آنتی‌بادی‌های نوترکیب:
(از تولید تا کاربرد)

نگارنده

دکتر فاطمه رهبری‌زاده

همکاران

دکتر فاطمه رحیمی جمنانی

دکتر داود احمدوند

دکتر احمد اسماعیلی

۱۳۹۸

سرشناسه: رهبری‌زاده، فاطمه، 1349 -
عنوان و نام پدیدآور: آنتی‌بادی نوترکیب: (از تولید تا کاربرد)/ نگارنده: فاطمه رهبری‌زاده
همکاران: فاطمه رحیمی جمنانی، داود احمدوند، احمد اسماعیلی
مشخصات نشر: تهران: دانشگاه تربیت مدرس، 1396.
مشخصات ظاهری: 320ص.
شابک: 978-600-7589-42-7
وضعیت فهرست نویسی: فیپا
یادداشت: واژه‌نامه.
یادداشت: کتابنامه: ص.241.
یادداشت: نمایه.
موضوع: نوترکیبی پادتن‌ها
موضوع: Recombinant antibodies
موضوع: گیاهان -- زیست‌شناسی مولکولی
موضوع: Plant molecular biology
موضوع: تکنولوژی زیستی یاخته‌های حیوانی
موضوع: Animal cell biotechnology
شناسه افزوده: رحیمی جمنانی، فاطمه، 1360 -
شناسه افزوده: احمدوند، داود، 1353 -
شناسه افزوده: اسماعیلی، احمد، 1356 -
شناسه افزوده: دانشگاه تربیت مدرس
رده‌بندی کنگره: 1396 8آ۹ر/QR186/87
رده‌بندی دیویی: 0798/616
شماره کتابشناسی ملی: 4665747

آنتی‌بادی نوترکیب: (از تولید تا کاربرد)
نگارنده: دکتر فاطمه رهبری‌زاده
همکاران: دکتر فاطمه رحیمی جمنانی، دکتر داود احمدوند، دکتر احمد اسماعیلی
ویراستار ادبی و فنی: زهرا نابع
طراح جلد: ترنج
حروفچینی: سمیه زهانی
شماره انتشار: 201
شماره پیاپی: 362
تاریخ انتشار: 1398
شمارگان: 300
شابک چاپی: 978-600-7589-42-7 شابک الکترونیکی: 978-622-8376-52-3
ناشر: انتشارات دانشگاه تربیت مدرّس
نوبت چاپ: دوم
کارشناس اجرایی: فاطمه طالبی
ناظر چاپ: مصطفی جانجانی
لیتوگرافی: ایرانگرافیک
چاپ و صحافی: قشقایی
مرکز پخش: تقاطع بزرگراه‌های آل‌احمد و دکتر چمران، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس،
صندوق پستی: 318-14115 تلفن: 82883096 دورنگار: 82883032
آدرس اینترنتی فروش: pub.modares.ac.ir

صحت مطالب کتاب برعهدهٔ نگارندگان است.

تمام حقوق این اثر برای مرکز نشر آثار علمی دانشگاه تربیت مدرس محفوظ است و تکثیر کتاب به هر روشی بدون اجازه کتبی ناشر پیگرد قانونی دارد.

تقدیم

با سلام به معلم بزرگ انسانیت حضرت رسول اکرم (ص) و خاندان مطهرش، کسی که کلام و قلم از وصف وجود پاکش قاصر است و همچون زمان حیات مبارکش، امروز نیز هدف دشمنی های پلیدترین خلایق روزگار است و افسوس که این سیه دلان غافلند از اینکه، زلال وجودش مبرا از هر افترا است و تاریخ صادق ترین گواه این مدعاست.

بال ملخ به شانه جسم حقیر ماست
عمریست که مور ملک سلیمان احمدیم

تقدیم به آنان که در مراحل مختلف از زندگی مان به ما آموختند؛

تقدیم به آنانکه شیفته آموختن اند؛

تقدیم به آنان که صبورانه ما را تحمل کردند و اجازه دادند تا وقتی که متعلق به آنان بود برای جمع آوری این مطالب استفاده شود.

فهرست مطالب

پیشگفتار ..... ک

فصل اول آنتی‌بادی نوترکیب ۱

پیشینه ۱

ساختار آنتی‌بادی ۱

ژنتیک آنتی‌بادی ۳

کاربردهای آنتی‌بادی ٤

مهندسی آنتی‌بادی ٥

۱- آنتی‌بادی‌های کایمریک انسانی- موشی ٥

۲- قطعه‌های آنتی‌بادی ٦

۳- آنتی‌بادی نوترکیب چندظرفیتی ۷

٤- آنتی‌بادی‌های نوترکیب با ویژگی دوگانه و یا چند عملکردی ۹

٥- گیرنده‌های کایمریک ۱۱

٦- آنتی‌بادی‌های متصل به سوپرآنتی‌ژن ۱۱

۷- ایمونوتوکسین‌ها ۱۲

۸- ایجاد بلوغ افینیتی یا بهبود اتصال به آنتی‌ژن ۱۲

۹- آنتی‌بادی‌های پایدار با سطوح بیانی مناسب ۱۳

۱۰- اینترابادی‌ها (آنتی‌بادی داخل سلولی) ۱۳

۱۱- تولید آنتی‌بادی انسانی با استفاده از موش‌های ترانسژنیک ۱٤

۱۲- ساخت کوچک‌ترین قطعه آنتی‌بادی با قدرت اتصال به آنتی‌ژن ۱٥

کتابخانه ژنی قطعه‌های آنتی‌بادی ۱۸

انواع کتابخانه ۱۹

۱- کتابخانه‌های باکتریوفاژی ۱۹

۲- کتابخانه‌های پلی‌زومی ۱۹

ب آنتی‌بادی‌های نوترکیب (از تولید تا کاربرد)

۳- کتابخانه‌های سطح سلول ۱۹
فنّاوری نمایش فاژی ۲۰
نکات مهم از بیولوژی فاژ و میزبان در ساخت کتابخانه فاژی ۲۱
۱- درج ژن خارجی در ژنوم فاژ ۲۵
۲- پپتید علامتی و ناحیه N ترمینال ۲۵
۳- تظاهرات متعاقب درج و جابه‌جایی در غشای میزبان ۲۷
٤- کدون‌های مورد استفاده ۲۷
٥- چاپرون‌ها ۲۷
٦- پروتئازها ۲۸
انواع روش‌های نمایش فاژ ۲۸
چرا از فنّاوری نمایش فاژ استفاده می‌کنیم؟ ۲۹
ابزارهای نمایش فاژ ۳۰
مقایسه فنّاوری هیبریدوما و نمایش فاژ ۳۲
۱- تقلید از بیان در لنفوسیت‌های *B* ۳۲
۲- تقلید از انتخاب در سیستم ایمنی ۳٤
۳- تقلید از پلاسما سل‌ها ۳٥
تولید گنجینهٔ آنتی‌بادی ۳٦
الف- با استفاده از حیوان ایمن ۳٦
ب- بدون استفاده از ایمن کردن ۳۷
افزایش تمایل آنتی‌بادی‌های نوترکیب به کمک کتابخانه ژنی ۳۸
مراحل ساخت کتابخانه ژنی آنتی‌بادی ۳۹
۱- تکثیر ژن ۳۹
الف- PCR ۳۹
ب- اصول PCR ٤۰
ج- اجزای واکنش PCR ٤۰
د- توصیف بعضی از انواع PCR ٤۱
۲- کلونینگ در وکتور فاژی یا فاژمیدی ٤۱
۳- غنی‌سازی کتابخانه‌های نمایش فاژ ٤۳

الف- انواع روش‌های غنی‌سازی ٤٣
الف-١- غنی‌سازی براساس میل پیوندی آنتی‌بادی به یک آنتی‌ژن خالص ٤٣
انتخاب براساس آنتی‌ژن پوشیده شده بر سطح ٤٣
انتخاب یا غنی‌سازی فاژ در فاز مایع ٤٤
الف-٢- غنی‌سازی براساس میل پیوندی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن‌های سطح سلولی ٤٤
انتخاب با استفاده از سلول کامل و یا بافت (*in vitro*) ٤٤
انتخاب در شرایط *in vivo* ٤٥
الف-٣- انتخاب یا غنی‌سازی فاژ پس از پردازش ٤٥
انتخاب یا غنی‌سازی فاژ با استفاده از ورود فاژ به سلول ٤٥
انتخاب براساس توانایی در آلوده کردن باکتری (میزبان) ٤٦
الف-٤- انتخاب کارامد فاژ و یا انتخاب لیگاند براساس بیان (LIVE) ٦٤
ب- مراحل غنی‌سازی ٤٧
ب-١- تکثیر کتابخانه ٤٨
ب-٢- تماس اعضای کتابخانه و مولکول هدف ٤٨
ب-٣- شستشو و رهاسازی ٤٨
ب-٤- آلوده‌سازی مجدد سلول میزبان ٤٩
٤- انتخاب فاژهای برتر از کتابخانه‌های غنی‌شده فاژی ٤٩
الف- ایمونواسی ٥٠
ب- ایمونوسایتوشیمی ٥٠
ج- ایمونوهیستوشیمی ٥٠
د- ایمونوبلاتینگ ٥٠
نتیجه‌گیری ٥١
٥- سیستم‌های بیانی جهت تولید انبوه آنتی‌بادی‌های نوترکیب ٥٢
الف- سیستم بیان پروکاریوتی ٥٢
ب- سیستم بیان یوکاریوتی ٥٤
انواع آنتی‌بادی‌های نوترکیب ٥٧
١- آنتی‌بادی‌های نوترکیب موشی ٥٧
انتخاب منبع ژنی ٥٨

استخراج RNA ۵۹
ساخت cDNA ۵۹
اتصال قطعه‌های VL و VH به یکدیگر جهت ساخت قطعه scFv ۶۱
الف - SOE - PCR ۶۱
ب - طراحی لینکر ۶۲
ج- طراحی پرایمر برای ساخت scFv ۶۳
د- ساخت کتابخانه ژن آنتی‌بادی ۶۴
انواع کتابخانه‌های ژنی آنتی‌بادی ۶۵
۱- کتابخانه ژنی ایمن ۶۶
۲- کتابخانه غیرایمن ۶۷
۳- کتابخانه مصنوعی ۶۸
هـ- مرحله انتخاب ۶۹
۲- آنتی‌بادی‌های نوترکیب انسانی ۷۰
۳- آنتی‌بادی‌های نوترکیب شتری ۷۰
آنتی‌بادی‌های زنجیرهٔ سنگین در خانوادهٔ شترها ۷۰
تفاوت‌های آنتی‌بادی‌های زنجیرهٔ سنگین با آنتی‌بادی معمولی ۷۳
الف- تغییرات در دومین متغیر آنتی‌بادی زنجیره سنگین ۷۳
ب- حذف رشته سبک ۷۶
ج- ریشه‌شناسی و فیلوژنی ژن‌های VHH در شترسانان ۷۷
د- انتوژنی آنتی‌بادی زنجیره سنگین در شترسانان ۷۸
جداسازی آنتی‌بادی‌های زنجیرهٔ سنگین و VHH علیه آنتی‌ژن خاص ۷۹
۱- ایمن کردن شترسانان ۷۹
۲- حصول VHHهای ویژهٔ آنتی‌ژن ۸۰
الف- VHH پلی‌کلونال از آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین پروتئولیزشده ۸۰
ب- آنتی‌بادی منوکلونال از گنجینهٔ VHH شتر ایمن ۸۱
ج- کلون کردن VHH از کتابخانه «تک مرحله‌ای» (بانک VHH سنتزی و VHH غیرایمن) ۸۲
۳- انتخاب مولکول‌های متصل‌شونده به آنتی‌ژن از کتابخانه‌های VHH ۸۳
خصوصیات VHHها ۸۵

الف- حلالیت و پایداری ۸۵
ب- اختصاصیت و تمایل VHHها به آنتی‌ژن ٦۸
ج- شناخت اپی‌توپ‌های خاص ۸۷
د- شباهت توالی VHH به توالی VH انسانی ۸۷
ساختار VHH و واکنش VHH - آنتی‌ژن ۸۸
اهمیت و نقش VHHها در زیست‌فنّاوری ۸۹
۱- VHH در تصویربرداری ***in vivo*** ۸۹
۲- داروهای پپتیدی مشتق‌شده از VHH ۹۰
۳- VHH به‌عنوان زیرواحد ساختمانی برای سازه‌های چند جزئی ۹۱
الف- آنتی‌بادی‌های با ویژگی دوگانه و چندظرفیتی ۹۱
ب- ایمونوفیوژن‌ها ۹۳
٤- VHH به‌عنوان اینترابادی ۹٤
مهندسی نوین آنتی‌بادی‌ها ۹٤
۱- آنتی‌بادی‌های دارای دو ویژگی ۹٤
۲- آنتی‌بادی‌های نوترکیب چندظرفیتی ۹۵
۳- آنتی‌بادی دوکارکردی ۹٦
٤- آنتی‌بادی‌های انسانی‌شده ۹۸
۵- غربالگری براساس افینیتی ۹۹
٦- آنالیز مناطق متغیر موش ۱۰٤
۷- بیان و بررسی ابتدایی آنتی‌بادی‌های انسانی‌شده ۱۰۵
۸- آنتی‌بادی‌های نوترکیب انسانی شتری شده ۱۰٦
۹- روش انتخاب هدایت‌شده برای دستیابی به آنتی‌بادی‌های کاملاً انسانی ۱۰۹

فصل دوم تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب در حیوانات و گیاهان ۱۱۳
۱- تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب در حیوانات ۱۱۳
اهداف و مقاصد استفاده از ترانسژن‌ها در زیست‌فنّاوری ۱۱۵
پیشرفت‌های درمانی با استفاده از پروتئین‌های تولیدشده در منابع حیوانی ۱۱۹
تغییرات ژنتیکی در پستانداران ۱۲۱

هدف‌گیری ژنی در سلول‌های بنیادی جنینی ۱۲۱
هدف‌گیری ژنی در سلول‌های سوماتیک ۱۲۲
انتقال ژنی با استفاده از رتروویروس به‌عنوان وکتور ژن ۱۲۲
فنّاوری انتقال هسته ۱۲۳
۲- تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب در گیاهان ۱۲٤
مروری بر سیستم‌های بیان مبتنی بر گیاهان ۱۲٦
گیاهان تراریخت ۱۲۷
گیاهان تراریخت‌شده کلروپلاستی ۱۳۰
بیان موقت ۱۳۲
کشت‌های سوسپانسیون سلولی گیاهی ۱۳٤
سیستم‌های بیان در بذر ۱۳٦
سیستم‌های بیان در ریشه‌های مویین ۱۳۷
جلبک‌ها، یک سیستم جایگزین گیاهان عالی ۱۳۸
مقایسه سیستم‌های مختلف تولید پروتئین‌های نوترکیب ۱٤۱
روش‌های افزایش تجمع پروتئین‌های نوترکیب در گیاهان ۱٤۲
۱- افزایش نسخه‌برداری ۱٤۳
۲- افزایش ترجمه ۱٤٤
۳- هدف‌گیری درون سلولی ۱٤٥
٤- روش‌های مبتنی بر پروتئین‌های ادغامی ۱٤٦
٥- بهینه‌سازی شرایط رشدی ۱٤٦
٦- کاهش تجزیه پروتئین‌های نوترکیب ۱٤۷
تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب در گیاهان (Plantibody) ۱٤۸
مقاوم‌سازی گیاهان زراعی با استفاده از آنتی‌بادی‌ها ۱٥۰
تولید آنتی‌بادی‌های نوترکیب درمانی در گیاهان ۱٥٥
ایمنی زیستی محصولات کشاورزی مولکولی ۱٥۹

فصل سوم کاربردهای آنتی‌بادی‌های نوترکیب در درمان سرطان ۱۶۱
روش‌های درمانی سرطان ۱۶۱
۱- جراحی ۱۶۱
۲- اشعه درمانی ۱۶۲
۳- شیمی‌درمانی ۱۶۲
٤- درمان با هورمون ۱۶۳
۵- درمان با مهارکنندگان اختصاصی ۱۶۵
٦- درمان با تعدیل کنندگان پاسخ‌های زیستی ۱۶۵
۷- واکسن‌ها ۱۶٦
۸- ایمونوتراپی سرطان ۱۶٦
آنتی‌ژن‌های توموری ۱۶۷
کاربرد آنتی‌بادی‌ها در ایمونوتراپی سرطان ۱۶۸
کاربرد سلول‌های T در ایمونوتراپی سرطان ۱۶۹
خصوصیات آنتی‌ژن‌هایی که به‌وسیله سلول‌های T شناسایی می‌شوند ۱۷۰
گیرنده‌های آنتی‌ژنی سلول‌های T ۱۷۱
نقش CD3 و پروتئین‌های زتا ۱۷٦
نقش مولکول‌های کمکی در فعالیت سلول T ۱۷٦
CD28 و CTLA-4 ..... ۱۷۷
فعال شدن تیروزین کینازها در مسیر فعال‌سازی سلول‌های T ۱۷۸
ایمونوتراپی سرطان با استفاده از سلول‌های T مهندسی‌شده ۱۸۰
الف- جدا کردن سلول‌های T علیه یک آنتی‌ژن خاص از بدن فرد ۱۸۲
ب- تولید سلول‌های T علیه آنتی‌ژن‌های سرطانی با مهندسی ژنتیکی TCR ۱۸۲
ج- گیرنده کایمریک ۱۸٤
اجزای گیرنده کایمریک ۱۸٤
۱- مولکول متصل‌شونده به آنتی‌ژن (آنتی‌بادی) ۱۸۵
۲- بازوی خارج سلولی (فضاساز) ۱۸٦
۳- قطعه سیگنال‌دهنده ۱۸۷

٤- قطعه کمک محرک ۱۸۷
محدودیت‌های درمان با سلول‌های T حاوی گیرنده کایمریک ۱۹۰
درج ژنومی ۱۹۲
ریکامبینازهای ویژه جایگاه ۱۹۳
اینتگراز phiC31 و نحوه عملکرد آن در سلول‌های پستانداران ۱۹٤
مزیت‌های استفاده از سیستم اینتگراز phiC31 ..... ۵۹۱
ژن‌درمانی با سیستم اینتگراز phiC31 ..... ٦۹۱
کاربرد آنتی‌بادی‌های نوترکیب در فنّاوری نانو ۱۹۸
الف- حامل‌های ویروسی ۱۹۹
۱- آدنوویروس‌ها ۲۰۰
۲- سیستم‌های حامل رتروویروسی و لنتی‌ویروسی ۲۰۰
۳- انکورتروویروس‌ها ۲۰۱
٤- لنتی‌ویروس‌ها ۲۰۲
۵- ویروس آبله (واکسینیا) و پاکس‌ویروس‌ها ۲۰۳
٦- ویروس هرپس سیمپلکس ۲۰٤
۷- آلفاویروس‌ها ۲۰۵
۸- ویروس استوماتیت وزیکولار و RNA ویروس‌ها ۲۰٦
۹- پارووویروس‌ها ۲۰۸
مزایا و معایب سیستم‌های حامل ویروسی ۲۰۹
ب- حامل‌های غیرویروسی ۲۱۱
۱- تزریق DNA لخت ۲۱۲
۲- انتقال ژن با استفاده از نیروهای فیزیکی ۲۱۲
۳- انتقال ژن با تفنگ ژنی ۲۱۳
٤- الکتروپوریشن ۲۱۳
۵- انتقال ژن با کمک امواج اولتراسوند ۲۱٤
٦- انتقال هیدرودینامیک ژن ۲۱٤
۷- روش‌های شیمیایی (نانوحامل‌ها) ۲۱۵

میسل‌ها و لیپوزوم‌ها ۲۱۷
لیپیدهای کاتیونی برای انتقال ژن ۲۱۸
انتقال ژن با کمک پلیمرهای کاتیونی ۲۲۱
انواع پلیمرهای کاتیونی..... ۲۲۲
الف- پلیمرهای زیست تخریب‌ناپذیر..... ۲۲۲
پلی‌اتیلن ایمین (PEI) ۲۲۲
ب- پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر ۲۲٤
۱- کیتوزان ۲۲٦
۲- دندریمرها..... ۲۲۷
موانع اصلی در کاربرد نانوسیستم‌های کاتیونی ۲۲۹
الف- موانع انتقال داخل عروقی ۲۲۹
ب- موانع انتقال به درون سلول ۲۳۰
پوشاندن سطح نانوذره با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)..... ۱۳۲
هدفمند کردن نانوحامل ها ۲۳۲
الف- هدف‌گیری غیرفعال..... ۲۳۲
ب- هدف‌گیری فعال ۲۳٤
۱- هدف‌گیری باواسطه فولات ۲۳۵
۲- هدف‌گیری به‌واسطه کربوهیدرات‌ها..... ۲۳۵
۳- هدف‌گیری باواسطه آنتی‌بادی و قطعات آنتی‌بادی..... ۲۳۵
انواعی از مولکول‌های هدف..... ۲۳٦
منابع ۲٤۱
واژه‌نامه فارسی به انگلیسی..... ۲۷۵
واژه‌نامه انگلیسی به فارسی..... ۲۸۳
نمایه ۲۸۹

پیشگفتار

پیشرفت‌های علوم مولکولی و علوم سلولی و زیستی در سه دهه اخیر به‌طور قابل توجهی افق‌های دید محققان را گسترده کرده است. مولکول‌های آنتی‌بادی به‌عنوان یکی از با ارزش‌ترین و پرکاربردترین ابزارهای علم بیولوژی نه تنها به‌عنوان یک عامل شناساگر مولکولی با کاربرد تحقیقاتی، بلکه به‌عنوان یک ابزار تشخیصی و درمانی مؤثر به‌کار می‌روند. آنتی‌بادی‌ها گروه هتروژنی از گلیکوپروتئین‌ها می‌باشند که در سرم و بافت‌ها به‌وجود می‌آیند و توسط لنفوسیت‌های B تولید می‌شوند. وقتی که سرم حاوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی باشد آنتی‌سرم خوانده می‌شود.

کتاب پیش‌رو آنتی‌بادی و درمجموع هر آنچه به تولید و کاربرد آنتی‌بادی مربوط می‌شود را به زبانی شیوا و به‌طور کامل توضیح می‌دهد و روش‌های تولید و موارد کاربرد آنتی‌بادی‌ها را تحلیل کرده است. اگرچه روش‌های اصلی تولید انواع آنتی‌بادی‌ها تغییر زیادی نکرده است، ولی در این کتاب سعی کردیم که همه این مطالب را در مجموعهٔ دو جلدی جمع‌آوری و به‌روزرسانی کنیم. این کتاب برای محققان علوم‌زیستی و نیز دانشجویان کارشناسی ارشد (M.Sc.) و دکتری حرفه‌ای و نیز تخصصی (Ph.D.) که به تولید و کاربرد مولکول آنتی‌بادی علاقه‌مند هستند، مفید و قابل استفاده است. نگارش این کتاب به نحوی است که هم برای محققان تازه‌کار و هم برای سروران با تجربه کاربرد دارد. البته پیشاپیش متذکر می‌شود که

امکان ارائه تمام روش‌ها در این کتاب‌ها غیرممکن بود، ولی تلاش شد که روش‌های مفید این عرضه تبیین شود. ذکر منابع اصلی در اغلب روش‌ها مشکل بود، زیرا بعضی از آنها تغییر داده شده و اصلاح و بعضی نیز برگرفته از تجربیات شخصی نگارندگان است. منابع در پایان هر فصل ذکر شده که شامل کتاب و مقاله است.

پس از جمع‌آوری تمام مطالب به‌نظر می‌رسید که بهترین روش دسته‌بندی و تقسیم مجموعه به دو کتاب باشد. در این کتاب (کتاب دوم) با عنوان آنتی‌بادی‌های نوترکیب (از تولید تا کاربرد)، انواع آنتی‌بادی‌های نوترکیب در جانوران و گیاهان، شامل تعاریف و روش‌های تولید و نیز کاربرد آنها ذکر شده است.

در پایان از هرگونه کاستی در کتاب عذرخواهی می‌نمایم و برای همهٔ همکاران، دانش‌پژوهان و دانشجویان عزیز کشور عزیزمان ایران از خداوند متعال طلب سلامتی و توفیق روزافزون دارم.

فاطمه رهبری‌زاده