مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۹۸/هفته‌ی دوم آبان ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۳۱

طراحی بیوانفورماتیک برای تولید واکسن پپتیدی Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) انسانی و ارزیابی آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی آن در موش

فائزه سلطان‌پور غریب‌دوستی[۱]، غلامعلی کاردر[۲]، بنفشه فاضلی دلشاد[۱]، رضا فلک[۳]، مزدک گنجعلی‌خانی حاکمی[۴]، علیرضا عندلیب[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بافت توموری، بدون فرایند آنژیوژنز نمی‌تواند بیش از ۲ میلی‌متر مکعب در بدن رشد کند. عامل رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor یا VEGF) نقش حیاتی در این فرایند دارد و مهار آن، می‌تواند به عنوان یکی از راهبردهای ایمنی‌درمانی سرطان به کار رود.

روش‌ها: توالی پپتیدی ایزوفرم‌های VEGF-A، از پایگاه‌های داده‌ی پروتئینی، انتخاب و با نرم‌افزارهای رایج هم‌راستاسازی گردید. اپی‌توپ‌های تحریک کننده‌ی پاسخ ایمنی شناسایی و از نظر عدم هم‌پوشانی با سایر پروتئین‌های بدن بررسی شدند. توالی پپتیدی، پس از تولید با Keyhole limpet hemocyanin (KLH) کونژوگه شد و جهت ایمن‌سازی موش‌ها استفاده گردید. تیتر آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد VEGF-A با روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) و با کمک پپتید کونژوگه شده با آلبومین سرم گاوی (Bovine serum albumin یا BSA) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: توالی پپتیدی ۴۱ اسید آمینه‌ای انتخابی از نظر بیوانفورماتیک هیچ گونه هم‌پوشانی با سایر پروتئین‌های بدن نشان نداد و از لحاظ نظری، آنتی‌ژنیسیته‌ی کافی و توانایی تحریک پاسخ ایمونولوژیک ضد توموری را داشت. با روش ELISA، در موش‌های واکسینه در مقایسه با گروه شاهد افزایش تیتر آنتی‌بادی اختصاصی مشاهده شد. الکتروفورز پپتید کونژوگه با BSA، نشان داد که کونژوگاسیون به طور مؤثری انجام شده و مراحل بهینه‌سازی آزمون ELISA اثبات کرد که در صورت پوشاندن پلیت‌های ELISA با کونژوگه‌ی پیش‌گفته، نتایج حاصل تکرار پذیری بهتری نسبت به پوشاندن پلیت با پپتید خالص دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج بر کارآمدی پپتید کونژوگه با KLH جهت ایمن‌سازی و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد VEGF تأکید داشت. بالا بودن تیتر آنتی‌بادی تولید شده بر ضد این آنتی‌ژن، پیشنهاد می‌کند که این پپتید، می‌تواند به عنوان تحریک کننده‌ی سیستم ایمنی در مدل حیوانی به کار رود.

واژگان کلیدی: واکسن پپتیدی، ایمونوانفورماتیک، پپتید الایزا، عامل رشد اندوتلیال رگ

ارجاع: سلطان‌پور غریب‌دوستی فائزه، کاردر غلامعلی، فاضلی دلشاد بنفشه، فلک رضا، گنجعلی‌خانی حاکمی مزدک، عندلیب علیرضا. **طراحی بیوانفورماتیک برای تولید واکسن پپتیدی Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) انسانی و ارزیابی آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی آن در موش.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۹۸): ۱۰۵۹-۱۰۵۴

مقدمه

آنژیوژنز به معنی تشکیل رگ خونی جدید از رگ های موجود در بدن است که این فرایند جهت رساندن اکسیژن و مواد غذایی برای سلول توموری در حال تکثیر ضروری است. بافت توموری بدون فرایند آنژیوژنز، نمی‌تواند بیش از ۲ میلی‌متر مکعب در بدن رشد کند. بنابراین، مهار مسیر آنژیوژنز، می تواند یکی از راهبردهای مهم ایمنی درمانی سرطان باشد (۱). آنژیوژنز، توسط عوامل مختلفی تنظیم می گردد که یکی از مؤثرترین این عوامل، عامل رشد اندوتلیال رگ (VEGF یا Vascular endothelial growth factor) می‌باشد که در تمام مراحل رشد تومور بیان می شود. ترشح مداوم VEGF از سلول های توموری و

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی و گروه زیست فن‌آوری پزشکی، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: علیرضا عندلیب
Email: andalib@med.mui.ac.ir

داشتن خصوصیات اتوکراین و اندوکراین این عامل رشد، در پیشبرد آنژیوژنز و گسترش و رشد تومور ضروری است (۲). امروزه، رویکردهای درمانی مبتنی بر مکانیسم‌های ضد آنژیوژنز توسط مجامع جهانی تأیید شده و در بعضی کشورها این شیوه‌نامه‌های درمانی در حال استفاده و در بعضی دیگر، در مراحل بررسی و تأیید بالینی می‌باشند. داروهای زیستی و مصنوعی، اثرات مهار کننده‌ی خود را در چهار مرحله‌ی کلیدی پیش‌برنده‌ی فرایند آنژیوژنز اعمال می‌کنند. مهار کننده‌هایی نظیر راپامایسین و تالیدومید، تولید VEGF را توسط سلول‌های توموری کاهش می‌دهند (۵-۳).

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نظیر Bevacizumab (آواستین یا آنتی‌بادی مونوکلونال نوترکیب انسانی علیه VEGF-A) و Aflibercept، مانع میان‌کنش VEGF محلول با پذیرنده‌ی آن می‌شوند (۸-۶). آنتی‌بادی‌هایی نظیر IMC-1121b به طور مستقیم دسترسی به Vascular endothelial growth factor receptor2 (VEGFR2) مونومریک را در سطح سلول‌های اندوتلیال مسدود می‌کنند. در نهایت این که داروهای مصنوعی کوچک در مسیر پیام‌رسانی گیرنده‌ی VEGF داخل سلولی در سلول‌های توموری تداخل ایجاد می‌کنند (۱۰-۹). در میان رویکردهای جدید ضد آنژیوژنز، ایمنی درمانی فعال اختصاصی شاخه‌ای است که امروزه به شدت در حال توسعه می‌باشد. واکسن‌های ضد آنژیوژنز اغلب از DNA، پپتید و یا پروتئین‌های خودی نظیر VEGF، پذیرنده‌ی VEGF و سایر مولکول‌های مرتبط با آنژیوژنز تشکیل شده‌اند و بیشتر آنتی‌ژن‌های خودی را مورد هدف قرار می‌دهند.

با توجه به این که شدت و مدت زمان پاسخ ایمنی اختصاصی در برابر آنتی‌ژنهای خودی ضعیف است، به نظر می‌رسد که مسمومیت و اثرات جانبی ناشی از آن‌ها بسیار کمتر از داروهای متعارف شیمی درمانی باشد و به کارگیری این واکسن‌ها در کنار پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و استفاده از سایر آنتی بادی های ضد آنژیوژنز و محصولات مصنوعی، مانع عود و پیشرفت تومور شود و یا رشد آن را به تأخیر بیاندازد (۱۵-۱۱).

روش‌ها

آنالیزهای ایمونوانفورماتیک: به منظور تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد VEGF انسانی، ابتدا تمام ایزوفرم های انسانی VEGF-A از پایگاه اطلاعاتی UniProt (www.uniprot.org) استخراج شد. جهت هم‌راستاسازی توالی‌های مختلف VEGF-A از نرم‌افزار Mega-4 (www.mega4software.net) استفاده گردید و با استفاده از این نرم‌افزار، بخش‌های مشترک و محافظت شده در ایزوفرم‌های مختلف VEGF-A مشخص گردید. از میان بخش‌های مشترک و محافظت شده‌ی پیش‌گفته، یک توالی پپتیدی ۴۱ اسید آمینه‌ای انتخاب گردید که در این توالی، بخشی از اپی توپ هدف آنتی‌بادی مونوکلونال درمانی Bevacizumab نیز قرار داشت. برای بررسی های بیشتر، از پایگاه داده‌ی IEDB (Immune epitope data base) استفاده گردید و اپی توپ‌های سلول B و سلول T از نظر ایمونوژنیسیته، هیدروفوبیسیته و میزان دسترسی به ناحیه‌ی مورد نظر نیز بررسی شدند.

سپس، برای بررسی عدم هم‌پوشانی این اپی‌توپ‌ها با سایر آنتی‌ژن‌های موجود در بدن از BLAST P استفاده گردید. توالی پپتیدی انتخاب شده به صورت مجزا و متصل به Keyhole limpet hemocyanin (KLH) توسط شرکت Selleckchem (www.selleckchem.com) سنتز شد.

ایمن‌سازی موش آزمایشگاهی جهت تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد VEGF: ۱۰ عدد موش BALB/c ماده با سن ۸-۶ هفته، با استفاده از پپتید کونژوگه با KLH ایمونیزه شدند. موش‌های مورد مطالعه، از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه شدند و تمامی مراحل کار شامل ایمن‌سازی و خون‌گیری در این مرکز با رعایت اصول اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید. پس از ایمن سازی اولیه در هفته ی صفر، تزریقات یادآور در هفته های دوم، چهارم، دهم و سیزدهم صورت گرفت. محلول تزریقی در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر به صورت زیر پوستی (Subcutaneous) و بدون استفاده از ادجوانت تزریق گردید. خون‌گیری از موش‌ها، هر دو هفته یک بار و در هفته‌های ابتدایی از گوشه‌ی چشم و در آخرین مرحله، از قلب موش‌ها انجامگرفت. پس از خون‌گیری، سرم موش‌ها جدا شد و در فریزر با دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

کونژوگاسیون پپتید VEGF با BSA جهت طراحی ELISA: پس از خون‌گیری تیتر آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد پپتید سنجیده شد. به طور خلاصه، با توجه به این که پپتید مورد نظر کوچک بود و قدرت اتصال کافی به پلیت ELISA نداشت، از این رو، ابتدا با آلبومین سرم گاوی (Bovine serum albumin یا BSA) به عنوان حامل کونژوگه شد و جهت پوشاندن چاهک‌های ELISA مورد استفاده قرار گرفت. جهت کونژوگاسیون، ابتدا ۰/۵ میلی‌گرم از پپتید در ۰/۵ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید حل شد و به آن، ۱ میلی‌لیتر بی‌کربنات سدیم ۱۰۰ میلی مولار حاوی ۲ میلی گرم BSA اضافه شد. سپس، ۱ میلی لیتر گلوتار آلدئید ۰/۲ درصد اضافه شد و محتویات به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد انکوبه شد. سپس، با افزودن ۲۵۰ میکرولیتر سدیم بورهیدرات (و تکرار این مرحله پس از ۱۵ دقیقه) واکنش متوقف شد. جهت حذف مولکول های مداخله گر محصول نهایی در مقابل بافر فسفات نمکی (Phosphate buffered saline یا PBS) دیالیز شد.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) و رنگ‌آمیزی ژل به روش نیترات نقره: ۵ میکروگرم از نمونه های مورد نظر شامل پپتید، BSA، پپتید کونژوگه با BSA در

کنار استاندارد وزن مولکولی با بافر نمونه‌ی ۲ برابری مخلوط و ۵ دقیقه در ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد و بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۱۲/۵ درصد الکتروفورز شد. پس از پایان الکتروفورز، ژل‌ها با روش نیترات نقره (روش Damerval) رنگ‌آمیزی شدند (۱۶). بدین منظور، ژل مورد نظر یک بار با آب مقطر شستشو داده شد و به مدت یک ساعت در محلول تثبیت کننده (۵۰ میلی‌لیتر متانول به علاوه‌ی ۱۰ میلی‌لیتر اسید استیک) قرار گرفت تا آب‌گیری شود. سپس، ژل سه بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با اتانول ۵۰ درصد شستشو داده شد. سپس، محلول تیوسولفات (۰/۱ درصد) روی ژل افزوده شد و یک دقیقه ژل داخل آن غوطه‌ور گشت. پس از شستشو، محلول نیترات نقره (۰/۱ درصد) روی ژل ریخته شد و ژل به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. پس از شستشو با آب مقطر، محلول کربنات سدیم (۶ درصد) اضافه شد تا باندهای پروتئینی ظاهر شوند. پس از ظهور باندها، با افزودن حجم مناسبی از اسید استیک، واکنش متوقف گردید و ژل شسته و اسکن شد.

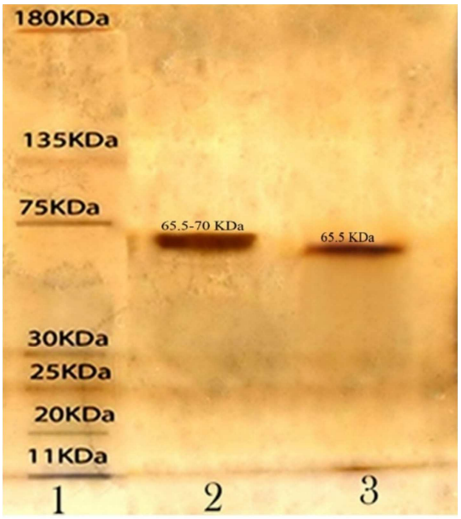
طراحی پپتید ELISAی غیر مستقیم برای بررسی تیتر آنتی‌بادی‌های ضد VEGF در سرم: پپتید VEGF کونژوگه با BSA با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر بی‌کربنات ۰/۱ مولار با pH ۹/۶ تهیه شد و جهت کوت کردن چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای (Maxisorb, Costar, USA) استفاده شد. جهت کوت کردن آنتی‌ژن، مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول پیش‌گفته در هر یک از چاهک‌های ELISA اضافه شد و پلیت یک شب در دمای ٤ درجه‌ی سانتی گراد انکوبه شد. پس از سه مرتبه شستشو با بافر فسفات نمکی حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰ (Tween 20)، فضاهای کوت نشده‌ی چاهک‌ها با کازئین ۵ درصد (محلول در بافر فسفات نمکی) مسدود گردید و پلیت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از سه بار شستشو، ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های سریال‌های سرم به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت‌ها به مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از هفت بار شستشو به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB/H_2O_2 اضافه شد و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، واکنش با اسید سولفوریک ۲ مولار متوقف شد و جذب نوری در ٤۵۰ نانومتر در مقابل فیلتر ٦۳۰ نانومتر خوانده شد.

روش‌های آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون t Independent در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۵ (version 15, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گردید. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج آنالیزهای ایمونوانفورماتیک: بررسی ایمونوانفورماتیک نشان داد که توالی پپتیدی مشترک و محافظت شده‌ی انتخابی دارای اپی‌توپ‌های خطی مناسب، انعطاف پذیری و هیدروفوبیسیته‌ی کافی بود و آنتی‌ژنیسیته‌ی مناسب جهت تحریک سیستم ایمنی علیه VEGF-A را داشت. همچنین، بر اساس Human leukocyte antigen (HLA) کلاس II شایع در ایران (HLA-DRB1* 1103/1104)، توالی VEGF از نظر وجود اپی‌توپ‌های محدود به کلاس II بررسی گردید و در نهایت، بر اساس بالاترین امتیازهای به دست آمده در آنالیزهای پیش‌گفته، توالی ٤۱ اسید آمینه‌ای به عنوان واکسن پپتیدی مناسب در این طرح انتخاب شد.

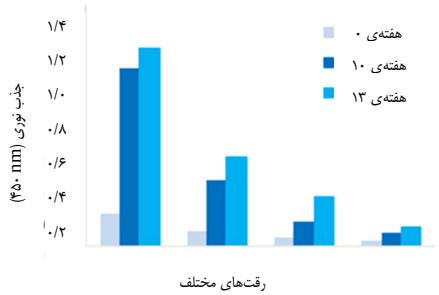
کونژوگاسیون پپتید به BSA: بررسی SDS-PAGE پپتید کونژوگه شده با BSA نشان داد که کونژوگاسیون به طور مؤثری انجام شده است و بنا بر انتظار، باند پپتید کونژوگه با آلبومین، سنگین‌تر از آلبومین بود و باندی در محدوده‌ی ۷۰ کیلودالتون ایجادکرده بود (شکل ۱).



شکل ۱. بررسی باندهای پروتئینی حاصل از کونژوگاسیون پپتید طراحی شده با آلبومین سرم گاوی بر روی ژل آگارز

ستون ۱: نشانگر استاندارد وزن پروتئینی؛ ستون ۲: پپتید کونژوگه با آلبومین سرم گاوی (حدود ۷۰-۶۵ کیلودالتون) و ستون ۳: آلبومین سرم گاوی (حدود ۶۵ کیلودالتون). پهن‌تر بودن باند مربوط به پپتید کونژوگه با آلبومین در مقایسه با آلبومین غیر کونژوگه، مؤید کونژوگاسیون مؤثر پپتید با آلبومین سرم گاوی می‌باشد.

بررسی القای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد پپتید واکسن VEGF در موش‌های ایمن شده نسبت به گروه شاهد: از موش های مورد مطالعه در هفته‌های صفر، ده و سیزده خون‌گیری صورت گرفت و سرم موش‌ها جهت انجام آزمایش ELISA و بررسی میزان تولید آنتی‌بادی پلی کلونال استفاده گردید. نمودار جذب نوری ELISA بر حسب رقت سریال موش‌های ایمن شده نشان داد که تیتر آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد VEGF پس از ایمن‌سازی موش‌ها و به ویژه پس از تزریق دز یادآور، افزایش قابل توجهی یافت (شکل ۲).



شکل ۲. خوانش جذب نوری Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)ی اختصاصی ضد Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) در رقت‌های مختلف سرم موش‌ها در هفته‌های صفر، ده و سیزده

*** و ** نشان می‌دهد که بین هفته‌های صفر و ده و نیز صفر و سیزده در رقت ۱/۱۰۰، P < ۰/۰۰۰۱ بوده است. سرم استفاده شده در آزمایش ELISA مخلوطی از سرم موش‌ها (Pooled sera) بود. افزایش تیتر آنتی‌بادی پلی‌کلونال در هفته‌های پس از ایمن‌سازی و تزریق بوستر نسبت به هفته‌ی صفر قابل مشاهده است.**

بحث

بافت توموری بدون آنژیوژنز نمی‌تواند رشد مناسبی داشته باشد از این رو، مهار مسیرهای دخیل در فرایند آنژیوژنز، می‌تواند به عنوان یکی از راهبردهای مهم ایمنی‌درمانی سرطان استفاده شود. در میان رویکردهای درمانی با هدف مهار آنژیوژنز، ایمنی درمانی فعال و طراحی واکسن‌های ضد VEGF و پذیرنده‌ی آن، جایگاه ویژه‌ای دارد (۱۸-۱۷). در این زمینه، Wei و همکاران، اولین واکسن ضد **سرطانی** VEGF را که یک واکسن اسید نوکلئیکی گزنوژن بود، در فیبروسارکوما، سرطان سینه و هپاتوما استفاده کردند و پاسخ آنتی‌بادی بر ضد VEGF و فعال شدن سلول‌های CD4 +T را بر ضد سلول‌های توموری مشاهده کردند (۱۵).

راد و همکاران، VEGF واکسن کینوئیدی را معرفی کردند که در این واکسن، از ایزوفرم های VEGF انسانی و موشی به همراه KLH استفاده شد که پس از تزریق واکسن همراه ادجوانت فروند به موش ها، آنتی بادی پلی کلونال ضد VEGF تخلیص گردید. سپس، به بررسی این آنتی‌بادی‌های مهار کننده‌ی VEGF بر روی کارسینومای کولون انسانی و موشی و رابدوسارکومای انسانی پرداختند و به نتایج امیدوار کننده‌ای در مهار رشد تومور دست یافتند (۱۴).

Morera و همکاران، واکسن اسید نوکلئیکی به نام CIGB-247 را معرفی و ایمنی زایی آن را در موش صحرایی، خرگوش و میمون بررسی و گزارش کردند که ایمن‌سازی با این واکسن، تأثیری بر روی رفتار طبیعی و عوامل هماتولوژی و بیوشیمی خون و همین طور بافت های حیاتی حیوانات آزمایش شده ندارد و تیتر آنتی بادی، پس از قطع واکسیناسیون کاهش می یابد و با ایمن سازی مجدد قابل تقویت است. در این واکسن، از VEGF نوترکیب اصلاح شده‌ی انسانی تولید شده در میزبان یوکاریوتی Escherichia coli به عنوان آنتی‌ژن و از پروتئولیپوزوم بسیار کوچک استخراج شده از دیواره‌ی خارجی نایسریا منتژیتیدیس به عنوان ادجوانت استفاده شد. همچنین، ایمن‌سازی موش‌ها با CIGB-247 کاهش رشد تومور و افزایش بقای حیوانات را نشان داد و از طرفی، تولید آنتی بادی ضد VEGF نیز مشاهده گردید (۱۳).

بر خلاف مطالعات پیش‌گفته، واکسن پیشنهادی در مطالعه‌ی حاضر بر پایه‌ی پپتید طراحی شد. همان‌طور که انتظار می‌رفت و در نتایج به دست آمده از آنالیز ایمونوانفورماتیک نیز مشاهده شد، بخش پپتیدی انتخاب شده علاوه بر آنتی‌ژنیسیته‌ی کافی و توانایی تحریک سیستم ایمنی دارای مشابهت قابل چشم پوشی با سایر پروتئین‌های بدن است. بنابراین، میزان عوارض ناشی از استفاده از واکسن، کاهش می‌یابد. از طرفی، در واکسن طراحی شده از حامل KLH برای تحریک سیستم ایمنی و شکست تولرانس نسبت به آنتی ژن خودی VEGF استفاده شد. بالا بودن تیتر آنتی‌بادی تولید شده در موش‌های واکسینه شده، دلیلی بر کارآمد بودن پپتید کونژوگه با KLH جهت ایمن‌سازی و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد VEGF می‌باشد که در این مورد، نتایج مطالعه‌ی حاضر با یافته‌های مطالعه‌ی راد و همکاران (۱۴) مطابقت داشت و تفاوت این دو پژوهش، در استفاده از پپتید انتخابی به جای توالی کامل پروتئین بود.

در مطالعه‌ی حاضر، تنها اپی توپ‌های مؤثر جهت تحریک سیستم ایمنی در توالی هدف قرار داده شدند و پاسخ اختصاصی علیه توالی های انتخابی تحریک کننده‌ی پاسخ ایمنی هومورال اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفتند. به علاوه، پاسخ سلول B یا تولید آنتی‌بادی پلی کلونال ضد پپتید VEGF مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به بالا بودن تیتر آنتی بادی ضد پپتید، به نظر می رسد که پپتید طراحی شده، می تواند به عنوان یک واکسن بالقوه برای تحریک سیستم ایمنی و مهار رشد تومور استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این طرح پژوهشی با شماره‌ی ۱۹۲۱۱۴ در معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ثبت گردید و توسط این معاونت محترم حمایت مالی گردیده است. پژوهشگران از معاونت پژوهشی و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی ایران و مدیریت و پرسنل محترم گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران به خاطر همکاری و استفاده از تسهیلات در انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 1971; 285(21): 1182-6.
2. Tugues S, Koch S, Gualandi L, Li X, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factors and receptors: anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. Mol Aspects Med 2011; 32(2): 88-111.
3. Humar R, Kiefer FN, Berns H, Resink TJ, Battegay EJ. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. FASEB J 2002; 16(8): 771-80.
4. Ma L, del Soldato P, Wallace JL. Divergent effects of new cyclooxygenase inhibitors on gastric ulcer healing: Shifting the angiogenic balance. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(20): 13243-7.
5. Sleijfer S, Kruit WH, Stoter G. Thalidomide in solid tumours: the resurrection of an old drug. Eur J Cancer 2004; 40(16): 2377-82.
6. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. Biochem Biophys Res Commun 2005; 333(2): 328-35.
7. Konner J, Dupont J. Use of soluble recombinant decoy receptor vascular endothelial growth factor trap (VEGF Trap) to inhibit vascular endothelial growth factor activity. Clin Colorectal Cancer 2004; 4(Suppl 2): S81-S85.
8. Wachsberger PR, Burd R, Cardi C, Thakur M, Daskalakis C, Holash J, et al. VEGF trap in combination with radiotherapy improves tumor control in u87 glioblastoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007; 67(5): 1526-37.
9. Hersey P, Bastholt L, Chiarion-Sileni V, Cinat G, Dummer R, Eggermont AM, et al. Small molecules and targeted therapies in distant metastatic disease. Ann Oncol 2009; 20(Suppl 6): vi35-vi40.
10. Lu D, Jimenez X, Zhang H, Bohlen P, Witte L, Zhu Z. Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage display library for antiangiogenesis therapy. Int J Cancer 2002; 97(3): 393-9.
11. Morera Y, Bequet-Romero M, Ayala M, Lamdan H, Agger EM, Andersen P, et al. Anti-tumoral effect of active immunotherapy in C57BL/6 mice using a recombinant human VEGF protein as antigen and three chemically unrelated adjuvants. Angiogenesis 2008; 11(4): 381-93.
12. Morera Y, Bequet-Romero M, Ayala M, Perez PP, Castro J, Sanchez J, et al. Antigen dose escalation study of a VEGF-based therapeutic cancer vaccine in non human primates. Vaccine 2012; 30(2): 368-77.
13. Morera Y, Bequet-Romero M, Ayala M, Velazco JC, Perez PP, Alba JS, et al. Immunogenicity and some safety features of a VEGF-based cancer therapeutic vaccine in rats, rabbits and non-human primates. Vaccine 2010; 28(19): 3453-61.
14. Rad FH, Le Buanec H, Paturance S, Larcier P, Genne P, Ryffel B, et al. VEGF kinoid vaccine, a therapeutic approach against tumor angiogenesis and metastases. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104(8): 2837-42.
15. Wei YQ, Huang MJ, Yang L, Zhao X, Tian L, Lu Y, et al. Immunogene therapy of tumors with vaccine based on Xenopus homologous vascular endothelial growth factor as a model antigen. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(20): 11545-50.
16. Damerval C, Le Guillox M, Blaisonneau J, de Vienne D. A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins. Electrophoresis 1987; 8(3): 158-9.
17. Bellou S, Pentheroudakis G, Murphy C, Fotsis T. Anti-angiogenesis in cancer therapy: Hercules and hydra. Cancer Lett 2013; 338(2): 219-28.
18. Suzuki H, Fukuhara M, Yamaura T, Mutoh S, Okabe N, Yaginuma H, et al. Multiple therapeutic peptide vaccines consisting of combined novel cancer testis antigens and anti-angiogenic peptides for patients with non-small cell lung cancer. J Transl Med 2013; 11: 97.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 34, No. 398, 2nd Week, November 2016

Received: 04.05.2016

Accepted: 20.06.2016

Bioinformatic Designing for Producing Vaccine Peptide of Human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A), and Evaluation of Polyclonal Antibodies in Mice

Faezeh Soltanpour-Gharibdousti[1], Gholam Ali Kardar[2], Banafsheh Fazeli-Delshad[1], Reza Falak[3], Mazdak Ganjalikhani-Hakemi[4], Alireza Andalib[5]

Original Article

Abstract

Background: It is stated that in the absence of angiogenesis, the tumoral tissue will not grow beyond 2 mm^3. Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a pivotal role in angiogenesis and blockade of this process could be applied as a novel strategy for immunotherapy of cancer.

Methods: Peptide sequences of VEGF-A isoforms were retrieved from protein databases and aligned. Immunodominant epitopes were determined and the selected one was rechecked for dissimilarity with other human proteins. The selected conserved peptide sequence was synthesized and conjugated with Keyhole limpet hemocyanin (KLH). Then, it was applied for immunization of mice. The polyclonal anti-VEGF antibody titer was measured using an indirect peptide-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a Bovine serum albumin (BSA)-conjugated peptide.

Findings: According to bioinformatic findings, the selected 41-aminoacid sequence did not show any similarity with other human proteins and revealed enough antigenicity to stimulate anti-tumor specific responses. A substantial increase of specific antibody titer was observed in vaccinated mice. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of the BSA-conjugated peptide showed efficient coupling of the molecules. Optimization steps in ELISA procedures revealed that coating of microtiter plates with BSA-conjugated antigen provided more reproducible outcome than unconjugated peptide.

Conclusion: Our results reinforce the potential of KLH-conjugated peptides for immunization and production of specific polyclonal antibodies against VEGF-A. Production of high-titer antibodies against this antigen indicates that the designed peptide-vaccine could be used as a potential immunogen for stimulation of humoral immune system in animal model.

Keywords: Bioinformatic, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Peptide vaccine

Citation: Soltanpour-Gharibdousti F, Kardar GA, Fazeli-Delshad B, Falak R, Ganjalikhani-Hakemi M, Andalib A. **Bioinformatic Designing for Producing Vaccine Peptide of Human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A), and Evaluation of Polyclonal Antibodies in Mice.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(398): 1054-9.

1- MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Asthma and Allergy Research Institute AND Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Immunology Research Center, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Alireza Andalib, Email: andalib@med.mui.ac.ir