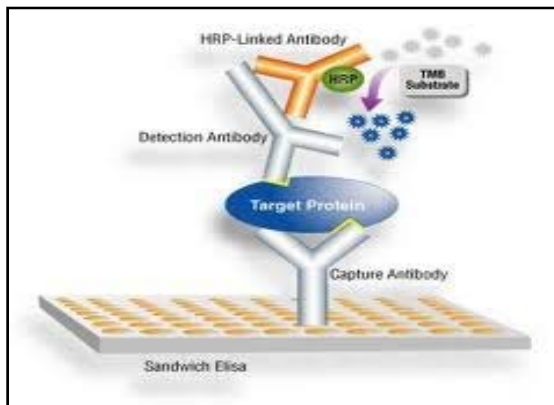
آنتی‌بادی هرسپتین قابل تزریق از شرکت Roche، لینکر شیمیایی EDC (۱- اتیل-۳-دی متیل آمینو پروپیل) کربودی آمید هیدروکلراید از شرکت Merck و لینکر Sulfo-NHS (Sulfo-N-hydroxysuccinimide) از شرکت Thermo خریداری شد.

به منظور بهینه‌سازی پروسه اتصال دو پروتئین هرسپتین و ویروس به لینکرهای شیمیایی، غلظت‌های متفاوت لینکرهای شیمیایی EDC و Sulfo-NHS با نسبت ۱ به ۲/۵ مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های به کار رفته در این تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده در بهینه‌سازی غلظت‌های به کار رفته با دستگاه زتاسایزر و روش وسترن بلات تأیید شد. قابل ذکر است که نسبت هرسپتین به نانوذره ویروسی ۱ به ۱۰ بوده و هم‌زمان بهینه‌سازی زمان انکوباسیون لینکر و پروتئین‌های نانوذره ویروسی و هرسپتین انجام گرفت. از ۲



شکل ۱: مراحل گنژوگه شدن نانوذره ویروسی و آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین با استفاده از لینکرهاى EDC/Sulfo-NHS در محیط بافری. زمان‌های آنکوباسیون و غلظت‌های متفاوت لینکرها در شکل نشان داده شده است.

کلریدریک است توقف واکنش انجام شد. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. تمامی آزمایشات با سه بار تکرار انجام گرفت. مراحل انجام الیزا ساندویچی در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: تصویر شماتیک اساس کار ساندویچ الیزا

ب) SDS-PAGE و Western blot: ژل SDS- (Ready Gel Tris-Hcl gel-161-1394) Biorad PAGE 8%-16% به صورت آماده از شرکت Biorad خریداری شد. نمونه‌های کنژوگه شده ویروس / هرسپتین، هرسپتین (به‌عنوان کنترل)، ویروس (به‌عنوان کنترل) و مارکر پروتئینی (prestained)

ویروس PVX (DSMZ, PV-0027) با غلظت ۱:۱۰۰۰ در بافر پوششی (pH=۹/۶) در کف پلیت الیزا ۹۶ خانه‌ای (Nunk Denmark) پوشش داده شده و آنتی‌بادی‌هایی که به ته چاهک نچسبیده بودند با شستشو حذف شد. فضاهای خالی بین آنتی‌بادی‌های چسبیده به ته چاهک با استفاده از ۲٪ PVP و ۱/۵٪ BSA در بافر PBST. بلوکه گردید. نانوذرات ویروسی حاوی مولکول‌های هرسپتین که در مرحله قبل ساخته شده بود به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای محیط آنکوبه شد. نانوذرات ویروسی متصل به هرسپتین آزادی که به آنتی-بادی پوشش داده شده در کف خانه‌ها متصل نشده بودند با شستشو حذف شد.

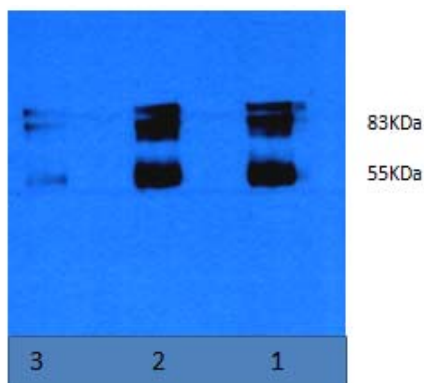
آنتی‌بادی پلی کلونال ثانویه انسانی متصل به HRP (secondary antibody to Goat polyclonal human IgG-HRP) ساخت شرکت abcam با غلظت ۱:۲۰۰۰ به چاهک‌ها اضافه شده و مدت یک ساعت آنکوبه شد. آنتی‌بادی پلی کلونال ثانویه انسانی آزاد با شستشو حذف شد.

سوبسترای TMB (Benzidine, Tetramethyl) اضافه گردید و پس از گذشت مدت زمانی واکنش با اضافه کردن بافر متوقف کننده که حاوی اسید

محلول اورانیل استات ۱٪ استفاده شد. ۴ میکرولیتر از محلول اورانیل استات ۱٪ به هم حجم آن از سوسپانسیون نمونه حاوی نانوذرات ویروسی/هرسپتین اضافه گردیده و بر روی گرید میکروسکوپ الکترونی انتقال داده شد. بعد از خشک شدن نمونه، گرید در زیر میکروسکوپ الکترونی (80 VJEM 1010 TEM (DSMZ, Germany) مورد بررسی قرار گرفته و عکس برداری شد. (چ Zetasizer از دستگاه زتاسایزر Malvern, NanoS ZEN 3600 به منظور بررسی بار الکتریکی و اندازه ذرات در رنج ۰/۶ تا ۶ نانومتر تا ۶ میکرون استفاده می‌شود. از این دستگاه در سنجش بار الکتریکی نانوذرات ویروسی/هرسپتین، هرسپتین و نانوذرات ویروسی استفاده شد. قابل ذکر است که اندازه‌گیری بار الکتریکی نانوذرات/هرسپتین در بهینه‌سازی غلظت لینکرهای EDC/Sulfo-NHS با نسبت ۱ به ۲/۵ نیز مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

نانوذره ویروسی تخلیص شده از برگ‌های آلوده با استفاده از SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت که باندی معادل ۲۷ کیلو دالتون را نشان داد. این وزن معادل وزن مولکولی پوشش پروتئینی این ویروس است. در بررسی غلظت مناسب لینکر و مدت زمان مناسب انکوباسیون لینکر و نانوذره ویروسی، وسترن بلات و بررسی بار الکتریکی با دستگاه زتاسایزر انجام شد. نتایج وسترن بلات نشان داد که نسبت غلظت مناسب EDC/Sulfo-NHS معادل ۴/۱۰ است که در شکل‌های ۳ تا ۵ نشان داده شده است.



شکل ۳: تصویر به دست آمده از وسترن بلات با آنتی‌بادی انسانی به منظور تعیین غلظت بهینه EDC/Sulfo-NHS. ردیف ۱ EDC/Sulfo-NHS معادل ۲ به ۵، ردیف ۲ معادل ۴ به ۱۰ و ردیف ۳ معادل ۸ به ۲۰ است.

(protein ladder, Thermo) با ولتاژ ۱۰۰ به مدت زمان ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد. الکتروفورز نمونه‌ها هم-زمان بر روی دو ژل با شرایط کاملاً یکسان صورت گرفت. عمل انتقال باندهای پروتئینی الکتروفورز شده از داخل ژل‌های SDS-PAGE به غشاهای نیتروسولوزی با ولتاژ ۳۵۰ میلی‌آمپر به مدت ۹۰ دقیقه در بافر مخصوص انتقال انجام گرفت. از رنگ Panceau S جهت رنگ‌آمیزی غشاهای نیتروسولوزی و قابل رویت شدن باندهای پروتئینی استفاده شد. بعد از حصول اطمینان از وجود باند پروتئینی مورد نظر، رنگ بری به وسیله بافر انتقال صورت گرفته و غشاها با استفاده از شیر خشک بدون چربی و بافر PBS در دمای محیط بلوکه شد. یکی از غشاهای نیتروسولوزی حاوی باندهای نانوذره ویروسی/هرسپتین، نانوذره ویروسی و هرسپتین با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس PVX (DSMZ, PV-0027) (غلظت ۱:۵۰۰) در طول یک شب مجاور گردید. این آنتی‌بادی قدرت اتصال به نانوذرات ویروسی با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون و نانوذرات ویروسی/هرسپتین با وزن مولکولی ۸۳ کیلودالتون را دارا است. به منظور قابل رویت کردن باندها از آنتی‌بادی ثانویه خرگوشی متصل به Goat HRP (polyclonal secondary antibody to rabbit IgG-HRP) ساخت abcam با غلظت ۱:۲۰۰۰ استفاده شد. باندهای اختصاصی نانوذره ویروسی (۲۷ کیلودالتون) و نانوذره ویروسی/هرسپتین (۸۳ کیلودالتون) با استفاده از کیت سوبسترای تجاری ECL مورد شناسایی قرار گرفت. مشاهده نتیجه آزمایش با قرار گرفتن غشا روی فیلم عکاسی به مدت یک دقیقه و ظهور فیلم انجام شد. غشا نیتروسولوزی حاوی باندهای نانوذره ویروسی/هرسپتین، نانوذره ویروسی و هرسپتین با آنتی‌بادی اختصاصی انسانی متصل به HRP (ساخت شرکت abcam) (غلظت ۱:۱۵۰۰۰) به مدت ۲ ساعت مجاور شد. این آنتی‌بادی قابلیت اتصال به مولکول هرسپتین با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون و نانوذره ویروسی/هرسپتین با وزن مولکولی ۸۳ کیلودالتون را دارا است. رنگ آمیزی با کیت ECL انجام گرفته و باندها با قرار گرفتن غشا روی فیلم عکاسی به مدت یک دقیقه و ظهور فیلم قابل رویت شدند.

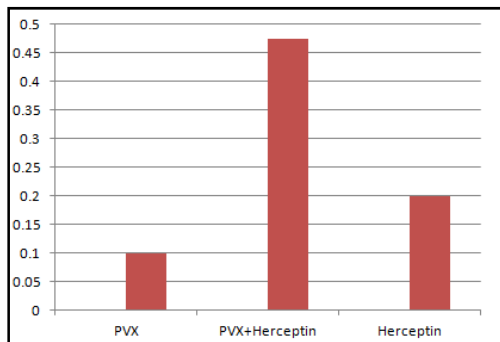
(چ مشاهده با میکروسکوپ الکترونی: به منظور مشاهده ساختارهای دست نخورده نانوذرات ویروس رشته‌ای با ابعاد ۵۱۵×۱۲ پس از سپری شدن پروسه‌های کنژوگاسیون، از

نانوذره ویروسی/هرسپتین بسته به غلظت هر کدام از لینکرها با حفظ نسبت ۱ (EDC) به ۲/۵ (Sulfo-NHS)، بارهای الکتریکی متفاوتی را نشان داد که در جدول شماره ۲ آورده شده است. گراف‌های به دست آمده از دستگاه زتاسایزر در شکل ۴ نشان داده شده است.

جدول ۲: بار الکتریکی کنژوگه نانوذره ویروسی/هرسپتین با غلظت‌های مختلف لینکر در بررسی با دستگاه زتاسایزر

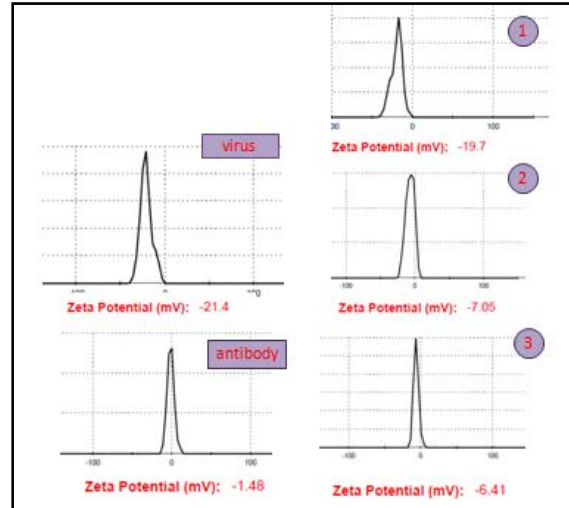
EDC/ Sulfo-NHS	بار الکتریکی
۲/۵	-۱۹/۷
۴/۱۰	-۷/۰۵
۸/۲۰	-۶/۴۱

خوانش الیزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر صورت گرفت. در آزمون الیزای ساندویچی چاهک‌هایی که حاوی کنژوگه نانوذره ویروسی/هرسپتین بودند جذب نوری بالاتری را در مقایسه با کنترل‌های هرسپتین و ویروس به تنهایی نشان دادند که در نمودار شماره ۱ آورده شده است.



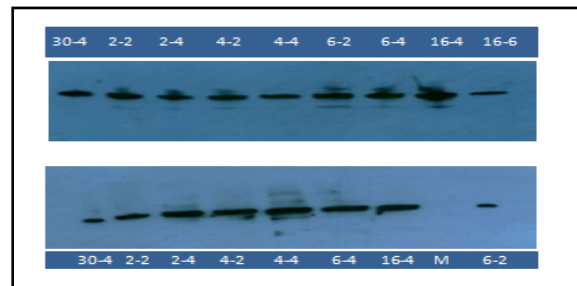
نمودار ۱: نتایج آزمون الیزا. ستون اول بیانگر جذب ویروس به تنهایی، ستون دوم کمپلکس نانوذره ویروس/هرسپتین و ستون سوم هرسپتین به تنهایی است.

در نتایج آزمون SDS-PAGE با استفاده از رنگ آمیزی پانسیو-اس در چاهک مربوط به هرسپتین دوباند ۲۵ کیلودالتون و ۵۵ کیلودالتون دیده شد که بیانگر حضور زنجیره سبک و سنگین آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین بود. در چاهک مربوط به ویروس تخلیص شده از برگ‌های آلوده (ویروس خالص) باند ۲۷ کیلودالتونی مربوط به پوشش پروتئینی ویروس دیده شد. در چاهک حاوی کنژوگه نانوذره ویروس/هرسپتین باند ۸۳ کیلودالتون



شکل ۴: تعیین بار الکتریکی ذرات به کمک دستگاه زتاسایزر به منظور تعیین غلظت بهینه EDC/Sulfo-NHS

۱: غلظت EDC/Sulfo-NHS معادل ۲ به ۵ با بار الکتریکی -۱۹/۷ (SD= ۱/۰۴)، ۲: معادل ۴ به ۱۰ با بار الکتریکی -۷/۰۵ (SD=۰/۱۰۳)، ۳: معادل ۸ به ۲۰ با بار الکتریکی -۶/۴۱ (SD=۰/۲۶) است. بار الکتریکی آنتی‌بادی هرسپتین و ویروس به تنهایی، به ترتیب -۱/۴۸ (SD=۰/۳۰) و -۲۱/۴ (SD= ۱/۳۲) به دست آمد.

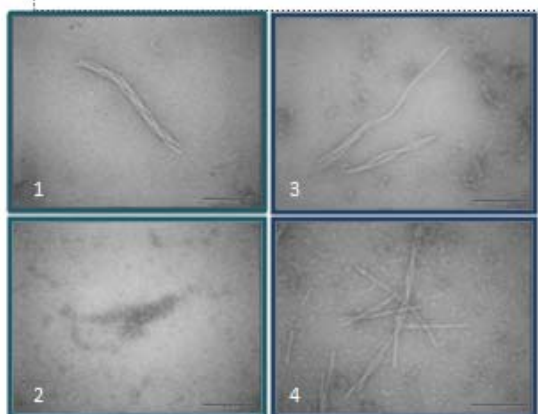


شکل ۵: بهینه سازی مدت زمان انکوباسیون مرحله اول و دوم اتصال لینکر EDC/Sulfo-NHS با استفاده از تکنیک وسترن بلات در زمان‌های مختلف که زمان مرحله اول از مدت زمان انکوباسیون مرحله دوم با خط تیره جدا گردیده است.

ردیف بالا وسترن بلات نانوذره-لینکر با آنتی‌بادی انسانی در زمان‌های مختلف انکوباسیون مرحله اول و دوم را نشان می‌دهد. ردیف پایین وسترن بلات نانوذره-لینکر با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس می‌باشد.

در بررسی بار الکتریکی هرسپتین و نانو ذرات ویروسی با زتاسایزر، بار الکتریکی هرسپتین -۱/۴۸ (با ضریب خطا ۰/۳۰) و بار الکتریکی نانوذرات ویروسی -۲۱/۴ (با ضریب خطا ۰/۳۲) به دست آمد، در حالی که بار الکتریکی

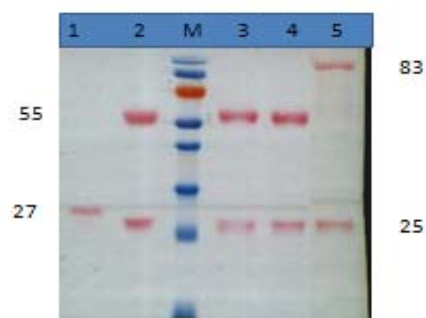
شکل سمت چپ با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس و سمت راست با آنتی‌بادی انسانی: چاهک ۱ مربوط به هرسپتین خالص که با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس بانندی مشاهده نمی‌شود. چاهک ۲ ویروس کنژوگه شده با هرسپتین با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ویروس ایکس سیب‌زمینی و مشاهده بانندی معادل ۸۳ کیلودالتونی مشابه وسترن بلات با آنتی‌بادی انسانی. چاهک ۳ ویروس خالص شده ایکس سیب‌زمینی و مشاهده تک باند معادل ۲۷ کیلودالتون که موید وزن پوشش پروتئینی این ویروس است. چاهک ۴ ویروس خالص که در برخورد با آنتی‌بادی انسانی بانندی مشاهده نمی‌شود. ردیف ۵ ویروس کنژوگه شده با هرسپتین و مشاهده باند ۸۳ کیلودالتونی ناشی کنژوگه شدن ویروس و هرسپتین. باند ۵۵ کیلودالتونی مربوط به زنجیره سنگین آنتی‌بادی با مقدار بسیار کمتر از ۸۳ کیلودالتونی در محیط مشاهده می‌شود. چاهک ۶ آنتی‌بادی هرسپتین به تنهایی. این آنتی‌بادی فقط قادر به شناسایی زنجیره سنگین است بنابراین در وسترن بلات فقط باند ۵۵ کیلودالتونی از هرسپتین قابل جداسازی است. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نشان داد که ساختار ویروس میله‌ای ایکس سیب‌زمینی بعد از کنژوگه شدن با هرسپتین با استفاده از لینکرهای شیمیایی، همچنان محفوظ باقی ماند. نتایج حاصل از این بررسی در شکل ۸ آورده شده است.



شکل ۸:

۱: مرفولوژی نانو ذره ویروس با استفاده از میکروسکوپ TEM و مشاهده پیکره رشته‌ای ویروس ایکس سیب زمینی با اندازه ۵۱۵×۱۲ نانومتر.
 ۲: عکس مولکول‌های هرسپتین.
 ۳ و ۴: نمونه‌های حاصل از کنژوگاسیون ویروس و هرسپتین و مشاهده حفظ ساختار ذرات میله‌ای ویروس پس از کنژوگه شدن.

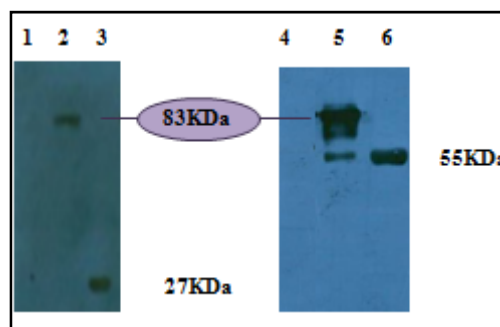
دیده شد. این باند بیانگر اتصال پوشش پروتئینی ویروس با زنجیره سنگین آنتی‌بادی هرسپتین است. نتایج SDS-PAGE در شکل شماره ۶ نشان داده شده است.



شکل ۶: اتصال و تغییر وزن پروتئین‌ها در ژل SDS-PAGE با استفاده از رنگ آمیزی پانسیو اس

ردیف ۱: پوشش پروتئینی ویروس خالص با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون.
 ردیف‌های ۲، ۳، ۴: آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین که شامل زنجیره سنگین با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون و زنجیره سبک با وزن ۲۵ کیلودالتون.
 ردیف ۵: ویروس کنژوگه شده با هرسپتین و مشاهده باند ۸۳ کیلودالتون.

نتایج به دست آمده از وسترن بلات دو غشا نیتروسولوزی دقیقاً با نتایج حاصل از SDS-PAGE هم‌خوانی داشت. وسترن بلات غشا نیتروسولوزی که در معرض آنتی‌بادی انسانی قرار گرفته بود، در چاهک مربوط به هرسپتین باند ۵۵ کیلودالتون و در چاهک مربوط به کنژوگه نانوذره/هرسپتین باند ۸۳ کیلودالتون را نشان داد. وسترن بلات غشا نیتروسولوزی که در معرض آنتی‌بادی اختصاصی ویروس قرار گرفته بود. در چاهک مربوط به ویروس خالص باند ۲۷ کیلودالتون و در چاهک مربوط به کنژوگه نانوذره ویروسی/هرسپتین باند ۸۳ کیلودالتون نشان داد. نتایج حاصل از وسترن بلات در شکل شماره ۷ نشان داده شده است.



شکل ۷: تصویر به دست آمده از آزمون وسترن بلات

بحث و نتیجه‌گیری

دارودرمانی یکی از مهم‌ترین مسائلی است که از دیرباز توجه دانشمندان و محققان را به خود جلب نموده است. هزینه‌های بالای درمانی ناشی از مصرف زیاد دارو از یک سو و عوارض جانبی مصرف دارو از سویی دیگر محققان را بر آن داشت تا با هدف‌گیری موثر دارو بر روی نقطه مورد نظر از مصرف دارو بکاهد. در این میان نقش حاملین یا ناقلین دارو که خود بر روی سلول‌های انسانی عوارض و یا بیماری نداشته باشند احساس شد. علم نانو تکنولوژی روزنه امیدی در درمان ایجاد کرد. ساخت نانوذرات شیمیایی و یا کشف نانوذرات بیولوژی مانند ویروس‌های گیاهی، اتصال دارو با واسطه لینکر شیمیایی به نانوذره مربوطه و استفاده از کمپلکس ایجاد شده در هدف‌گیری موثر درمان سبب کاهش بسیاری از عوارض جانبی داروها گردید.

آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین قابلیت شناسایی و اتصال به رسپتورهای سطحی سلول‌های HER2+ سرطان پستان را دارا است و لذا از آن در درمان این نوع از سرطان استفاده می‌شود. هدف‌گیری هم‌زمان مولکول‌های هرسپتین متصل شده بر روی نانوذره ویروس نه تنها سبب کاهش دوز مصرفی مورد نیاز در درمان شده بلکه پایداری هرسپتین به دلیل کاهش تجزیه شدن آن را نیز افزایش می‌دهد. مهم‌ترین نتیجه به دست آمده در هدف‌گیری موثر دارو علاوه بر کاهش هزینه‌های درمانی، کاهش عوارض جانبی دارو است.

علی‌رغم گزارش لوئیس و همکاران در سال ۲۰۰۶ مبنی بر سمیت آدنووایروس برای سلول حیوانی (۱۱)، یوکیانگ و همکاران در سال ۲۰۰۷ از نانوذره ویروسی آدنووایروس ولینکر EDC/Sulfo-NHS برای اتصال هرسپتین به آن استفاده کردند (۲۱). استینمتر و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ویروس رشته‌ای ایکس سیب‌زمینی به عنوان نانوذره استفاده کرده و نشان دادند که تعداد مولکول‌های فلورسانس متصل شده به سطح خارجی کپسید ویروسی افزایش یافته است (۲۲). آنان این خصوصیت را ناشی از سطح صاف پیکره ویروس رشته‌ای ایکس سیب‌زمینی در مقایسه با ویروس‌های ایزومتریک مانند ویروس موزائیک لوبیا چشم بلبلی دانستند. این گروه با تحقیقات خود نشان دادند که در ویروس‌های رشته‌ای و یا میله‌ای شکل به دلیل وجود پیکره‌ای با سطح صاف نسبت به ویروس‌های

ایزومتریک نه تنها امکان اتصال افزایش می‌یابد بلکه پیوندها نیز موثرتر خواهد بود.

مکانیسم اثر لینکرهای EDC/Sulfo-NHS اتصال عامل آمین به عامل کربوکسیل است. در این تحقیق از لینکر ذکر شده استفاده شد تا عامل کربوکسیل زنجیره سنگین هرسپتین به عامل آمین نانوذره ویروسی ایکس سیب-زمینی اتصال داده شود. لینکرهای شیمیایی EDC/Sulfo-NHS با غلظت ۴ به ۱۰ و مدت زمان چهار ساعت در مرحله اول (انکوباسیون ویروس و لینکر) و دو ساعت (انکوباسیون ویروس- لینکر و هرسپتین) جهت اتصال مولکول‌های آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین به کپسید نانوذرات رشته‌ای ویروس ایکس سیب‌زمینی استفاده گردید. نسبت غلظت لینکر EDC به Sulfo-NHS، ۱ به ۲/۵ بود (۲۳). مقدار لینکرهای به کار گرفته شده با حفظ نسبت غلظت آنها و مدت زمان به کار رفته جهت اتصال هرسپتین به نانوذره ویروس رشته‌ای سیب-زمینی برای اولین بار در این تحقیق انجام گرفت. انتخاب غلظت ۴ به ۱۰ لینکرهای EDC/Sulfo-NHS بر اساس نتایج زتاسایزر و وسترن بلات آورده شده در نتایج انتخاب گردید. در بررسی نتایج وسترن بلات، باندهای نمایان شده در رقت اول و دوم سریالی تفاوتی نشان نداد در حالی که در نتایج زتاسایزر رقت سریالی دوم و سوم تفاوت چندانی نداشتند. با مقایسه این دو نتیجه ترجیح داده شد که از رقت سریالی دوم با نسبت ۴ به ۱۰ استفاده گردد.

به منظور بررسی خاصیت بیماری‌زایی کمپلکس نانوذره ویروس/هرسپتین در گیاه *N. rustica*، کمپلکس حاصله بر روی برگ گیاه محک *N. rustica* تلقیح شد. پس از گذشت ۲۰-۱۵ روز هیچ‌گونه علائم بیماری ویروسی در این گیاه مشاهده نگردید. این احتمال وجود دارد که به دلیل پوشیده شدن سطح ویروس با لینکرهای متصل به ذرات هرسپتین RNA ویروسی در داخل کپسید محبوس شده که حاصل آن عدم امکان تکثیر ویروس و انتقال آن به سلول‌های مجاور می‌باشد. بررسی بیماری‌زایی نانوذره ویروس گیاهی بعد از اتصال آن به لینکرها بر روی گیاهان تاکنون گزارش نشده است.

ویروس به کار رفته در این تحقیق ویروس رشته‌ای خمش‌پذیر سیب‌زمینی که از گیاه نخودفرنگی در سال ۲۰۰۷ توسط اسفندیاری و همکاران برای اولین بار گزارش

گردید. آزمون وسترن بلات به کمک آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروس و هرسپتین مهر تائیدی دال بر این قضیه می‌باشد. ایده استفاده از تکنیک وسترن بلات در این تحقیق از مطالعه استیمنز حاصل شد. مطالعه استیمنز و همکاران در سال ۲۰۰۹ تنها تحقیق انجام گرفته در زمینه استفاده از ویروس ایکس سیب‌زمینی به عنوان نانوذره است. استیمنز و همکاران در مطالعه خود از این ویروس استفاده کردند و با اتصال OregonGreen 488 و AlexaFluor 647 به ویروس باندهای پروتئینی ویروس ایکس سیب زمینی و باندهای پروتئین ناشی از کنژوگاسیون ویروس و فلورسنت را با تکنیک وسترن بلات مشاهده کردند. قابل ذکر است که نوع ویروس سیب زمینی به کار رفته در تحقیق ایشان از استرین دیگری بود که با نانوذره به کار رفته در این تحقیق بود.

در بررسی با زتاسایزر بارالکتریکی کمپلکس نانوذره/هرسپتین ۷/۰۵- (با ضریب خطا ۰/۰۳) به دست آمد که نسبت به بار الکتریکی ویروس (۲۱/۴-) مثبت‌تر و نسبت به بار الکتریکی هرسپتین (۱/۴۸-) منفی‌تر بود. بار الکتریکی ۷/۰۵- نشان داد اتصال بین ویروس و هرسپتین رخ داده که منجر به ایجاد ذره جدید با بار الکتریکی متفاوتی شده است. نتایج میکروسکوپ الکترونی موید حفظ ساختار رشته‌ای کمپلکس نانوذره ویروسی/هرسپتین بود. این داده‌ها نشان دادند که لینکرهای شیمیایی به کار رفته و مواد شیمیایی در محیط واکنش هیچ کدام ساختار رشته‌ای ویروس را تخریب نکرده و نانوذره بودن ویروس حفظ شده است.

نانوذرات ویروسی گیاهی به دلیل اندازه کوچک، غیر بیماری‌زا بودن در سلول‌های حیوانی، خالص سازی ارزان و حفظ ساختار پیکره‌ای بعد از اتصال به لینکرهای شیمیایی وارد عرصه نانو تکنولوژی شده و توجه ویژه‌ای را به خود اختصاص دادند به گونه‌ای که از آنها در هدف‌گیری موثر دارو در درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود.

تشکر و قدردانی

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به علت فراهم آوردن بودجه این طرح تحقیقاتی و از شرکت فناوری بن‌یاخته به علت همکاری‌های همه جانبه در جهت پیشبرد این تحقیق نهایت سپاس و امتنان را دارم. از

شده بود استفاده گردید (۲۴). این ویروس شامل ۱۲۷۰ زیر واحد پروتئینی به وزن ۲۷ کیلودالتون است. جهت بررسی تاثیر تقدم و تاخر اضافه کردن نانوذره ویروس و هرسپتین به لینکر شیمیایی، وسترن بلات‌های کمپلکس نانوذره ویروسی/هرسپتین حاصل از ویروس-لینکر-هرسپتین و هرسپتین-لینکر-ویروس با هم مقایسه شد که باندهای حاصله تفاوتی را نشان نمی‌داد. زتا سایزر و آزمون الیزای ساندویچی برای بررسی دو کمپلکس فوق انجام نشد اما بنا به آگاهی از ساختار آنتی‌بادی‌های مونوکلونال لذا ترجیح داده شد که جهت تشکیل کمپلکس نانوذره ویروس/هرسپتین ترتیب ورود مولکول‌ها به صورت ویروس-لینکر-هرسپتین باشد.

از کمپلکس ویروس-گلو تار آلدئید-هرسپتین به عنوان کنترل استفاده شد. گلو تار آلدئید لینکر شیمیایی بوده که سبب اتصال پایانه‌های آمین می‌شود. این اتصالات غیراختصاصی سبب تشکیل باند پروتئینی سنگینی در ژل SDS-PAGE شده که با توجه به مکانیسم عمل گلو تار آلدئید این نتیجه قابل پیش بینی بود.

از آنجایی که آنتی‌بادی مونوکلونال هرسپتین قابلیت شناسایی و اتصال به رسپتورهای سطحی سلول‌های HER2+ سرطان پستان را دارا هستند اتصال چندین مولکول هرسپتین به نانوذره ویروسی به واسطه لینکرهای شیمیایی سبب هدف‌گیری و جذب هم‌زمان تعداد زیادی از مولکول‌های هرسپتین متصل به پیکره ویروس ایکس سیب زمینی به سطح سلول‌های HER2+ شده که این امر کاهش دوز مصرفی داروی هرسپتین را به همراه خواهد داشت.

در نتایج به دست آمده در آزمون الیزای ساندویچی به دلیل حضور آنتی‌بادی اختصاصی ویروس ایکس سیب زمینی پوشش داده شده در کف چاهک‌ها و سپس اضافه کردن آنتی‌بادی انسانی در آخرین مرحله، فقط کمپلکس‌های حاوی نانوذره ویروسی/هرسپتین قابل شناسایی است. تاکنون از آزمون الیزا جهت شناسایی و جداسازی نانوذرات ویروسی استفاده نگردیده و طراحی الیزا توسط اسفندیاری و همکاران صورت گرفته است.

در نتایج حاصل از SDS-PAGE اضافه شدن پوشش پروتئینی ۲۷ کیلودالتونی نانو ذره ویروس خالص شده ایکس سیب‌زمینی به زنجیره سنگین ۵۵ کیلو دالتونی آنتی‌بادی هرسپتین سبب ایجاد پروتئین ۸۳ کیلو دالتون

سرکار خانم دکتر کمالی به پاس محبت بی‌دریغ‌شان

سپاسگزارم.

References

1. Brown WL, Mastico RA, Wu M, Heal KG, Adams CJ, Murray JB, Stockley PG. RNA bacteriophage capsid-mediated drug delivery and epitope presentation. *Intervirology* 2003; 45(4-6): 371-80.
2. Doronina S, Toki B, Torgov M, Mendelsohn B, Cerveny C, Chace D, DeBlanc R, Gearing R, Bovee T, Siegall C, Francisco J, Wah A, Meyer D, Senter P. Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 778- 84.
3. Douglas T, Young M. Viruses: making friends with old foes. *Science* 2006; 312 (5775): 873-5.
4. Kukowska-Latallo J, Candido K, Cao Z, Nigavekar S, Majoros I, Thomas T, Balogh L, Khan M, Baker J. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 5317-24.
5. Medina O, Zhu Y, Kairemo K. Targeted liposomal drug delivery in cancer. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2981-9.
6. Muldoon L, Neuwelt E. BR96-DOX immunoconjugate targeting of chemotherapy in brain tumor models. *J Neurooncol* 2003; 65: 49-62.
7. Okuda T, Kawakami S, Akimoto N, Niidome T, Yamashita F, Hashida M. PEGylated lysine dendrimers for tumor-selective targeting after intravenous injection in tumor-bearing mice. *J Control Release* 2006; 116: 330-6.
8. Park J, Kirpotin D, Hong K, Shalaby R, Shao Y, Nielsen U, Marks J, Papahadjopoulos D, Benz C. Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. *J Control Release* 2001; 74: 95-113.
9. Pattenden L, Middelberg A, Niebert M, Lipin D. Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends Biotechnol* 2005; 23: 523-9.
10. Singh P, Gonzalez M, Manchester M. Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Development Research* 2006; 67: 23-41.
11. Lewis J, Destito G, Zijlstra A, Gonzalez M, Quigley J, Manchester M, Stuhlmann H. Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. *Nature Medicine* 2006; 12(3): 354-60.
12. Klem MT, Willits D, Young M, Douglas T. 2-D array formation of genetically engineered viral cages on Au surfaces and imaging by atomic force microscopy. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 10806-7.
13. Brumfield S, Willits D, Tang L, Johnson JE, Douglas T, Young M. Heterologous expression of the modified coat protein of Cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function. *J Gen Virol* 2004; 85:1049-53.
14. Brown WL, Mastico RA, Wu M, Heal KG, Adam CJ, Murray JB, Simpson JC, Lord JM, Taylor-Robinson AW, Stockley PG. RNA bacteriophage capsid-mediated drug delivery and epitope presentation. *Intervirology* 2002; 45:371-80.
15. Wang Q, Lin TW, Tang L, Johnson JE, Finn MG. Icosahedral virus particles as addressable nanoscale building blocks. *Angew. Chem Int Ed* 2002; 41:459-62.
16. Germershaus O, Merdan T, Bakowsky U, Behe M, Kissel T. *Bioconjug Chem* 2006; 17:1190-9.
17. Tran T, Engfeldt T, Orlova A, Sandstro M, Feldwisch J, Abrahamse L, Wennborg A, Tolmachev V, Karlstro A. *Bioconjug Chem* 2007; 18:1956-64.
18. Hilger I, Leistner Y, Bernd A, Fritsche C, Haas K, Kosmehl H, Kaiser W. *Eur Radiol* 2006; 14: 1124-9.

19. Shukla R, Thomas T, Peters J, Desai A, Kukowska-Latallo J, Patri A, Kotlyar A, Baker J. *Bioconjug Chem* 2006; 17: 1109-15.
20. Jayasinghe U, Salazar L. *Manual de tecnicas en virologia de plants. Unidad Tecnica de Capacitation (TTU). CIP Lima Peru* 1993.
21. Yukyung J, Hyo-Jin P, Pyung-Hwan K, Jaewon L, Woochan H, Jaemoon Y, Hyunju K, Joo-yuk S, Joo-Hang K, Yong-Min H, Chae-Ok Y, Seungjoo H. Retargeting of adenoviral gene delivery via Herceptin-PEG- adenovirus conjugates to breast cancer cells. *Journal of Controlled Release* 2007; 123:164-71.
22. Steinmetz NF, Mertens ME, Taurog R E, Johnson JE, Commandeur U, Fischer R, Manchester M. Potato Virus X as a novel platform for potential biomedical applications. *Nano Lett* 2010; 10: 305-12.
23. Greg T, Hermanson. *Bioconjugate Techniques*, First Edition, Academic Press 1996; 801.
24. Esfandiari N, Kohi-Habibi M, Hohn T, Pooggin M. Complete genome sequence of an Iranian isolate of Potato virus X from the legume plant *Pisum sativum*. *Virus Genes* 2009; 39:141-5.