Internal Medicine Today
Gonabad University of Medical Sciences
October 2022. Vol 28. Issue 4

Research Paper

Expression of Recombinant Human Programmed Cell Death Protein-1 and Development of Camel Polyclonal Antibody

Mohammad Hosseininejad-Chafi[1, 2], Zahra Kianmehr[1], Kamran Pooshang Bagheri[2], Fatemeh Kazemi-Lomedasht[2], *Mahdi Behdani[2]

1. Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Laboratory of Venom and Therapeutic Biomolecule, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Hosseininejad-Chafi M, Kianmehr Z, Pooshang Bagheri K, Kazemi Lomedasht F, Behdani M. [Expression of Recombinant Human Programmed Cell Death Protein-1 and Development of Camel Polyclonal Antibody (Persian)]. Internal Medicine Today. 2022; 28(4):498-513. https://doi.org/10.32598/hms.28.4.3858.1

https://doi.org/10.32598/hms.28.4.3858.1

CC BY NC

Received: 13 Jun 2022
Accepted: 23 Jul 2022
Available Online: 01 Oct 2022

Key words:
Programmed cell death protein 1, Heavy chain antibody, Recombinant protein, Polyclonal antibody, Western blotting, ELISA

ABSTRACT

Aims Programmed cell death protein-1 (PD-1) is a membrane receptor expressed on the surface of T and B lymphocytes, monocytes, natural killers, and dendritic cells. In cancer, the PD-1/PD-L1 system prevents the proliferation of T lymphocytes and causes the release of cytokines and cytotoxicity, which leads to the apoptosis of tumor-specific T cells, thereby preventing the immune response to cancer cells.

Methods & Materials In this study, the extracellular part of the humanized PD-1 protein was cloned and expressed, and the protein was injected as an antigen into a camel (*Camelus dromedarius*) to obtain a camel polyclonal antibody against PD-1 protein.

Findings The obtained results indicate the proper expression of the protein in the prokaryotic system. Also, using various tests, such as ELISA and western blot, it was confirmed that the polyclonal antibody obtained from camel can identify PD-1 protein.

Conclusion This study showed that because of the advantages, such as the ability to bind multiple epitopes, camel polyclonal antibodies can be used in antibody-based research for effective and strong molecular applications to detect PD-1 receptors.

* ***Corresponding Author:***
Mahdi Behdani, PhD.
Address: Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Laboratory of Venom and Therapeutic Biomolecule, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
Tel: +98 (21) 64112144
E-mail: behdani@pasteur. ac. ir

English Version

Introduction

Programmed cell death protein 1 (PD-1) is an inhibitory receptor expressed during activation by T lymphocytes. This protein regulates the function of T cells during various physiological responses, including acute and chronic infection, cancer and autoimmunity, and immune homeostasis [1, 2]. PD-1 is a monomeric surface glycoprotein and is encoded by the *PDCD1* gene which consists of 5 exons. This protein has immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs and an immunoreceptor tyrosine switch motif [3, 4]. PD-1 is inducibly expressed on T lymphocytes with surface markers CD4 and CD8, natural killer (NK) cells, B cells, macrophages, and some subsets of dendritic cells (DC). Some cytokines, such as interleukin-2 (IL-2), interleukin-7 (IL-7), and interferons (IFNs) can induce PD-1 expression in T cells [5]. PD-1 has 2 natural ligands called PD-L1 and PD-L2, which play a role in PD-1: PD-L1/2 signal transmission. *PD-1* is mainly expressed on activated T cells, while its main ligand, PD-L1, is expressed on the surface of various cells (including T and B cells, natural killer cells, antigen-presenting cells, epithelial cells, and vascular endothelial cells) [6].

One of the immune checkpoints that many tumors use to escape the immune system is the axis of PD-1 proteins and its ligand. In cancer cells, the *PD-L1* gene is overexpressed, and the number of PD-L1 proteins on their surface increases. In cancer, the PD-1/PD-L1 system inhibits T-lymphocyte proliferation, cytokine release, and cytotoxicity [7-9], which leads to apoptosis of tumor-specific T cells and thus cancer cells. Meanwhile, it provides an opportunity to prevent the immune response to grow and expand [10]. Cancer immunotherapy has recently been developed to design effective treatments to improve the specificity and strength of the immune system against cancer [11]. Allison and Honjo received the 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine for the discovery of cancer treatment by suppressing negative immunomodulation. Their research on programmed immune checkpoints, such as PD-1 and cytotoxic lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), showed that these proteins have an inhibitory role in immune function and suggested that these immune checkpoints can be inhibited to reactivate T cells to effectively kill cancer cells [12]. This matter was confirmed in numerous subsequent studies and it is currently a proven theory that by inhibiting the function of these inhibitory proteins, therapeutic goals can be achieved in curing cancer.

A large body of evidence suggests that inhibition of PD-1 elicits an effective immune response against cancer cells [13]. Suppression of the PD-1 signaling pathway has shown that the clinical response of patients with various solid tumors and hematologic malignancies relies primarily on T cells to infiltrate the tumor [14]. Furthermore, targeting *PD-L1* has been associated with significant clinical response in a wide range of cancer patients. Indeed, PD-1 is a significant immunological marker that plays a negative role in the prognosis of various cancers. Therefore, molecular detection of PD-1 protein is an important goal in many pieces of research [15].

Antibodies are essential everyday reagents in numerous immunotherapy and immunoassay tests. Various animals, such as mice, goats, sheep, horses, rabbits, and camels are used to produce antibodies. Polyclonal antibodies can detect several antigenic indicators, while monoclonal antibodies detect only one epitope and are specific. Antibodies used in diagnostic tests can be obtained from different animal sources, while therapeutic antibodies must be obtained from human sources as they cause immunological reactions in the body. If the therapeutic antibodies are obtained from animals such as mice, their fixed parts should be replaced with the fixed parts of human antibodies to obtain chimeric or humanized antibodies. Camel serum contains two types of antibodies, namely normal antibodies and heavy chain antibodies (HCAB). HCAB is a type of immunoglobulin G (IgG) whose structure consists of only 2 heavy chains, and no light chain. In addition, they have two constant CH2 and CH3 domains, which are similar to the Fc domains of conventional antibodies, but lack the CH1 domain. The antigen binding site in HCAB is unique and has only a one-second variable called VHH, nanoantibody, or nanobody (Nb). The second VHH is small (15-17 kDa) and is known for its high solubility and resistance to temperature, high pressure, and low pH [16-18].

Considering the advantages of camel heavy chain antibodies and the need to produce antibodies against hPD-1, in this study, the gene of the extracellular part of the human PD-1 protein was cloned in bacterial vectors and the recombinant protein was expressed and purified. A camel was then immunized with recombinant PD-1 protein. The efficiency of the obtained polyclonal antibody was evaluated by ELISA and Western blot laboratory methods.

Materials and Methods

Cloning, expression, and purification of human PD-1 protein

The sequence of the extracellular part of human PD-1 (UniprotKB Q15116) containing His-Tag was synthesized and cloned in pGH plasmid and named PD1-pGH. Then, the human PD1 gene was subcloned in the pET-26b vector between NdeI and XhoI sites (Fermentase, USA). To confirm the cloning process, colony-PCR, and confirmatory enzyme digestion methods were used. The final plasmid (PD1-pET26b) was transformed into *E. coli* BL21-DE3 bacteria and induced PD-1 protein expression with a final concentration of 0. 5 mM isopropyl-beta-dithiogalactopyranoside (IPTG) for 3 h at 37°C in the incubator. Recombinant protein purification was done using a Ni-NTA affinity chromatography column. Briefly, the sediment of bacteria was dissolved with lysing buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl, 8M Urea, pH 8.0) and sonicated. The cell supernatant was filtered by a 0.45 µm syringe filter and incubated with Ni-NTA resin for 1 h on ice. Then, the resin was poured on the column and washed by washing buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH 6.3), and PD-1 protein was eluted with elution buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH 4.3) and left the column. Protein purity was evaluated by vertical gel electrophoresis (SDS-PAGE). Finally, the protein samples were dialyzed against phosphate buffer solution (PBS) and then the samples were lyophilized.

Western blotting

Western blotting was performed to confirm the identity of the PD-1 protein. The purified protein was transferred to the nitrocellulose membrane after electrophoresis on SDS-PAGE gel. Then, the membrane was incubated with rabbit antibody against His-Tag with a dilution of 1/2000 for 16 h and secondary antibody (anti-rabbit antibody conjugated with HRP (Cell Signaling Technology, USA) for 5 h at 25 degrees. After incubating the membrane with a secondary antibody, 4-chloronaphthal, and hydrogen peroxide (H_2O_2) substrate were used to observe the protein band. In each step, the nitrocellulose membrane was washed 3 times with PBS buffer.

Immunization of camels

A 9-month-old female *Camelus dromedarius* were used for immunization. For the first injection, 100 µg of recombinant PD-1 protein was mixed with an equal volume of Freund's complete adjuvant (Sigma, USA). Then, 6 protein injections with Freund's incomplete adjuvant subcutaneously, at weekly intervals, were used to increase the immune response. Peripheral blood samples were collected before each injection and sera were separated from whole blood and were used to check the camel immunization process using the ELISA method.

ELISA test

In the ELISA test, 100 µL of a concentration of 1 µg/well of recombinant PD-1 protein was incubated on a 96-well flat microplate with sodium bicarbonate buffer (pH 9.1) for 1 h at 25°C. After that, the plate was washed three times with washing buffer (PBS) and blocked with 4% skim milk. Serum dilutions from 1.200 to 1.14000 were added to the microplate wells and then the microplate was incubated for 1 h at 37 degrees. After washing, rabbit anti-camel antibody and anti-rabbit antibody conjugated with HRP were added to the wells at a dilution of 1/2000 and each was incubated for one hour at room temperature. After the final washing, 100 microliters of TMB solution were added to the wells and the reaction was stopped after 5 min with 2N sulfuric acid solution. Then, the OD of the wells was read at a wavelength of 450 nm.

Verification of gene expression by protein electrophoresis

PD-1 recombinant protein was purified and the quality of the purification was checked by the SDS-PAGE method. For this purpose, 15% acrylamide gel was prepared and the protein samples were boiled with a loading buffer containing 2 ME for 10 min, and the probe was placed next to the marker on the gel, and the electrophoresis process was performed at 80 volts. Then, the gel was stained with Coomassie Blue R250.

Western blot with camel antibody

The purified recombinant PD-1 protein was electrophoresed and then transferred to a nitrocellulose membrane by semi-dry method (45 min, 15V). All washing steps with PBS buffer were performed 3 times in each step. Camel serum containing camel polyclonal antibody against PD-1 recombinant protein with a dilution of 1. 200 was incubated on a nitrocellulose membrane for 1 h at 37 degrees. After washing, anti-camel rabbit antibody and HRP-conjugated anti-rabbit antibody with a dilution of 1/2000 were used for 1 h at room temperature, and 4-chloronaphthal and hydrogen peroxidase (H_2O_2) substrate were used to observe the protein.

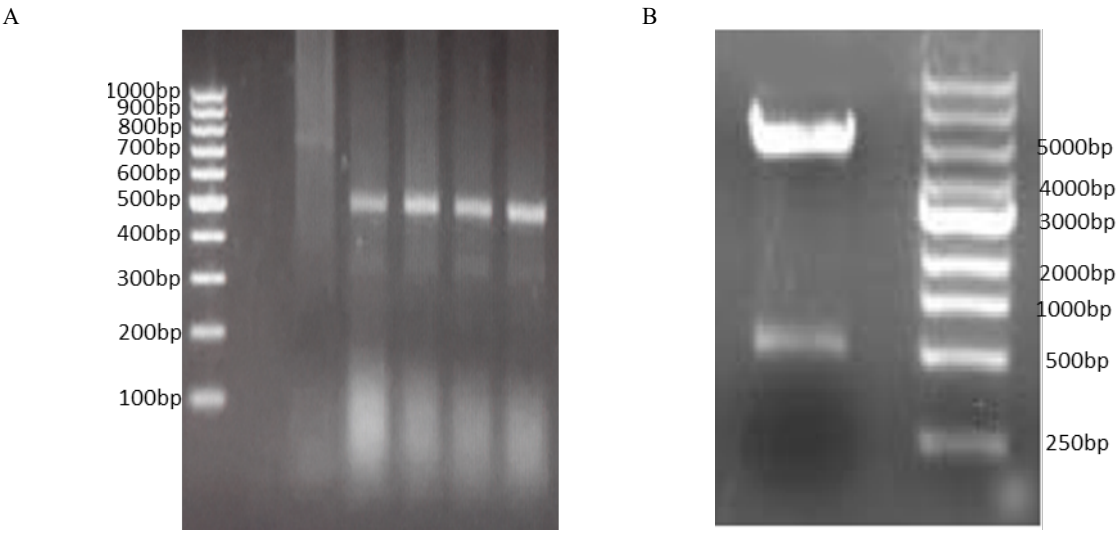


Figure 1. Confirmation of the *PD-1* gene cloning process in the expression plasmid

Internal Medicine Today

A) Via the colony-polymerase chain reaction method, cloning was confirmed by observing the 500 base pairs band

B) Via enzymatic digestion method, cloning was confirmed by observing the band of about 500 base pairs

Results

Cloning of human PD-1 protein

To express and purify the PD-1 protein, the coding sequence of the human PD-1 protein was cloned inside the expression plasmid pET-26 using NdeI and XhoI cloning enzyme sites and transformed into E. coli Top10F' bacteria. Plasmid cloning and transformation were confirmed by polymerase chain reaction (PCR) (Figure 1A) and plasmid enzymatic digestion (Figure 1B).

Expression and purification of human PD-1 protein

The final recombinant plasmid pET26b-PD1 was transformed into the expression host *E. coli* BL21-DE3. The

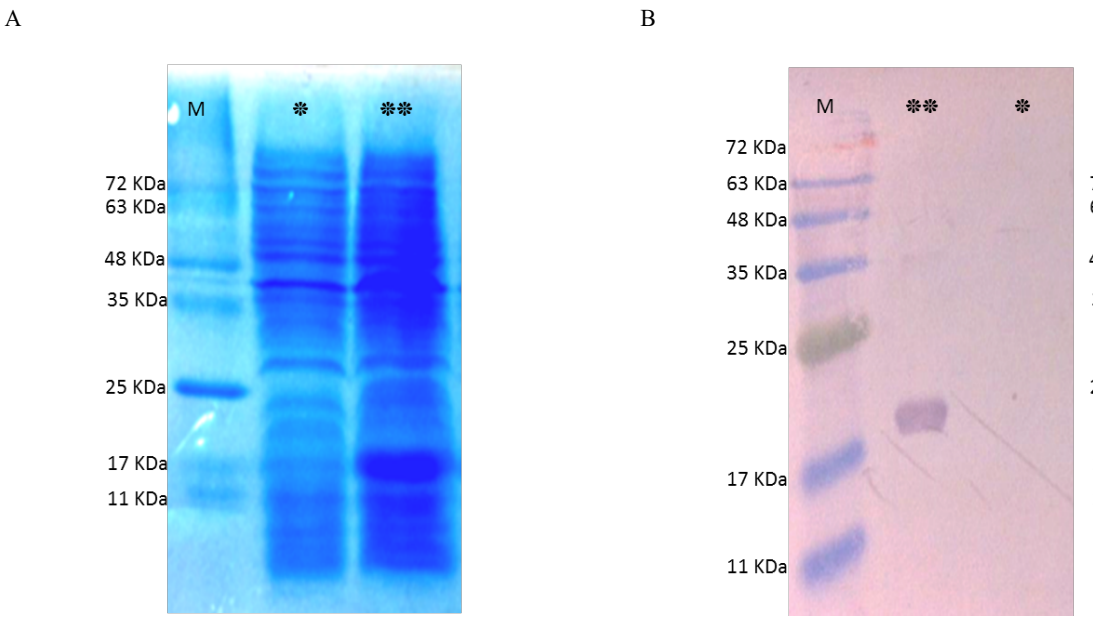


Figure 2. Confirmation of expression of recombinant PD-1 protein

Internal Medicine Today

A) SDS-PAGE, B) Western blot of PD1 protein. *Before induction with IPTG, **After induction with IPTG. M: Protein marker.

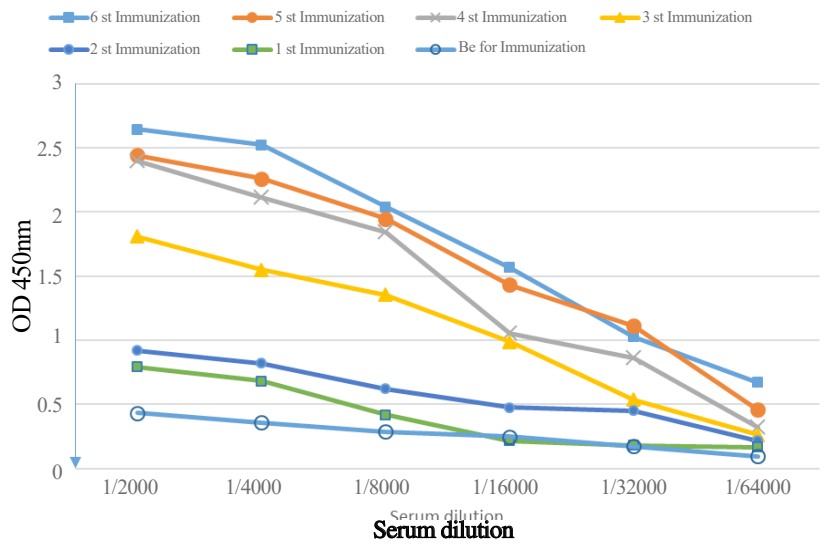


Figure 3. Camel immunization check chart

Internal Medicine Today

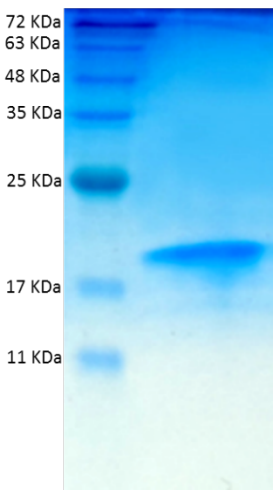
Notes: Serum samples were used after each immunization in different dilutions.

gene was induced with 0.5 mM IPTG at 37 degrees for 3 h (volume 100 mL). PD-1 protein expression was confirmed by 15% SDS-PAGE (Figure 2A). Protein purification was done in a denatured state. The purified protein was confirmed by SDS-PAGE and Western blot (Figure 2B and Figure 2C) with anti-His HRP antibody. The yield of protein expression was calculated to be 3.6 mg/L of culture medium.

Checking the immunization of camels

Recombinant PD-1 protein was used to immunize camels. According to the standard protocol, the injections were performed once a week and 6 times. The ELISA method was used to check the humoral immune response in camels. For this purpose, blood was taken from the camel before each injection. As shown in Figure 3, after the third injection, the amount of the specific antibody against the antigen increased. In the third injection, 1/16000 dilution

A



B

Figure 4. Purified human PD-1 orotein by Ni-NTA column chromatography

Internal Medicine Today

A) SDS-PAGE, B) Western blot

of serum in the ELISA test had OD equal to 1, which indicates a high concentration of the antibody.

Western blot

The Western blot method was used to confirm the binding strength of camel serum containing anti-PD-1 polyclonal antibodies to the protein. The binding of polyclonal antibodies to human PD-1 was proved by the Western blotting method (Figure 4), showing that the prepared polyclonal antibody can identify the antigen in the Western blot and can be used for this test.

Discussion

PD-1 is an inhibitory receptor expressed on adaptive innate and adaptive immune cells that is critical for regulating inflammation and autoreactivity. Currently, it is known that in different cancers, through the expression of programmed death ligand-1, the activation of PD-1 on immune cells is stopped, thereby cancer cells escape from immune system cells [19]. As a result, inhibitors of these proteins, such as antibodies developed against PD-1 and its ligand can be used to reinvigorate antitumor immunity and improve disease [20]. One of the necessary measures in the treatment using monoclonal antibodies is to measure the amount of the target molecule in the patient being treated. In this context, we can mention 3 diagnostic kits approved by the Food and Drug Administration, which are necessary for the classification of patients and the safe and effective use of the relevant drugs [21]. The Ventana SP142 kit is used to investigate the efficacy of atezolizumab, a monoclonal antibody against PD-L1, based on immunohistochemistry, for diagnosis in patients with bladder carcinoma, triple-negative breast cancer, and non-small cell lung cancer. Dako 28-8 and Dako Omnis kits are also used to check PD-L1 levels in some cancer patients receiving therapeutic antibodies. This shows the importance of examining the expression level of these proteins in patients receiving drugs; therefore, examining PD-1 in laboratory techniques is important.

Despite the diagnostic and therapeutic advantages of monoclonal antibodies, polyclonal antibodies are still used in diagnostic and therapeutic work. Reducing the time and cost of production, having a balanced structure, bearing environmental stress, and the ability to bind to multiple epitopes are some of the advantages that facilitate the production, storage, and application of polyclonal antibodies. Since the discovery of heavy chain antibodies in the serum of camels, this type of antibody has also been widely used in diagnosis and treatment [22].

In this study, the extracellular part of the human PD-1 protein was expressed in the prokaryotic host. Then the human PD-1 protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography under denaturing conditions with urea. In a similar study conducted by Zhansaya et al. in 2020, the extracellular part of human PD-1 was cloned in the pET28 vector. In this study, an attempt was made to obtain the protein in a soluble form; therefore, different amounts of IPTG and temperature conditions were evaluated. Finally, the amount of 0.2 mM of IPTG and the temperature of 25 degrees was considered the optimal culture conditions. The protein size in that study was 21 KDa, while in our study it was about 17.5 KDa. The reason for this difference could be related to the place of protein extraction (inside or outside the cell) and the existence of secondary structures in the protein [23]. In the continuation of the study, the purified protein was injected subcutaneously into a 9-month-old camel with 6 repetitions every 2 weeks. The process of camel immunization was investigated by the ELISA method. The data showed that the camel was immunized against the extracellular part of the PD-1 protein with a high titer of camel polyclonal antibody against PD-1. In similar studies conducted by our team regarding camel polyclonal antibodies against [24] LIV-1, [25] CTLA-4, [26] PlGF proteins, it was also shown that recombinant proteins can be used as a suitable source of antigens to stimulate the immune system of camels. Also, in the study of Behdani et al. in 2012, they used VEGFR2 antigen-expressing cells as a source of antigen for camel immunization and showed the effectiveness of the cell as an antigen [27].

It can be concluded that different sources of antigen can be used to immunize camels, similar to other mammals. In the continuation of the study, the binding of camel polyclonal antibody to PD-1 protein was evaluated in the ELISA and Western blot methods, and the results showed that this antibody is capable of binding and identifying human PD-1 protein in the mentioned laboratory tests. This ability has been shown in other subjects as well [24, 26]. One of the applications that camel polyclonal antibodies, given their ability to resist harsh conditions, is to be used as therapeutic antisera for the treatment of patients bitten by poisonous organisms. In the study of Meddeb-Mouelhi et al. in 2003, camel antiserum against scorpion Androctonus australis hector was used and they showed that this antiserum can neutralize the venom [28]. Also, in Behdani et al. 's study, the neutralizing ability of camel antiserum in neutralizing the scorpion Hemiscorpius lepturus was shown [29]. In the continuation of this study, polyclonal antibodies against PD-1 can be evaluated as a therapeutic polyclonal antiserum to prevent the growth of cancer cells in vitro and in vivo.

Conclusion

Finally, the resulting polyclonal antibody can be used as a suitable antibody for diagnostic tests such as ELISA, western blot, flow cytometry and immunohistochemistry.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The Ethics Committee of the Pasteur Institute of Iran approved this article (Code: IR.PII.REC.1400.041).

Funding

This article was done with the financial support of the Pasteur Institute of Iran (Project No.: 1805).

Authors' contributions

The authors contributed equally to preparing this paper.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

We are grateful for the cooperation of Delawar Shahbazada for his effective efforts in achieving the results of this project.

مقاله پژوهشی

بیان نوترکیب پروتئین مرگ برنامه‌ریزی‌شده-۱ انسانی (hPD-1) و توسعه آنتی‌بادی پلی کلونال شتری علیه آن

محمد حسینی‌نژاد چافی[۲،۱]، زهرا کیان مهر[۱]، کامران پوشنگ باقری[۲]، فاطمه کاظمی لمعه دشت[۲]، *مهدی بهدانی[۲]

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Hosseininejad-Chafi M, Kianmehr Z, Pooshang Bagheri K, Kazemi Lomedasht F, Behdani M. [Expression of Recombinant Human Programmed Cell Death Protein-1 and Development of Camel Polyclonal Antibody (Persian)]. Internal Medicine Today. 2022; 28(4): 498-513. https://doi.org/10. 32598/hms.28.4.3858.1

https://doi.org/10.32598/hms.28.4.3858.1

تاریخ دریافت: ۲۳ خرداد ۱۴۰۱
تاریخ پذیرش: ۰۱ مرداد ۱۴۰۱
تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۴۰۱

کلیدواژه‌ها:
پروتئین مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول ۱، آنتی‌بادی زنجیره سنگین، پروتئین نوترکیب، آنتی‌بادی پلی کلونال، وسترن بلات، الایزا

چکیده

اهداف پروتئین مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول ۱ (PD-1) یک گیرنده غشایی است که در سطح لنفوسیت‌های T و B، مونوسیت‌ها، سلول‌های کشنده طبیعی و دندریتیک بیان می‌شود. در سرطان، سیستم PD-1/PD-L1 از تکثیر لنفوسیت‌های T جلوگیری می‌کند و باعث آزادسازی سیتوکین‌ها و سمیت سلولی شده که منجر به آپوپتوز سلول‌های T اختصاصی تومور می‌شود و بدین طریق از پاسخ ایمنی به سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند.

مواد و روش‌ها در این مطالعه، قسمت خارج سلولی پروتئین hPD1 کلون و بیان شد و این پروتئین به‌عنوان آنتی ژن به یک شتر تزریق شد تا آنتی‌بادی پلی کلونال شتری بر علیه پروتئین PD-1 به دست آید.

یافته‌ها نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده بیان مناسب پروتئین در سیستم پروکاریوت می‌باشد. همچنین با استفاده از تست‌هایی مانند الایزا و وسترن بلات ثابت شد که آنتی‌بادی پلی کلونال به‌دست‌آمده از شتر می‌تواند پروتئین PD-1 را شناسایی کند.

نتیجه‌گیری این مطالعه نشان می‌دهد باتوجه‌به مزایایی مانند توانایی اتصال چند اپی توپی، آنتی‌بادی پلی کلونال شتر می‌تواند در تحقیقات مبتنی بر آنتی‌بادی و برای کاربرد مؤثر و قوی که برای تشخیص گیرنده‌های PD-1 هستند، به کار رود.

* نویسنده مسئول:
مهدی بهدانی
نشانی: تهران، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه ونوم و بیومولکول‌های درمانی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی.
تلفن: ۶۴۱۱۲۱۴۴ (۲۱) ۹۸+
پست الکترونیکی: behdani@pasteur.ac.ir

مقدمه

پروتئین مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول۱ (PD-1)، یک گیرنده مهاری است که در طی فعال شدن توسط لنفوسیت‌های T بیان می‌شود. این پروتئین عملکرد سلول‌های T را در طول پاسخ‌های مختلف فیزیولوژیکی مانند عفونت حاد و مزمن، سرطان و خودایمنی، در هموستاز ایمنی تنظیم می‌کند [۱، ۲]. PD-1 یک گلیکوپروتئین سطحی منومر است و توسط ژن PDCD1 که شامل ۵ اگزون است، کدگذاری می‌شود. این پروتئین دارای موتیف‌های مهاری مبتنی بر گیرنده ایمنی تیروزین[1] و یک موتیف سوئیچ گیرنده ایمنی تیروزین[2] می‌باشد [۳، ۴]. PD-1 به‌طور القایی بر روی لنفوسیت‌های T با مارکر سطحی CD4 و CD8، سلول‌های کشنده طبیعی (NK)، سلول‌های B، ماکروفاژها و برخی زیر مجموعه‌های سلول‌های دندریتیک (DC) بیان می‌شود. برخی از سیتوکین‌ها مانند اینترلوکین-۲[3] ، اینترلوکین-۷ و اینترفرون‌ها[4] می‌توانند بیان PD-1 را در سلول‌های T القا کنند [۵]. PD-1 دارای دو لیگاند طبیعی به نام PD-L1 و PD-L2 است که در انتقال سیگنال PD-1/PD-L1,2نقش دارند. PD-1 عمدتاً بر روی سلول‌های T فعال‌شده بیان می‌شود، درحالی‌که لیگاند اصلی آن، PD-L1، بر سطح سلول‌های مختلف (مانند سلول‌های T و B، سلول‌های کشنده طبیعی، سلول‌های ارائه‌کننده آنتی ژن، سلول‌های اپیتلیال و سلول‌های آندوتلیال عروقی) بیان می‌شود [۶].

یکی از نقاط بازرسی ایمنی که بسیاری از تومورها برای فرار از سیستم ایمنی استفاده می‌کنند، محور پروتئین‌های PD-1 و لیگاند آن است. در سلول‌های سرطانی ژن PD-L1 دچار افزایش بیش از حد بیان ژن می‌شود و تعداد پروتئین‌های PD-L1 در سطح آن‌ها افزایش می‌یابد. در سرطان، سیستم PD-1/PD-L1 از تکثیر لنفوسیت‌های T، آزادسازی سیتوکین‌ها و سمیت سلولی جلوگیری می‌کند [۷-۹] که منجر به آپوپتوز سلول‌های T اختصاصی تومور می‌شود و درنتیجه به سلول‌های سرطانی فرصتی برای جلوگیری از پاسخ ایمنی و رشد و گسترش می‌دهد [۱۰]. ایمونوتراپی سرطان اخیراً با هدف طراحی درمان‌های مؤثر برای بهبود ویژگی و قدرت سیستم ایمنی در برابر سرطان توسعه یافته است [۱۱]. جیمز پی آلیسون و تاسوکو هونجو جایزه نوبل فیزیولوژی یا پزشکی ۲۰۱۸ را برای کشف یک درمان سرطان با سرکوب تعدیل ایمنی منفی دریافت کردند. تحقیقات آن‌ها بر روی نقاط بازرسی ایمنی برنامه‌ریزی‌شده مثل PD-1 و پروتئین ۴ سیتوتوکسیک مرتبط با لنفوسیت (CTLA-4)، نشان داد که این پروتئین‌ها دارای نقش بازدارنده در عملکرد ایمنی هستند و پیشنهاد می‌کنند این نقاط بازرسی ایمنی را می‌توان مهار کرد تا دوباره سلول‌های T فعال شوند تا بتوانند سلول‌های سرطانی را به‌طور مؤثری از بین ببرند [۱۲]. این مطلب در تحقیقات بی‌شمار بعدی به اثبات رسید. در حال حاضر به‌عنوان یک نظریه اثبات‌شده می‌باشد که با مهار عملکرد این پروتئین‌های مهاری می‌توان به اهداف درمانی در بهبود سرطان دست یافت.

شواهد زیادی نشان می‌دهد مهار PD-1 یک پاسخ ایمنی مؤثر در برابر سلول‌های سرطانی را نشان می‌دهد [۱۳]. سرکوب مسیر سیگنالینگ PD-1 نشان داده است پاسخ بالینی بیماران مبتلا به تومورهای جامد مختلف و بدخیمی‌های خونی، عمدتاً به سلول‌های T برای نفوذ به تومور متکی است [۱۴]. علاوه‌براین، هدف قرار دادن PD-L1 با پاسخ بالینی قابل توجهی در طیف وسیعی از بیماران سرطانی همراه بوده است. درواقع، PD-1 یک نشانگر ایمونولوژیک قابل توجه است که نقش منفی در پیش‌آگهی سرطان‌های مختلف دارد. بنابراین، تشخیص مولکولی پروتئین PD-1 یک هدف مهم در بسیاری از تحقیقات می‌باشد [۱۵].

آنتی‌بادی‌ها در آزمایش‌های متعدد ایمونوتراپی و ایمونواسی به‌عنوان واکنشگرهای ضروری روزمره می‌باشند. برای تولید آنتی بادی‌ها از حیوانات مختلفی مانند موش، بز، گوسفند، اسب، خرگوش و شتر استفاده می‌شود. آنتی‌بادی‌های پلی کلونال چندین شاخص آنتی ژنی را می‌توانند شناسایی کنند، درحالی‌که آنتی‌بادی‌های منوکلونال تنها یک اپی توپ را شناسایی کردند و اختصاصی هستند. آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در تست‌های تشخیصی را می‌توان از منابع حیوانی مختلف به دست آورد، اما آنتی‌بادی‌های درمانی بایستی از منابع انسانی حاصل شوند، زیرا سبب ایجاد واکنش‌های ایمنولوژیک در بدن خواهند شد. در صورتی که آنتی‌بادی‌های درمانی از حیوانات مثل موش به دست آیند، بایستی بخش‌های ثابت آن با بخش ثابت آنتی‌بادی‌های انسانی جایگزین شوند تا آنتی‌بادی‌های کایمریک یا انسانی‌شده حاصل شود.

سرم شترسانان حاوی دو نوع آنتی‌بادی یعنی آنتی بادی‌های معمول و آنتی بادی‌های زنجیره سنگین یا HcAbs می‌باشد. آنتی بادی‌های زنجیره سنگین نوعی از ایمونوگلوبولین‌های G یا IgG می‌باشند که ساختار آن‌ها تنها از دو زنجیره سنگین تشکیل شده است و زنجیره سبک ندارند. علاوه‌براین، آن‌ها دارای دو دومین ثابت CH2 و CH3 هستند که با دامنه‌های Fc آنتی‌بادی‌های معمولی مشابه هستند، اما فاقد دومین CH1 هستند. محل اتصال آنتی ژن در HcAbsها بسیار منحصر به فرد بوده و تنها دارای یک دومین متغیر به نام VHH، نانو آنتی‌بادی یا نانوبادی است. دومین VHH بسیار کوچک (۱۵-۱۷ کیلو دالتون) بوده که با حلالیت بالا و مقاومت در برابر درجه حرارت، فشار بالا و pH پایین شناخته می‌شود [۱۶-۱۸].

1. Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif (ITIM)
2. Immunereceptor Tyrosine-based switch Motif (ITSM)
3. Interleukin 2 (IL-2)
4. IFNs

باتوجه‌به مزایای آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین شتری و نیاز به تولید آنتی‌بادی علیه hPD-1 در این پژوهش، ژن بخش خارج سلولی پروتئین hPD-1 در وکتور باکتریایی کلون شد و پروتئین نوترکیب بیان و خالص‌سازی شد. سپس یک شتر، با پروتئین نوترکیب PD-1 ایمن‌سازی شد. کارآیی آنتی‌بادی پلی کلونال به‌دست‌آمده در روش‌های آزمایشگاهی الایزا و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین انسانی PD-1

توالی قسمت خارج سلولی PD-1 انسانی (UniprotKB Q15116) حاوی His-tag، سنتز شد و در پلاسمید pGH کلون و به نام PD1-pGH نام‌گذاری شد. سپس ژن PD1 انسانی در وکتور pET-26b بین جایگاه‌های NdeI و XhoI ساب کلون شد. برای تأیید فرایند کلونینگ از روش‌های colony-PCR و هضم آنزیمی تأییدی استفاده شد. پلاسمید نهایی(PD1-pET26b) به باکتری *E.coli* BL21-DE3 ترانسفورم شد و القا بیان پروتئین PD-1، با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌مولار ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور انجام شد. خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA انجام شد. به‌طور خلاصه، رسوب باکتری‌ها با بافر لیزکننده[5] حل و سونیکه شد. مایع رویی سلول به‌وسیله فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد و با رزین Ni-NTA، به‌مدت ۱ ساعت روی یخ انکوبه شد. سپس رزین بر روی ستون ریخته شد و توسط بافر شست‌وشو[6]، شست‌وشو داده شد و پروتئین PD-1 با بافر الوشن[7] از ستون خارج شد. خلوص پروتئین با ژل الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) مورد ارزیابی قرار گرفت. درنهایت نمونه‌های پروتئینی در برابر محلول بافر فسفاته (PBS) دیالیز شدند و سپس نمونه‌ها لیوفیلیزه شدند.

وسترن بلاتینگ

برای تأیید هویت پروتئین PD-1 وسترن بلاتینگ انجام شد. پروتئین تخلیص شده پس از الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE به غشاء نیتروسلولز منتقل شد. سپس غشاء به‌ترتیب با آنتی‌بادی خرگوشی علیه His-tag با رقت ۱/۲۰۰۰ به‌مدت ۱۶ ساعت و آنتی‌بادی ثانویه (آنتی‌بادی ضدخرگوشی کونژوگه[8]) به‌مدت ۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه انکوبه شد. بعد از انکوبه کردن غشا با آنتی‌بادی ثانویه، جهت مشاهده باند پروتئین از سوبسترای ۴-کلرونفتل و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) استفاده شد. در هر مرحله غشاء نیتروسلولز ۳ بار با بافر PBS شست‌وشو داده شد.

ایمنی‌سازی شتر

برای ایمن‌سازی از یک شتر *Camelus dromedaries* ماده ۹ ماهه استفاده شد. برای اولین تزریق، ۱۰۰ میکروگرم از پروتئین نوترکیب PD-1با حجم مساوی از ادجوانت کامل فروند (Sigma، USA) مخلوط شد. سپس در ۶ تزریق بعدی پروتئین با ادجوانت ناقص فروند به‌صورت زیر جلدی، با فواصل هفتگی، برای افزایش پاسخ ایمنی استفاده شد. نمونه‌های خون محیطی قبل از هر تزریق جمع‌آوری و سرم‌ها از خون تام جدا شدند. برای بررسی روند ایمن‌سازی شتر از روش الایزا استفاده شد.

تست الایزا

در تست الایزا، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۱ میکروگرم در چاهک از پروتئین نوترکیب PD-1 بر روی میکروپلیت صاف ۹۶ خانه با بافر سدیم بی‌کربنات (pH 9. 1) به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۲۵ درجه کووت شد. به دنبال آن پلیت با بافر شست‌وشو (PBS) ۳ بار شست‌وشو داده شد و با شیر خشک بدون چربی ۴ درصد بلاکینگ انجام شد. رقت‌های سرم از ۱/۲۰۰ تا ۱/۱۴۰۰۰ به چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد و سپس میکروپلیت به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. بعد از شست‌وشو به‌ترتیب آنتی‌بادی خرگوشی ضدشتری و آنتی‌بادی ضدخرگوشی کانژوگه با HRP در رقت ۱/۲۰۰۰ به چاهک‌ها اضافه شد و هرکدام به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از شست‌وشوی نهایی ۱۰۰ میکرولیتر از محلول TMB به چاهک‌ها اضافه و بعد از مدت ۵ دقیقه با محلول اسید سولفوریک ۲ نرمال واکنش متوقف شد. سپس OD چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

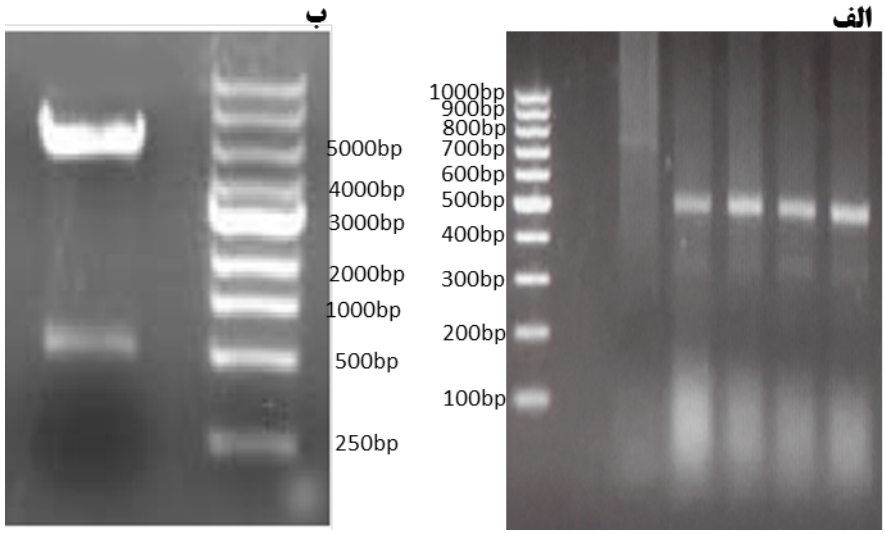
تأیید بیان ژن با الکتروفورز پروتئین

پروتئین نوترکیب PD-1 تخلیص شده و کیفیت تخلیص با روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ژل آکریلامید ۱۵ درصد آماده شد و نمونه‌های پروتئین با بافر لودینگ حاوی 2ME به‌مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. سپس در کنار مارکر بر روی ژل قرار داده شد و فرآیند الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ ولت انجام شد. سپس ژل با رنگ کوماسی بلو R۲۵۰ رنگ‌آمیزی شد.

وسترن بلات با آنتی‌بادی شتری

الکتروفورز پروتئین نوترکیب PD-1 تخلیص‌شده انجام شد. سپس به‌روش نیمه‌خشک (۴۵ دقیقه، ۱۵ ولت) به غشا نیتروسلولز منتقل شد. همه مراحل شست‌وشو با بافر PBS ۳

5. (100mM NaH2PO4، 10mM Tris-HCl، 8M Urea، pH 8. 0)
6. (100mM NaH2PO4، 10mM Tris-HCl، 8M Urea، pH 6. 3)
7. (100mM NaH2PO4، 10mM Tris-HCl، 8M Urea، pH 4. 3)
8. HRP(Cell Signaling Technology، USA)



طب داخلی روز

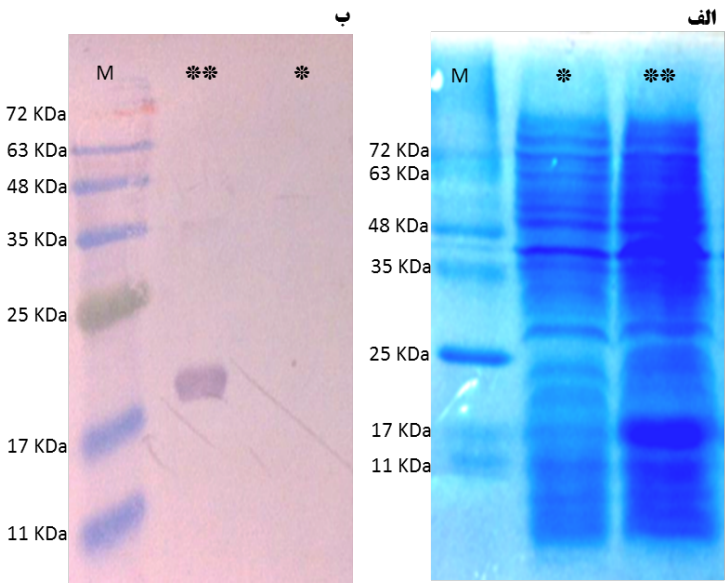
تصویر ۱. تأیید فرایند کلون‌سازی ژن PD-1 در پلاسمید بیانی. (الف) با روش PCR-colony؛ با مشاهده باند ۰۰۵ جفت باز، کلونینگ تأیید شد. (ب) روش هضم آنزیمی؛ با مشاهده باند حدود ۰۰۵ جفت باز کلونینگ تأیید شد.

بار در هر مرحله انجام شد. سرم شتری که دارای آنتی‌بادی پلی کلونال شتری بر علیه پروتئین نوترکیب PD-1 با رقت ۱/۲۰۰ بر روی غشاء نیترو سلولز به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. بعد از شست‌وشو، آنتی‌بادی خرگوشی ضدشتری و آنتی‌بادی ضدخرگوشی کانژوگه با HRP با رقت ۱/۲۰۰۰ به‌ترتیب هرکدام به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه و جهت مشاهده پروتئین از سوبسترای ۴-کلرونفتل و هیدروژن پراکسیداز (H_2O_2) استفاده شد.

یافته‌ها

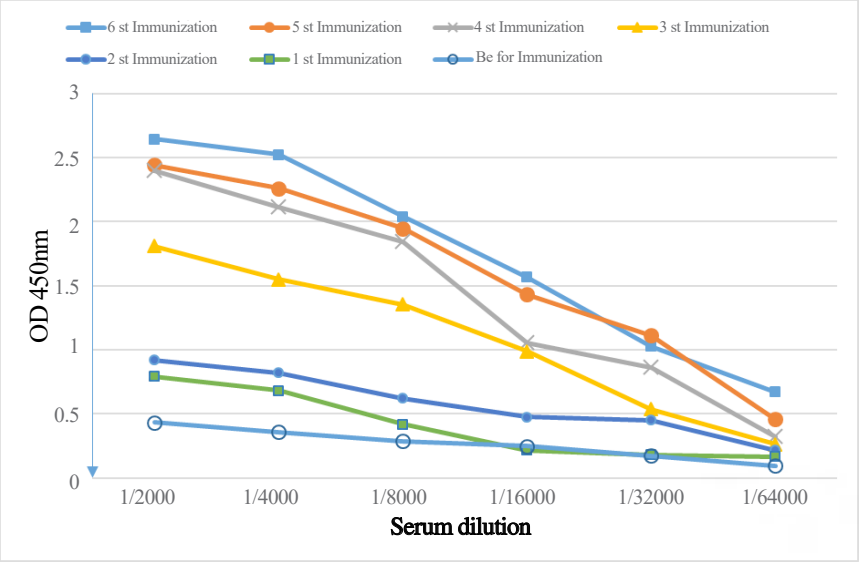
کلونینگ پروتئین PD-1 انسانی

برای بیان و تخلیص پروتئین PD-1، توالی کدکننده پروتئین PD-1 انسانی در داخل پلاسمید بیانی pET-26 با استفاده از جایگاه‌های آنزیمی کلونینگ NdeIو XhoI کلون شد و به باکتری *E.coli* Top10F' ترانسفرم شد. تأیید کلونینگ و ترانسفورماسیون پلاسمید، با کلونی PCR (تصویر شماره ۱ الف) و هضم آنزیمی پلاسمید (تصویر شماره ۱ ب) انجام شد.



طب داخلی روز

تصویر ۲. تایید بیان نوترکیب پروتئین DP-1. (الف). PAGE-SDS(ب) وسترن بلات پروتئین PD1. M؛ مارکر پروتئین، * قبل از القا با IPTG، ** بعد از القا با IPTG



تصویر ۳. نمودار بررسی ایمن‌سازی شتر. نمونه‌های سرم پس از هر ایمن‌سازی در رقت‌های مختلف مورد استفاده شد.

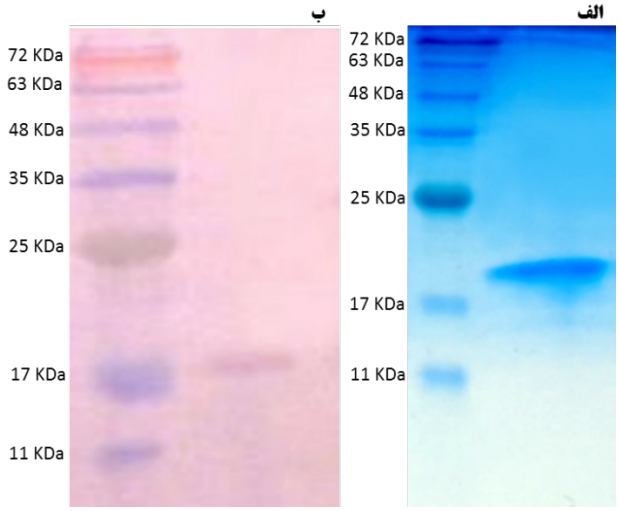
طب داخلی روز

بیان و تخلیص پروتئین انسانی PD-1

پلاسمید نوترکیب نهایی pET26b-PD1 به میزبان بیانی *E.coli* BL21-DE3 ترانسفورم شد. بیان ژن با ۰/۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۳ ساعت القا شد (حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر). بیان پروتئین PD-1 با ۱۵٪ SDS-PAGE تأیید شد (تصویر شماره ۲ الف). تخلیص پروتئین در حالت دناتوره انجام شد. پروتئین تخلیص‌شده توسط SDS-PAGE و وسترن بلات (تصویر شماره ۲ ب و ج) با آنتی‌بادی anti-His HRP تأیید شد. بازده بیان پروتئین ۳/۶ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت محاسبه شد.

بررسی ایمن‌سازی شتر

برای ایمن‌سازی شتر از پروتئین نوترکیب PD-1 استفاده شد. براساس پروتکل استاندارد تزریق‌ها با فاصله هفته‌ای ۱ بار و ۶ بار انجام شد. برای بررسی پاسخ ایمنی هومورال در شتر از روش الایزا استفاده شد. برای این منظور پیش‌از هر بار تزریق از شتر خون‌گیری شد. همان‌طور که در تصویر شماره ۳ نشان داده شده است، پس از تزریق سوم میزان آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی ژن بالا رفته است. در تزریق سوم، رقت ۱/۱۶۰۰۰ از سرم در تست الیزا OD معادل ۱ داشت که نشان‌دهنده غلظت بالای آنتی‌بادی می‌باشد.



تصویر ۴. پروتئین تخلیص‌شده hPD-1 با ستون کروماتوگرافی Ni-NTA. (الف) PAGE-SDS (ب) وسترن بلات

طب داخلی روز

وسترن بلات

برای تأیید قدرت اتصال سرم شتر حاوی آنتی‌بادی‌های پلی کلونال ضد PD-1 به پروتئین از روش وسترن بلات استفاده شد. اتصال آنتی‌بادی پلی کلونال به hPD-1 و با روش وسترن بلاتینگ اثبات شد (تصویر شماره ۴). این موضوع نشان داد آنتی‌بادی پلی کلونال تهیه‌شده قادر به شناسایی آنتی ژن در وسترن بلات می‌باشد و می‌تواند برای این تست مورد استفاده قرار گیرد.

بحث

پروتئین مرگ برنامه‌ریزی شده-۱ یک گیرنده مهاری است که بر روی سلول‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی سازگار بیان می‌شود که برای تنظیم التهاب و خود واکنشی حیاتی است. در حال حاضر مشخص شده است که در سرطان‌ها، از طریق بیان لیگاند مرگ برنامه‌ریزی شده-۱، فعال‌سازی PD-1 بر روی سلول‌های ایمنی متوقف شده است و به این واسطه سلول‌های سرطانی از سلول‌های سیستم ایمنی فرار می‌کنند [۱۹]. درنتیجه، مهارکننده‌های این پروتئین‌ها مانند آنتی‌بادی‌هایی که علیه PD-1 و لیگاند آن توسعه یافته‌اند، می‌توانند برای تقویت مجدد ایمنی ضد توموری و بهبود بیماری، مورد استفاده قرار گیرند [۲۰]. یکی از اقدامات لازم در درمان با استفاده از آنتی بادی‌های منوکلونال سنجش میزان مولکول هدف در بیمار تحت درمان می‌باشد. در این زمینه می‌توان به ۳ کیت تشخیصی مورد تأیید FDA که برای طبقه‌بندی بیماران و استفاده ایمن و مؤثر از داروهای مربوطه ضروری است، اشاره کرد [۲۱].

کیت Ventana SP142 برای بررسی کارآیی داروی آتزولیزوماب که یک آنتی‌بادی منوکلونال علیه PD-L1 و بر پایه ایمنوهیستوشیمی است، برای تشخیص در بیماران مبتلا به کارسینوم مثانه، سرطان سینه ۳ گانه منفی و سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC) استفاده می‌شود. همچنین دو کیت Dako ۲۸-۸ و Dako Omnis برای بررسی میزان PD-L1 در برخی از بیماران سرطانی که دریافت‌کننده آنتی‌بادی‌های درمانی هستند، استفاده می‌شود. این موضوع نشان از اهمیت بررسی میزان بیان این پروتئین‌ها در بیماران دریافت‌کننده داروها می‌باشد، بنابراین بررسی PD-1 در تکنیک‌های آزمایشگاهی بسیار مهم است.

با وجود مزایای تشخیصی و درمانی آنتی‌بادی‌های منوکلونال[9]، هنوز هم از آنتی‌بادی‌های پلی کلونال[10] در کارهای تشخیصی و درمانی استفاده می‌شود. کاهش زمان و هزینه تولید، داشتن ساختار متعادل، تحمل تنش‌های محیطی و توانایی اتصال به چند اپی توپ از مزایایی است که تولید، ذخیره‌سازی و کاربرد پلی کلونال آنتی‌بادی‌ها را تسهیل می‌کند. از زمان کشف آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین در سرم شترسانان این نوع از آنتی بادی‌ها نیز به‌طور گسترده در تشخیص و درمان استفاده شده است [۲۲].

در این مطالعه قسمت خارج سلولی پروتئین انسانی hPD-1 در میزبان پروکاریوتی بیان شد. سپس پروتئین hPD-1 با کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA در شرایط دناتوره‌کننده با اوره خالص شد. در مطالعه مشابهی که توسط ژانساوا و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام شد، بخش خارج سلولی hPD-1 در وکتور pET۲۸ کلون شد. در این مطالعه تلاش شد تا پروتئین به‌صورت محلول به دست آید، بنابراین مقادیر مختلف IPTG و شرایط دمایی مورد ارزیابی قرار گرفت. درنهایت میزان mM ۰/۲ از IPTG و دمای ۲۵ درجه به‌عنوان شرایط کشت بهینه عنوان شد. اندازه پروتئین در آن پژوهش KDa ۲۱ به دست آمد، درحالی‌که در مطالعه حاضر حدود KDa ۱۷/۵ بود، علت این تفاوت می‌تواند مربوط به محل استخراج پروتئین (داخل یا خارج سلول) و داشتن یا نداشتن ساختارهای ثانویه در پروتئین باشد [۲۳].

پروتئین تخلیص‌شده به یک شتر ۹ ماهه با ۶ بار تکرار و به‌صورت ۲ هفته ۱ بار به‌صورت زیر جلدی تزریق شد. با روش الایزا روند ایمن‌سازی شتر مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها نشان داد شتر در برابر قسمت خارج سلولی پروتئین PD-1 با تیتر بالایی از آنتی‌بادی پلی کلونال شتر علیه PD-1 ایمن شده بود. در مطالعات مشابهی که توسط تیم ما در خصوص آنتی‌بادی‌های پلی کلونال شتری علیه پروتئین‌های LIV-1[۲۴]، CTLA-4 [۲۵]، PlGF [۲۶] صورت گرفت نیز نشان داده شد که پروتئین‌های نوترکیب می‌توانند به‌عنوان یک منبع آنتی ژنی مناسب برای تحریک سیستم ایمنی شتر باشند. همچنین در مطالعه بهدانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ از سلول بیان‌کننده آنتی ژن VEGFR2 به‌عنوان منبع آنتی ژن برای ایمن‌سازی شتر استفاده کردند و کارآیی سلول را به‌عنوان آنتی ژن نشان دادند [۲۷].

درمجموع می‌توان نتیجه گرفت که برای ایمن‌سازی شتر همانند سایر پستانداران می‌توان از منابع مختلف آنتی ژن استفاده کرد. اتصال آنتی‌بادی پلی کلونال شتری به پروتئین PD-1 در روش‌های الایزا و وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان داد این آنتی‌بادی قادر به اتصال و شناسایی پروتئین hPD-1 را در تست‌های آزمایشگاهی یادشده دارا می‌باشد. این قابلیت در سایر مطالعات نیز نشان داده شده است [۲۴، ۲۶]. یکی از کاربردهایی که برای آنتی‌بادی‌های پلی کلونال شتری، به‌علت توانایی مقاومت آن‌ها در شرایط سخت می‌توان متصور بود، استفاده به‌عنوان آنتی سرم‌های درمانی برای درمان بیماران گزش‌یافته توسط جانداران سمی می‌باشد.

در مطالعه مدب-مولهی و همکاران در سال ۲۰۰۳ از آنتی سرم شتری ضد عقرب Androctonus australis hector استفاده شد و نشان دادند این آنتی سرم توانایی خنثی‌سازی سم را دارا

9. mAbs
10. pAbs

می‌باشد [۲۸]. همچنین در مطالعه بهدانی و همکاران قابلیت خنثی‌سازی آنتی سرم شتری در خنثی‌سازی عقرب Hemis-corpius lepturus نشان داده شد [۲۹]. می‌توان آنتی‌بادی پلی کلونال علیه PD-1 را به‌عنوان یک آنتی سرم درمانی پلی کلونال جهت جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانی در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی مورد ارزیابی قرار داد.

نتیجه‌گیری

درنهایت می‌توان آنتی‌بادی پلی کلونال حاصله را به‌عنوان یک آنتی‌بادی مناسب برای تست‌های تشخیصی مثل الایزا وسترن بلات ونیز فلوسیتومتری و ایمنوهیستوشیمی مورد استفاده قرار داد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کد اخلاق این طرح به شماره IR. PII. REC. 1400. 041 مصوب کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران می‌باشد.

حامی مالی

این مقاله با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران از طریق طرح شماره ۱۸۰۵ انجام شد.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از همکاری دکتر دلاور شهباززاده برای تلاش‌های مؤثرشان در به نتیجه رسیدن این پروژه تقدیر و تشکر می‌شود.

References

[1] Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1: PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. Frontiers in Immunology. 2016; 7: 550. [DOI: 10. 3389/fimmu. 2016. 00550] [PMID] [PMCID]

[2] Shrimali RK, Janik JE, Abu-Eid R, Mkrtichyan M, Khleif SN. Programmed death-1 & its ligands: Promising targets for cancer immunotherapy. Immunotherapy. 2015; 7(7): 777-92. [DOI: 10. 2217/imt. 15. 49] [PMID]

[3] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. The EMBO Journal. 1992; 11(11): 3887-95. [DOI: 10. 1002/j. 1460-2075. 1992. tb05481. x] [PMID] [PMCID]

[4] Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). Genomics. 1994; 23(3): 704-6. [DOI: 10. 1006/geno. 1994. 1562] [PMID]

[5] Terawaki S, Chikuma S, Shibayama S, Hayashi T, Yoshida T, Okazaki T, et al. IFN-alpha directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity. Journal of Immunology. 2011; 186(5): 2772-9. [DOI: 10. 4049/jimmunol. 1003208] [PMID]

[6] Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: From discovery to clinical application. International Immunology. 2007; 19(7): 813-24. [DOI: 10. 1093/intimm/dxm057] [PMID]

[7] Muenst S, Soysal SD, Gao F, Obermann EC, Oertli D, Gillanders WE. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment. 2013; 139(3): 667-76. [DOI: 10. 1007/s10549-013-2581-3] [PMID] [PMCID]

[8] Dong Y, Wong JSL, Sugimura R, Lam KO, Li B, Kwok GGW, et al. Recent advances and future prospects in Immune Checkpoint (ICI)-based combination therapy for advanced HCC. Cancers (Basel). 2021; 13(8): 1949. [DOI: 10. 3390/cancers13081949] [PMID] [PMCID]

[9] Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. Science. 2015; 348(6230): 56-61. [DOI: 10. 1126/science. aaa8172] [PMID]

[10] Sun S, Fei X, Mao Y, Wang X, Garfield DH, Huang O, et al. PD-1(+) immune cell infiltration inversely correlates with survival of operable breast cancer patients. Cancer Immunology, Immunotherapy: CII. 2014; 63(4): 395-406. [DOI: 10. 1007/s00262-014-1519-x] [PMID]

[11] Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pasdar A, et al. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. Journal of Cellular Physiology. 2019; 234(10): 16824-37. [DOI: 10. 1002/jcp. 28358] [PMID]

[12] Ljunggren HG, Jonsson R, Hoglund P. Seminal immunologic discoveries with direct clinical implications: The 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine honours discoveries in cancer immunotherapy. Scandinavian Journal of Immunology. 2018; 88(6): e12731. [DOI: 10. 1111/sji. 12731] [PMID]

[13] Messenheimer DJ, Jensen SM, Afentoulis ME, Wegmann KW, Feng Z, Friedman DJ, et al. Timing of PD-1 blockade is critical to effective combination immunotherapy with Anti-OX40. Clinical Cancer Research. 2017; 23(20): 6165-77. [DOI: 10. 1158/1078-0432. CCR-16-2677] [PMID] [PMCID]

[14] Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. Journal of Biomedical Science. 2017; 24(1): 26. [DOI: 10. 1186/s12929-017-0329-9] [PMID] [PMCID]

[15] Sacher AG, Gandhi L. Biomarkers for the clinical use of PD-1/PD-L1 inhibitors in non-small-cell lung cancer: A review. JAMA Oncology. 2016; 2(9): 1217-22. [DOI: 10. 1001/jamaoncol. 2016. 0639] [PMID]

[16] Muyldermans S. Applications of nanobodies. Annual Review of Animal Biosciences. 2021; 9: 401-21. [DOI: 10. 1146/annurev-animal-021419-083831] [PMID]

[17] Muyldermans S. A guide to: Generation and design of nanobodies. The FEBS Journal. 2021; 288(7): 2084-102. [DOI: 10. 1111/febs. 15515] [PMID] [PMCID]

[18] Rahbarizadeh F, Ahmadvand D, Sharifzadeh Z. Nanobody; an old concept and new vehicle for immunotargeting. Immunological Investigations. 2011; 40(3): 299-338. [DOI: 10. 3109/08820139. 2010. 542228] [PMID]

[19] Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. Nature Medicine. 2002; 8(8): 793-800. [DOI: 10. 1038/nm730] [PMID]

[20] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. The New England Journal of Medicine. 2012; 366(26): 2443-54. [DOI: 10. 1056/NEJMoa1200690] [PMID] [PMCID]

[21] Food and Drug Administration. List of cleared or approved companion diagnostic devices (in vitro and imaging tools). Maryland: Food and Drug Administration; 2022. [Link]

[22] Pillay TS, Muyldermans S. Application of single-domain antibodies ("Nanobodies") to laboratory diagnosis. Annals of Laboratory Medicine. 2021; 41(6): 549-58. [DOI: 10. 3343/alm. 2021. 41. 6. 549] [PMID] [PMCID]

[23] Zhansaya A, Kanatbek M, Kanat T, Bakhytkali I, Darkhan K, Arman K, et al. Recombinant Expression and Purification of Extracellular Domain of the Programmed Cell Death Protein Receptor. Reports of Biochemistry & Molecular Biology. 2020; 8(4): 347-57. [PMID]

[24] Ghaderi H, Noormohammadi Z, Habibi-Anbouhi M, Kazemi-Lomedasht F, Behdani M. [Preparation of heavy chain polyclonal antibody against zinc transporter SLC39A6 and its diagnostic application (Persian)]. Tehran University Medical Journal. 2021; 79(4): 274-80. [Link]

[25] Sotoudeh N, Noormohammadi Z, Habibi-Anbouhi M, Kazemi-Lomedasht F, Behdani M. Evaluation of laboratory application of camelid sera containing heavy-chain polyclonal antibody against recombinant cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4. Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy. 2019; 38(6): 235-41. [DOI: 10. 1089/mab. 2019. 0031] [PMID]

[26] Arezumand R, Mahdian R, Behdani M, Khanahmad H, Langari J, Namvarasl N, et al. Recombinant expression and purification of human placental growth factor 1 and specific camel heavy chain polyclonal antibody preparation. Saudi Journal of Biological Sciences. 2014; 21(1): 35-9. [DOI: 10. 1016/j. sjbs. 2013. 04. 008] [PMID] [PMCID]

[27] Behdani M, Zeinali S, Khanahmad H, Karimipour M, Asadzadeh N, Azadmanesh K, et al. Generation and characterization of a functional Nanobody against the vascular endothelial growth factor receptor-2; angiogenesis cell receptor. Molecular Immunology. 2012; 50(1-2): 35-41. [DOI: 10. 1016/j. molimm. 2011. 11. 013] [PMID]

[28] Meddeb-Mouelhi F, Bouhaouala-Zahar B, Benlasfar Z, Hammadi M, Mejri T, Moslah M, et al. Immunized camel sera and derived immunoglobulin subclasses neutralizing Androctonus australis hector scorpion toxins. Toxicon. 2003; 42(7):785-91. [DOI: 10. 1016/j. toxicon. 2003. 10. 021] [PMID]

[29] Behdani M, Hosseini Nejad Chafi M, Zeinali S, Karimipour M, Khanahmad-Shahreza H, Ghasemi P, et al. [Antiserum production in immunized camel by the venom of Hemiscorpius lepturus scorpion: Evaluation of neutralizing test in vivo (Persian)]. Tehran University Medical Journal. 2010; 68(5):268-73. [Link]