بسم الله الرحمن الرحيم

A novel **anti-VEGF165** monoclonal antibody-conjugated **liposomal** nanocarrier system: Physical characterization and cellular uptake evaluation in vitro and in vivo

ارائه شده توسط: **فهیمه سادات موسوی البرزی**

دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه علوم پزشکی قزوین

استاد راهنما: آقای دکترعلیرضافراست

فهرست مطالب:

- اطلاعات مقاله.....4
- اطلاعات ژرنال 4
- مقدم.....5-8
- خلاصه.....8
- مواد و روش 9-22
- نتایج.....12-26
- بحث.....26-29

اطلاعات مقاله:

نویسندگان: Chenyang Shi , Fei Gao, Xiangdong Gao *, Yu Liu *

دریافت: 24 اکتبر 2014

پذیرش: 12نوامبر2014

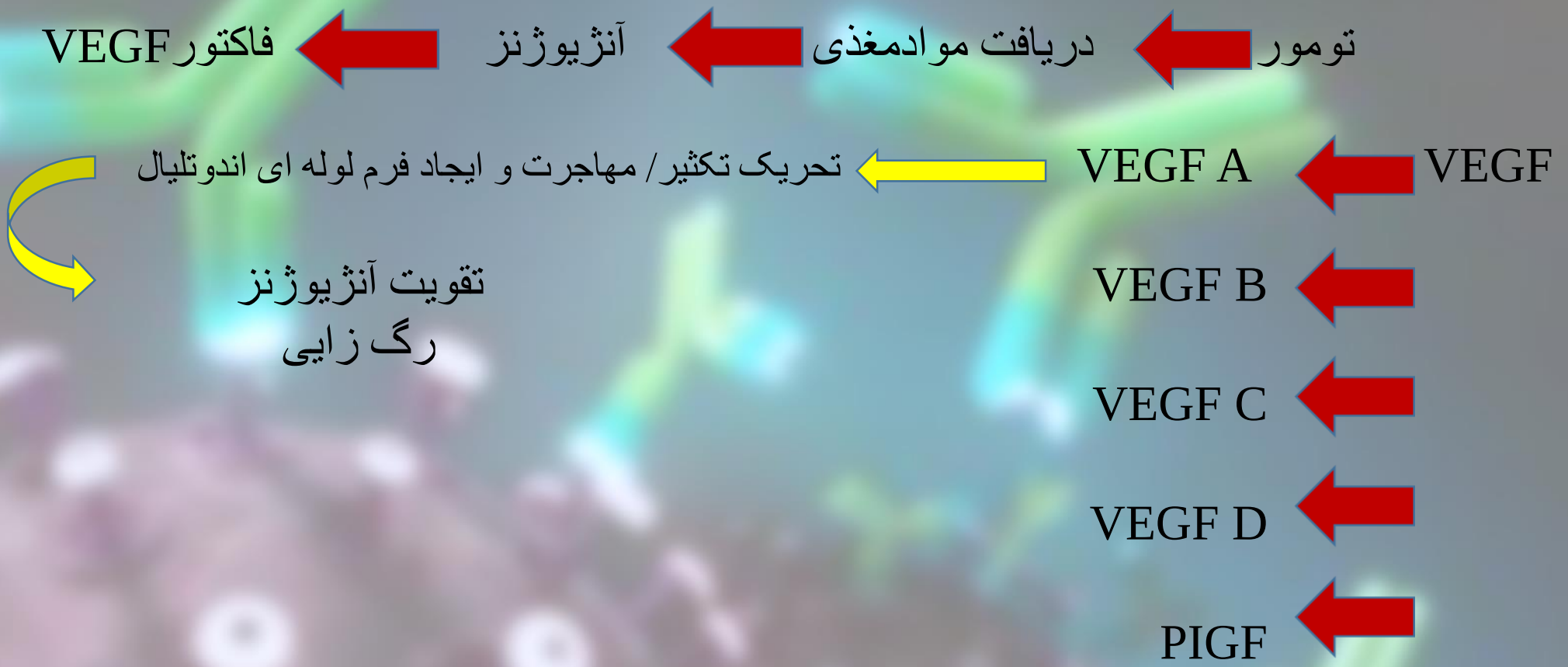
اطلاعات ژرنال: Biomedicine & Pharmacotherapy

ایمپکت فاکتور ژرنال(2020) : 6.529

H-index : 92

کشور: فرانسه

مقدمه:


تومور
دریافت موادمغذی
آنژیوژنز
فاکتورVEGF
VEGF
VEGF A
تحریک تکثیر/ مهاجرت و ایجاد فرم لوله ای اندوتلیال
تقویت آنژیوژنز
رگ زایی
VEGF B
VEGF C
VEGF D
PIGF

VEGF A

VEGF A189

VEGF A 165

VEGF A 121

VEGF 206

VEGF 165 ← هنگام ترشح ← باقی ماندن قسمتی در ECM ← شکاف پلاسمین

شکاف پلاسمین → ایجاد هپارین زیست فعال → اتصال به → VEGFR1,VEGFR2 → اعمال اثرات بیولوژیکی

بواسیزوماب:

- آنتی بادی مونوکلونال ضد VEGF انسانی
- اتصال به همه ی ایزوفرم های VEGF A انسانی ⟵ کاهش دسترسی سایر گیرنده ها
- تایید اثر ضدسرطانی این آنتی بادی به وسیله ی مطالعات بالینی
- احتمال ایجاد عوارض جانبی متعدد مانند فشارخون بالا،خونریزی و...
- نیاز به ایجاد آنتی بادی مونوکلونال ضد VEGF انسانی ایمن تر

MAb 165 ⟵ 1) اثرات ضد رگ زایی و ضدتوموری در in vitro , in vivo
2) ایمنی زایی پایین تر و کارایی بیشتر در شرایط in vivo

خلاصه:

- کونژوگاسیون آنتی بادی مونوکلونال ضد VEGF انسانی با لیپوزوم پگیله شده
- تایید کونژوگاسیون با روش BCA
- تایید عدم اختلال ترکیب این آنتی بادی با لیپوزوم بر اتصال و اثر گذاری برروی VEGF
- تایید عدم افزایش سمیت پاکلیتاکسل در لیپوزوم های کونژوگه با mAb نسبت به لیپوزوم غیرکونژوگه
- تایید هدفگیری و اثرگذاری بالاتر لیپوزوم کونژوگه با mAb نسبت به لیپوزوم غیرکونژوگه در موش های نود دارای تومور mcf7

مواد و روش ها:

رده های سلولی:

1. SGC-7901 سلول سرطانی گاستریک انسانی
2. MCF7 سلول سرطانی پستان انسانی
3. HepG-2 سلول هپاتومای انسانی
4. LO2 سلول کبدی نرمال

حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده:

- موش نود BALB/C

1: آماده سازی لیپوزوم:

PEGylated liposome containing S100PC, CHOL, and mPEG2000-DSPE in a molar ratio of 90:10:5 was prepared using the thin film hydration method, as described previously [18]. Briefly, phospholipids (S100PC and mPEG2000-DSPE), CHOL, and coumarin-6 (as a fluorescence label) were solubilized in chloroform in a 250 ml round bottomed flask and dried under vacuum to form a thin lipid film [19]. Then, the lipid film was hydrated with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 1 h. Afterwards, the resultant multilamellar dispersions were sonicated and then serially passed through 0.45- and 0.22-μm pore size filters to reduce the size of the liposome. Un-entrapped coumarin-6 was removed through dialysis using PBS (pH 7.4). As a linker lipid, Mal-PEG2000-DSPE was added into the liposome suspension with the molar ratio of S100PC: CHOL: mPEG2000-DSPE: Mal-PEG2000-DSPE = 90:10:4:1 [14]. The final PEGylated liposome particles were stored in dark containers at 4 °C.

As a control, paclitaxel encapsulated liposome was prepared following the same procedures mentioned above. Un-entrapped paclitaxel was removed from the liposome suspension by centrifugation.

For confocal microscopy, 0.5 mol% of Rh-PE relative to total lipids (i.e., S100PC and mPEG2000-DSPE) was added to the liposome formulation.

2: آماده سازی mAb-Lip

Conjugation of mAb165 to the prepared PEGylated liposome was based on –SH groups of antibody molecule and Mal-PEG2000-DSPE in the liposome. Briefly, mAb165 was thiolated with 2-iminothiolane in PBS (pH 7.4) at a molar ratio of 2-iminothiolane: mAb165 of 50:1 for 1 h at room temperature (RT). Unreacted 2-iminothiolane was removed by a Sephadex G-25 gel column with PBS. Then, the thiolated mAb was immediately incubated with the PEGylated liposome at 4 °C for 12 h for preparation of mAb-lips. The solution was then subjected to a Sepharose CL-4B column and eluted with PBS (pH 7.4) to remove the unbound thiolated mAb165. Non-reducing SDS-PAGE (8%) was performed to examine the covalent coupling between mAb165 and the liposome as well as the integrity of mAb165 in mAb-lips [20].

3: مورفولوژی، سایز و پراکندگی ذرات:

بااستفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM

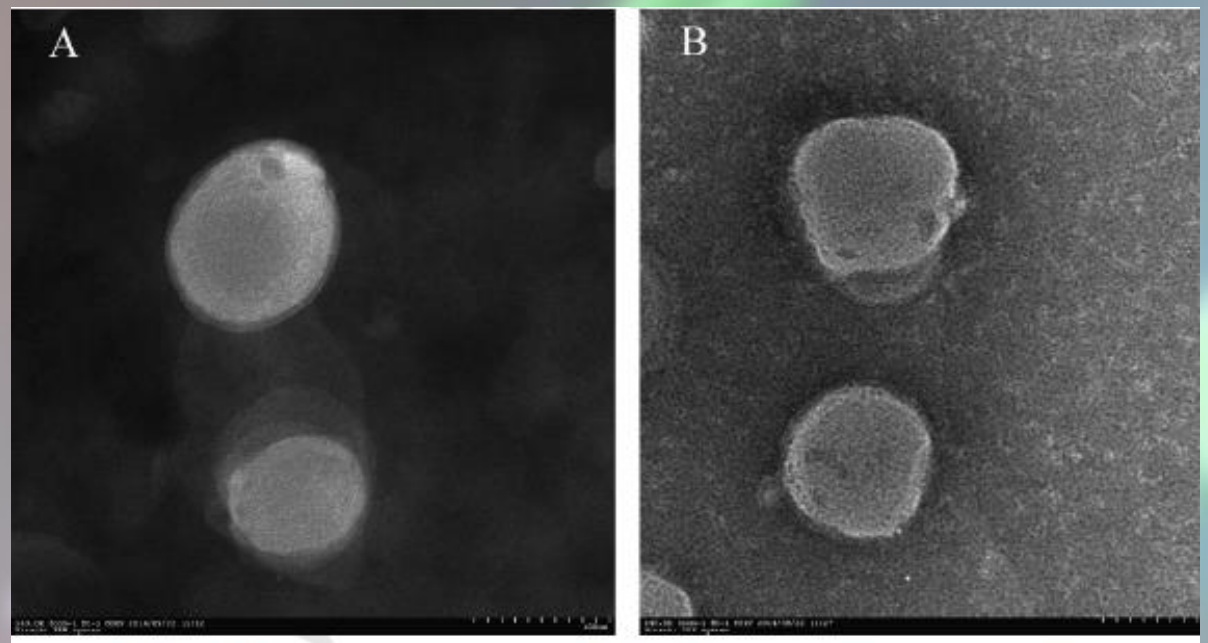


Fig. 1. TEM images. A. PEGylated liposome. B. mAb-liposomes. Each bar represents 100 nm.

نتیجه:

- اتصال با پیوند تیول-اتر بین مالئمید لیپوزوم و گروه تیول آنتی بادی صورت گرفت.
- نتیجه TEM = تفاوت های مورفولوژی قابل توجهی مشاهده نشد.
- ترکیب لیپوزوم پگیله با mAb165 بر پایداری آن اثری ندارد.

Table 1
Size and polydispersity index (PDI) of lips and mAb-lips. And mAb amount, phospholipids amount and coupling efficiency of mAb-lips. Data are shown as means and standard deviation ($n = 3$).

Formulation	Particle size (nm)	PDI	mAb amount (μg/ml)	PL amount (μmol/ml)	Coupling efficiency (μg mAb/μmol PL)
Lips	97.9 ± 0.8	0.259 ± 0.007	0	10	0
mAb-lips	108.0 ± 1.1	0.238 ± 0.007	697.8 ± 5.4	10	69.8 ± 0.5

4: سنجش پروتئین و بازده اتصال آنتی بادی

The amount of mAb165 conjugated to the PEGylated liposome was quantified as previously described using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay [21,22]. In brief, 0.3 ml liposome suspension was added to 0.4 ml methanol, 0.2 ml chloroform, and 0.1 ml water. Then, the mixture was vortexed and centrifuged at 9000 × g for 3 min. After the upper phase was carefully removed and discarded, 0.3 ml methanol was added to the interphase between chloroform and the precipitated protein, and then vortexed and centrifuged again at 9000 × g for 3 min. The supernatant was removed and the protein pellet was dried under a stream of air. The pellet was then dissolved in 0.2 ml PBS (pH 7.4) containing 2% SDS. The concentration of protein was determined with a BCA protein assay kit (KeyGEN BioTECH, China) using pure mAb165 as a protein standard reference. The coupling efficiency was calculated as μg mAb/μmol phospholipids (PL).

4: نتیجه

- یکپارچگی آنتی بادی پس از ترکیب با لیپوزوم تایید شد.
- اتصال کامل و به شکل موثری صورت گرفته است.

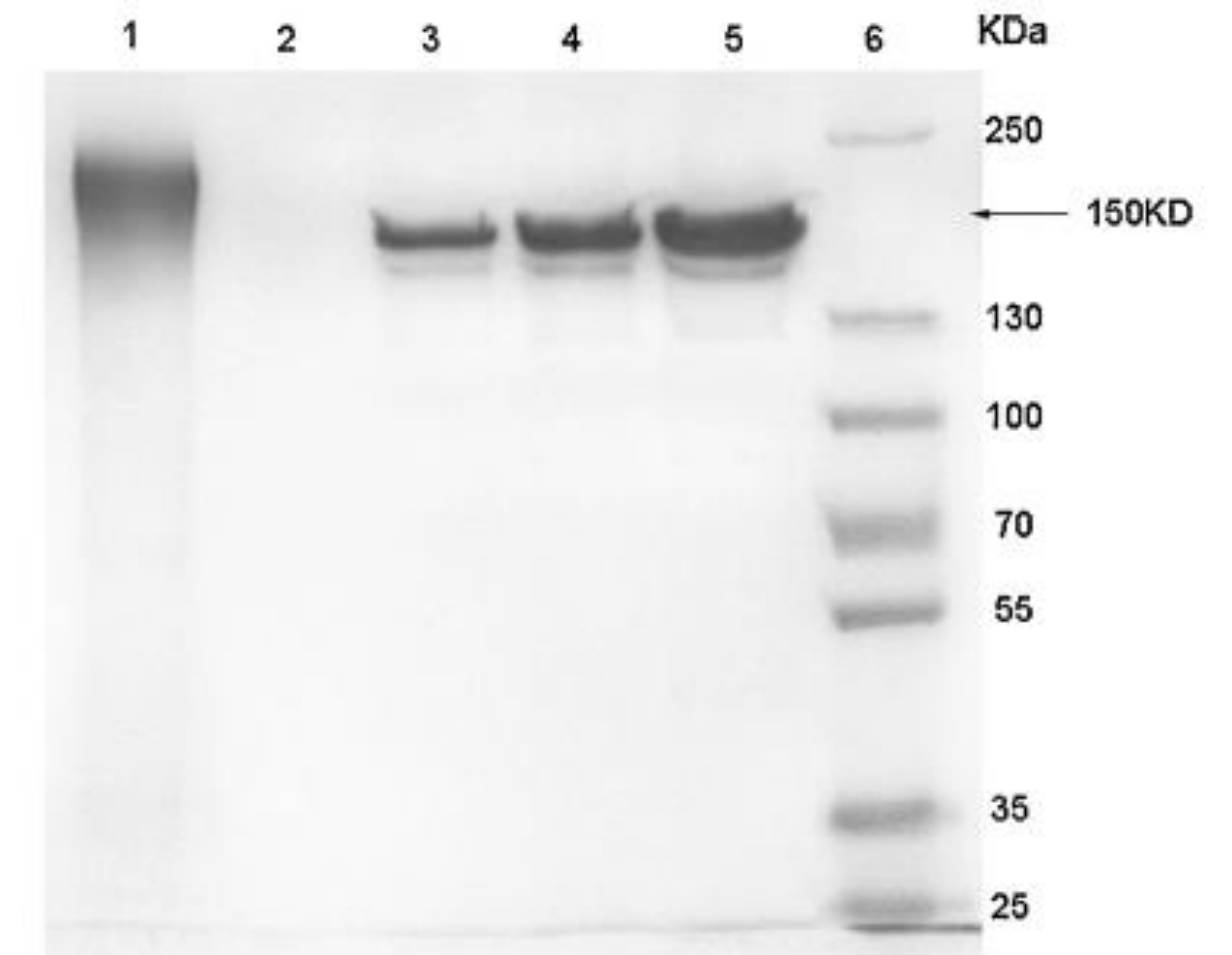


Fig. 2. Non-reducing SDS-PAGE analysis of the integrity of mAb165 in mAb-lips. Lane 1–6: mAb-lips, PEGylated liposome without mAb165, mAb 165 (0.25 mg/ml), mAb165 (0.5 mg/ml), mAb165 (1 mg/ml), protein marker.

5: تعیین تمایل آنتی بادی باروش الایزا:

Next, we employed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to assess the binding affinity of mAb-lips versus non-conjugated mAb165 to VEGF in order to determine whether the conjugation to our PEGylated liposome reduced the antigen-binding affinity of mAb165. Briefly, 96-well ELISA Maxisorp plates (Corning Incorporated, NY, USA) were coated with VEGF (1 μg/ml in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6) at 4 °C overnight. Then, the solution was removed and the wells were blocked with blocking buffer (0.05% Tween-20 and 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS) at 37 °C for 2 h. Afterwards, all wells were washed five times with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBST) using an automated plate washer (ZMX-988B, Tianshitianli, Beijing, China). Then, mAb165 or mAb-lips were prepared as serial two-fold dilutions (from 3.0 to 0.094 μg/ml) in PBST with 1% BSA; and 100 μl of the prepared serial dilution was transferred to the wells and incubated at 37 °C for 2 h. PBST with 1% BSA alone was used as a blank control. The plate was again washed five times with PBST. Afterwards, 100 μl horseradish peroxidase (HRP)-labeled goat anti-human IgG (ZSGB-BIO, Beijing, China; 1:5000 in PBST with 1% BSA) was added to each well and incubated at 37 °C for 1 h. After washing, 100 μl substrate solution (containing 4 mg o-phenylenediamine and 4 μl 30% H_2O_2 in 10 ml pH 5.0 citrate buffer) was added to each well and allowed to incubate at 37 °C for 15 min. The reaction was then stopped using 100 μl 2 M H_2SO_4. Optical density (OD) was read at 490 nm using a microplate reader (iMark™, Bio-Rad) [23–26].

6: نتیجه ی تست الایزا

- سنجش حفظ تمایل آنتی بادی با فرمول زیر محاسبه شد.

OD mAb-lip / OD mAb 165 = (%)×100

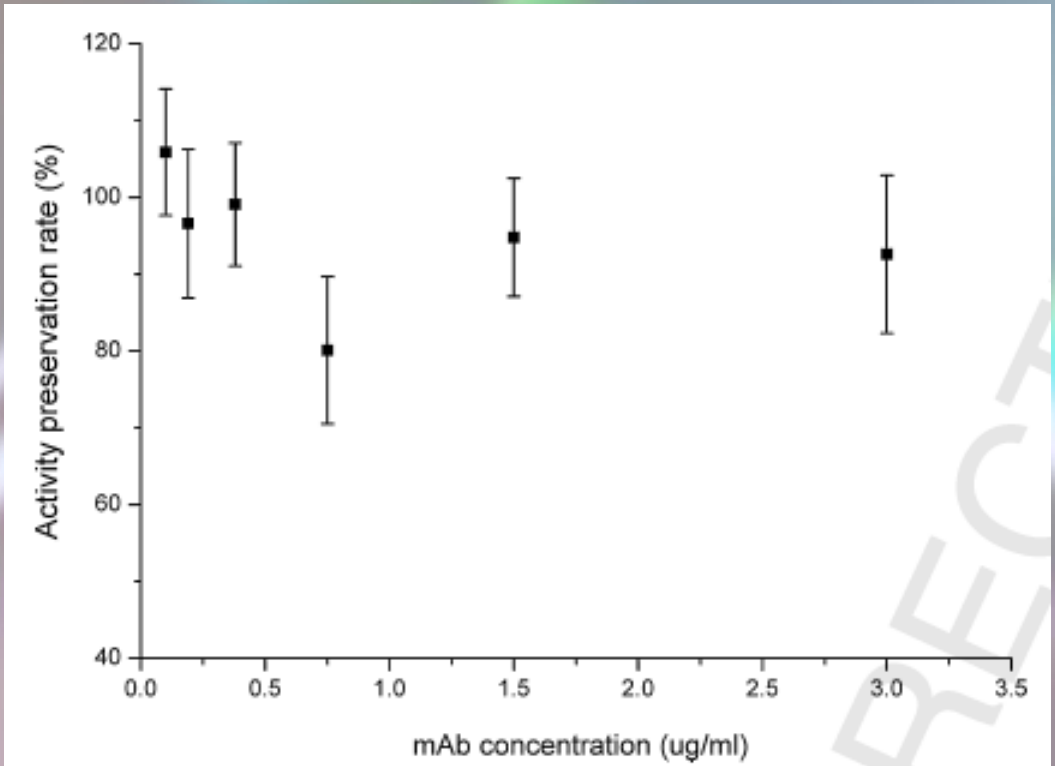
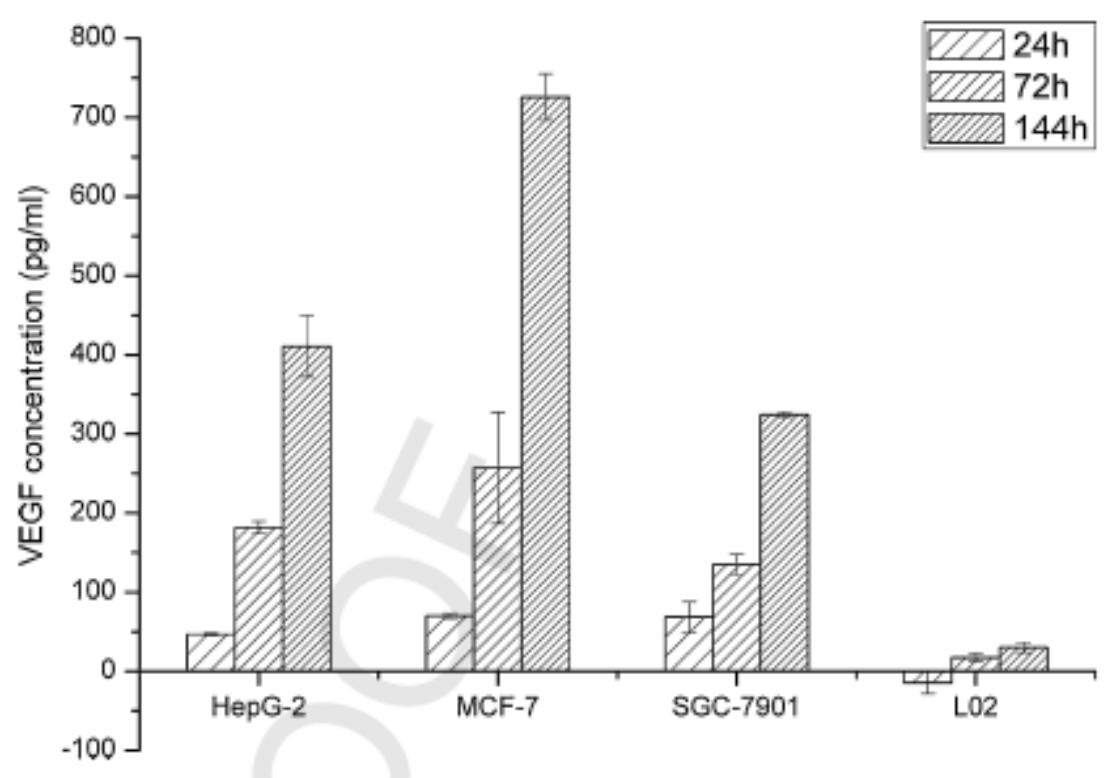


Fig. 3. Binding affinity preservation assay by ELISA. Serial two-fold dilutions of mAb165 or mAb-lips were used to examine the binding affinity of mAb-lips versus non-conjugated mAb165 to VEGF. OD values derived from mAb165 or mAb-lips at each dilution were then measured. Data are represented as the mean ± S.D., $n = 3$.

- میزان حفظ تمایل در لیپوزوم های کونژوگه بیشتر از 80درصد بود.
- اتصال آنتی بادی به لیپوزوم بر تمایل اتصال به VEGFاثر گذار نیست.

7: تولید و ترشح VEGF

- هر چهار رده ی سلولی در پلیت 24خانه کشت داده شدند
- پس از24/72/144 ساعت 150 لاندا محیط از هر چاهک برداشته وسانتریفیوز شد.
- سوپرناتانت جمعاوری شد ومقدار VEGFبااستفاده از کیت الایزا تعیین شد.



نتیجه:

- سه رده ی سلولی سرطانی بطور پیوسته VEGF را در طول 6 روز تولید و ترشح کردند.
- رده ی سلولی LO2 که یک سلول نرمال است مقدارکمی VEGF ترشح کرد.

8: آنالیز میکروسکوپ فلورسنس

- جهت بررسی اینکه آیا کونژوگه کردن لیپوزوم با آنتی بادی برجذب و اتصال آن اثرگذار است یانه ازمیکروسکوپ فلورسنس و کانفوکال استفاده شده است.
- در این روش میزان جذب در سلول های SGC-7901/MCF7/HepG-2 بامقدار بالای VEGF و سلول LO2 با مقدار پایین VEGF بررسی شده است.

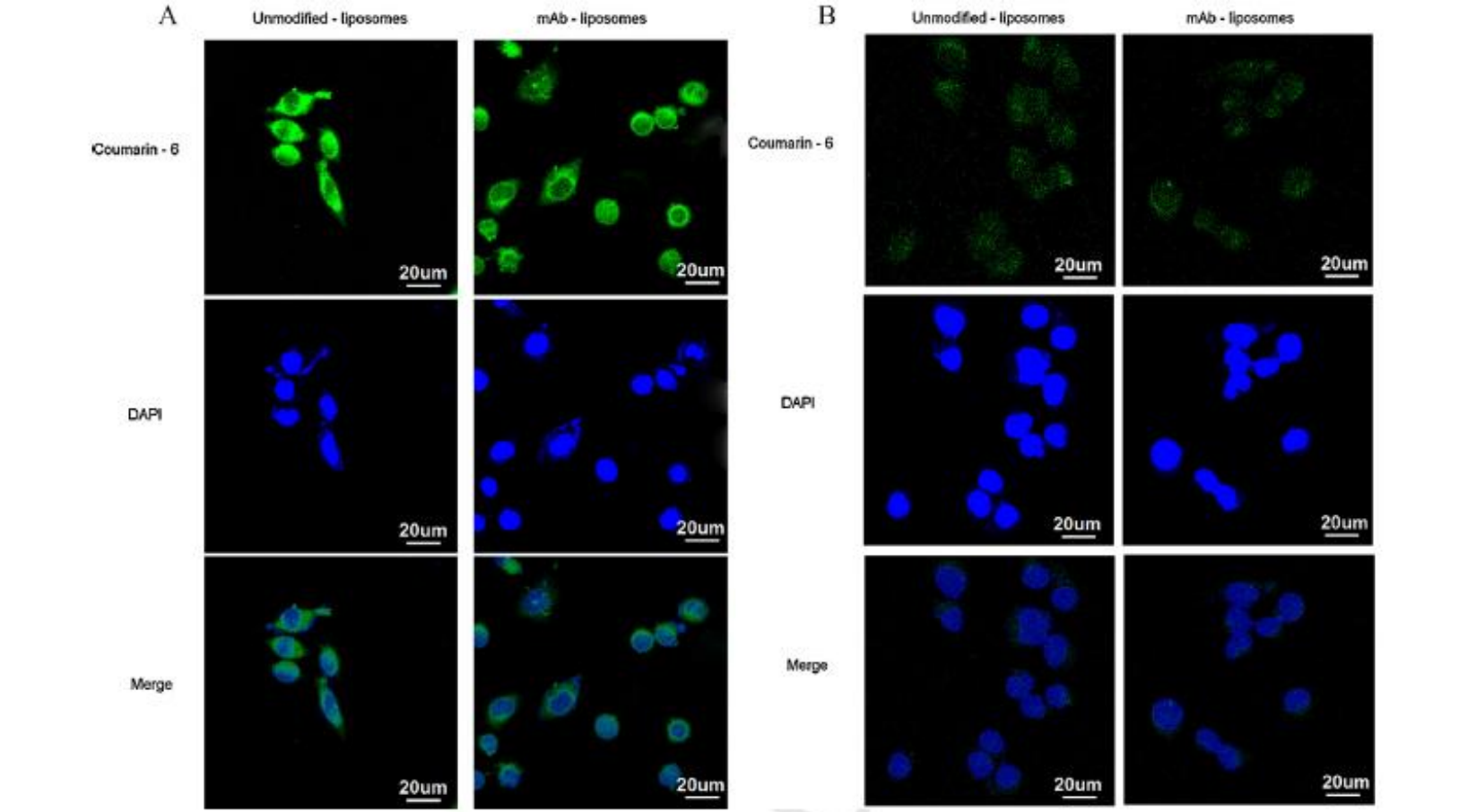


Fig. 6. Confocal microscopy images of VEGF-expressing tumor cells (HepG-2; A) and normal cells (L02; B) after 1 h treatment with unmodified liposome or mAb-lips. Green color represents fluorescent liposome and blue color represents DAPI staining of nucleus.

9: آنالیز فلوسایتومتری

- ✓ برای تعیین کمیت اتصال و داخلی سلزی سلولی آنالیز فلوسایتومتری
- ✓ انجام شد.
- ✓ در آنالیزفلوسایتومتری روند مشابه میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شد.
- ✓ چهار رده ی سلولی نسبت به لیپوزوم کونژوگه و غیرکونژوگه تقریبا جذب مشابهی نشان دادند.
- ✓ در رده ی سلولی LO2 جذب فلورسانس هنگام تریت با لیپوزوم و لیپوزوم کونژوگه تقریبا یکسان بود.

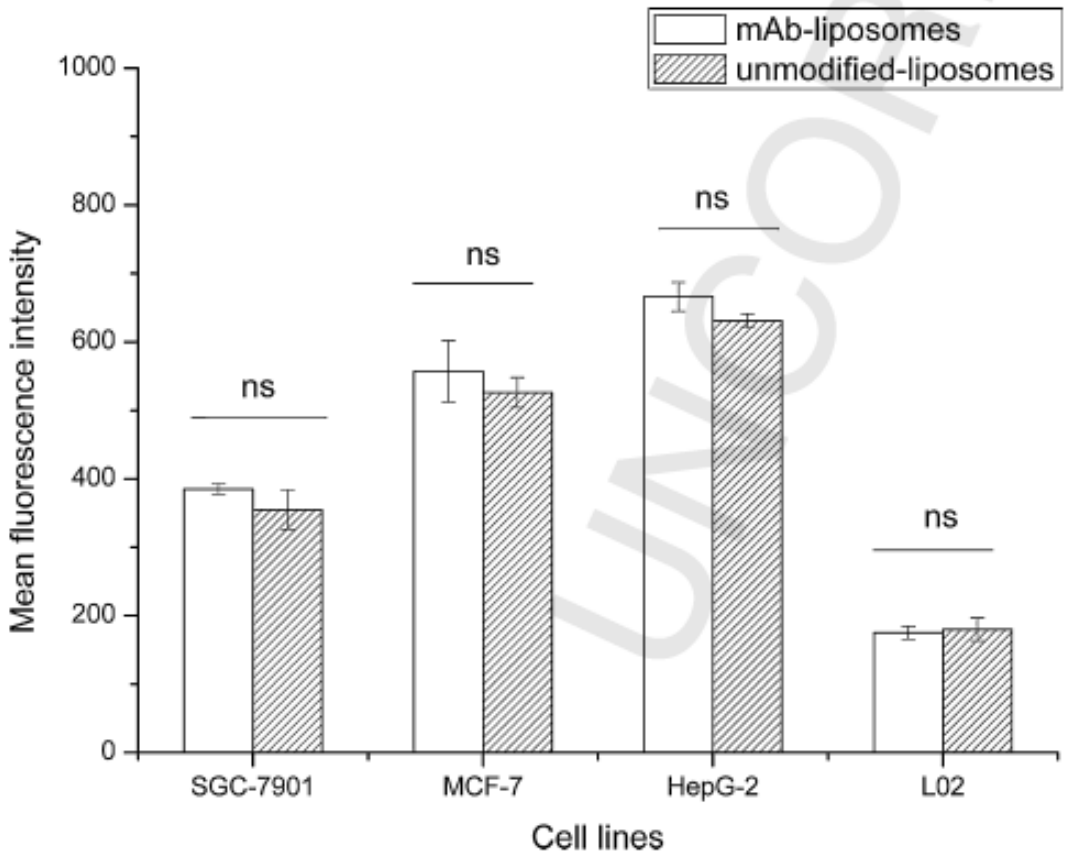


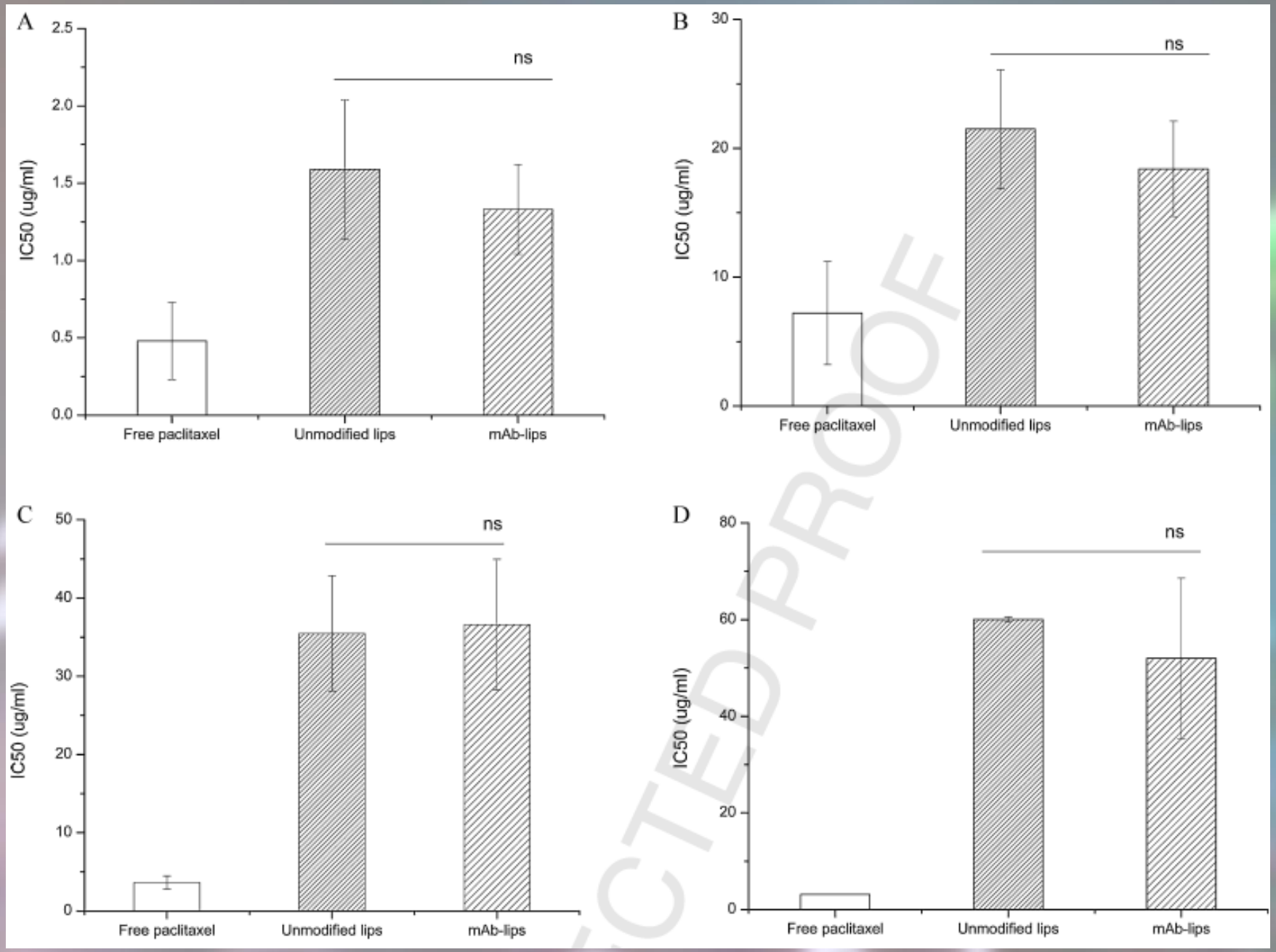
Fig. 7. Flow cytometry analysis of SGC-7901, HepG-2, MCF-7, and L02 cells after 1 h treatment with coumarin-6 labeled mAb-lips and unmodified liposome. Each bar represents mean fluorescence intensity ± S.D. ($n = 3$); *ns* denotes statistically non-significant difference (t-test, $P > 0.05$).

10:مطالعات سمیت سلولی in vitro:

- جهت بررسی سمیت پاکلیتاکسل محصور در لیپوزوم پگیله و لیپوزوم کونژوگه برروی چهار رده ی سلولی تست MTT انجام شد.

➢ نتیجه:

- تکثیر سلول ها بصورت وابسته به غلظت مهار شد.
- در مقایسه ی اثرداروییِ پاکلیتاکسل محصور در لیپوزوم پگیله و لیپوزوم کونژوگه برروی سلول ها تفاوت قابل توجهی مشاهده نشد.



CTED PROOF

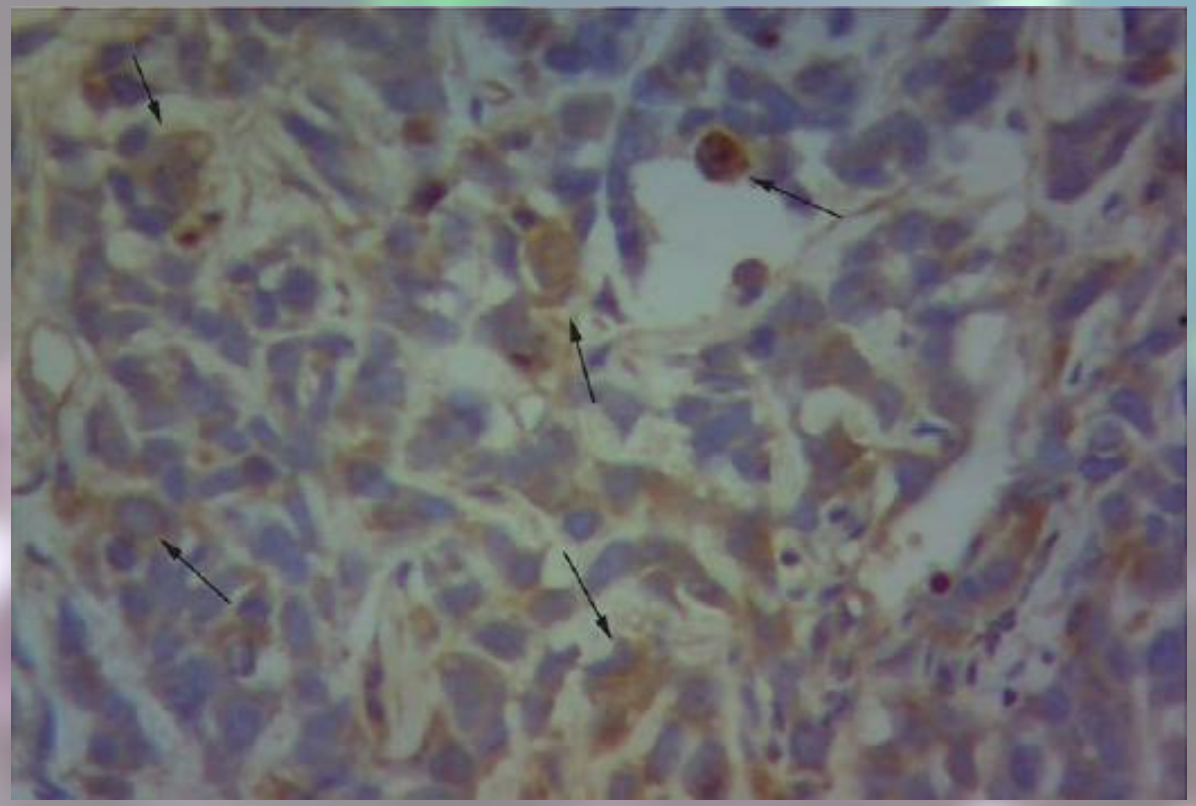
SCG-7901:A
HepG-2 :B
MCF7 :C
LO2 :D

11: بیان VEGF در تومورهای زنوگرفت

MCF-7 cells (2×10^6) were implanted into the right flanks of 4–6 week-old BALB/c nude mice. When tumors reached about 150 mm^3, they were isolated and fixed with 4% formaldehyde. Then, paraffin-embedded 4-μm tissue sections were prepared, dewaxed with xylene, and washed three times with PBS (pH7.4). Prior to incubation with primary antibody, normal goat serum was employed to block the non-specific protein binding sites for 10 min. Then, the mouse anti-VEGF mAb was incubated for detection of VEGF. After 1 h incubation at 37 °C, the slides were rinsed with PBS (3 × wash, 2 min each time), and incubated with biotinylated goat anti-mouse antibody. After 15 min incubation at 37 °C, the slides were washed with PBS (3 × wash, 2 min each time) and treated with diaminobenzidine (DAB) chromogen for 3–5 min to yield a dark brown color. The sections were counter-stained with hematoxylin for microscopic observation (Zeiss, Germany).

نتیجه:

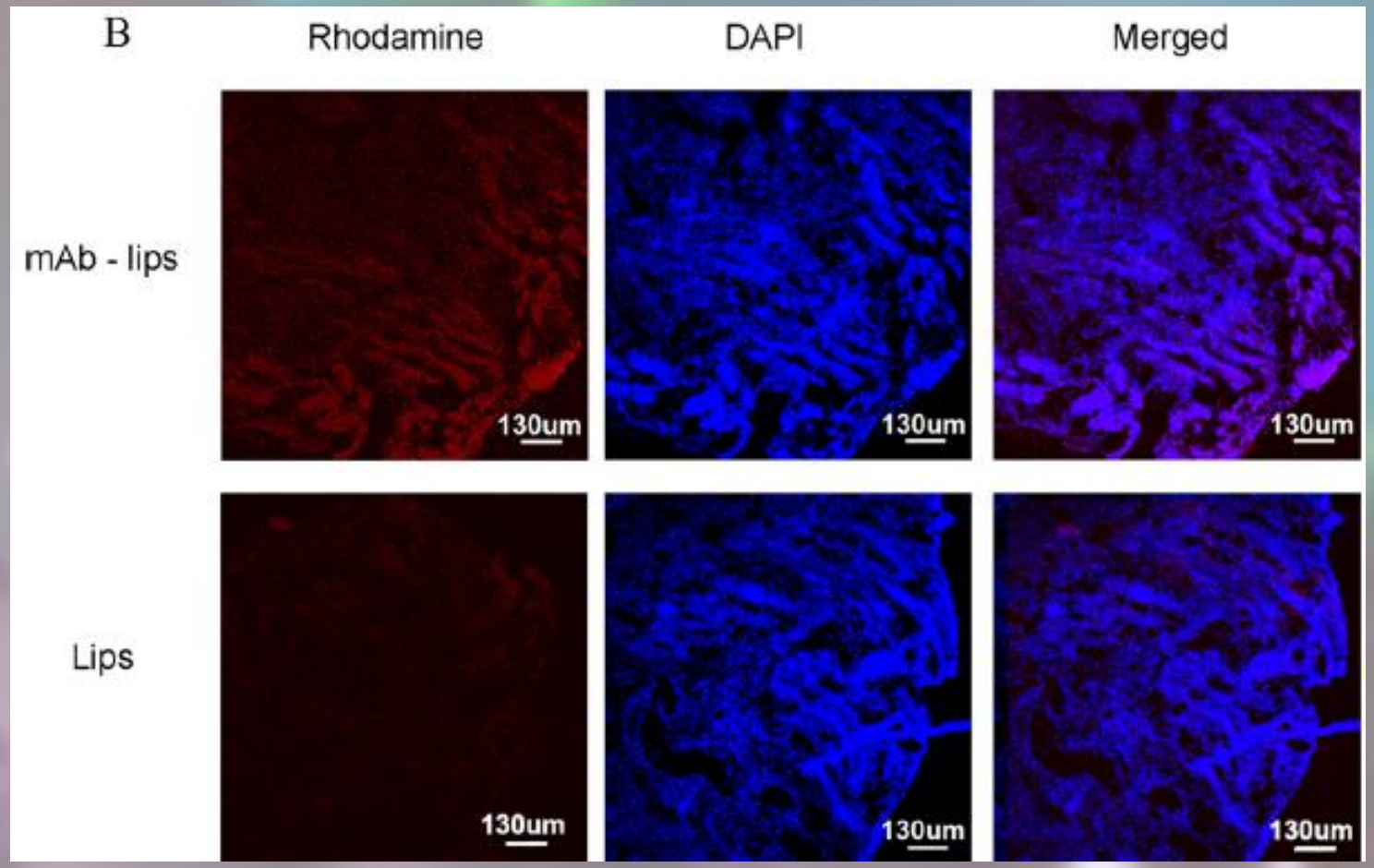
- از ایمنوهیستوشیمی جهت ردیابی بیان VEGF در بافت توموری استفاده شده است.
- در مناطق توموری رنگامیزی قوی تر ← بیان بالای VEGF



12:توزیع لیپوزوم کونژوگه در تومورهای زنوگرفت:

- 2میلیون سلول به صورت زیرجلدی به موش های نود 4-6 هفته ای تزریق شد.
- وقتی تومورها به 150میلی مترمکعب رسید به حیوان 400لاندا لیپوزوم کونژوگه و غیرکونژوگه از طریق رگ دم تزریق شد.
- پس از 8ساعت موش را کشته و بافت توموری در Pbs قرار داده شد.
- برش بافتی با زخامت 10میکرون برروی میکروتیوم قرارگرفت.
- سیگنال فلورسانس رودامین با میکروسکوپ کونفوکال مشاهده شد.

- لیپوزوم کونژوگه باmAb نسبت لیپوزوم غیرکونژوگه به طورموثری VEGF را در بافت توموری تشخیص داده است.
- سیگنال قرمز قوی تری در موش هایی که تحت درمان بالیپوزوم کونژوگه قرارگرفته بودند مشاهده شد.
- رودامین = موقعیت لیپوزوم کونژوگه و غیر کونژوگه را نشان می دهد.
- DAPI = هسته ی سلول هارا رنگامیزی می کند.



بحث:

- ✓ شیمی درمانی متداول ترین روش درمانی سرطان است.
- اما بربافت سالم عوارض جانبی زیادی اعمال می کند ← با محدودیت هایی روبه رواست.

- ✓ درمان نیاز به سیستم تحویل دارویی هدفمند دارد .

- ✓ در این مطالعه لیپوزوم کونژوگه با آنتی بادی مونوکلونال 165 ضدگیرنده ی VEGF ساخته شد.

- ✓ کارایی این mAb165-lip در تومورهای با بیان بالای VEGF هم در شرایط in vitro وهم در شرایط in vivo مورد بررسی قرار گرفت.

- ✓ در این مطالعه اثرگذاری بالاترmAb165-lip برسلول های توموری نسبت به لیپوزوم غیر کونژوگه تایید شد ← ممکن است به دلیل تمایل بالاتر mAb165-lip به VEGF باشد که در سلول های توموری بیان بالایی دارد.

✓ روش کونژوگاسیون متداول بااستفاده از Mal-PEG-DSPE است.

- پیوند بین گروه مالئمید موجود روی لیپوزوم و گروه SH آنتی بادی تیوله انجام میشود.
- گروه سولفیدریل فراوانی کمتری نسبت به سایر گروه ها در پروتئین ها و آنتی بادی ها دارد.
- بنابراین استفاده از مواد شیمیایی سولفیدریل می تواند تغییرات را درسایت مولکول هدف محدود کند در نتیجه شانس فعالیت ترکیب پس از کونژوگاسیون بیشتر می شود.

✓ سایز نانوذره یکی ازمهم ترین پارامترها در تعیین نتایج تحویل هدفمند درشرایط in vivo و in vitro است.

- در این مطالعه سایز نانوذرات قبل و بعد از کونژوگاسیون حدود100نانومتر بود که برای جذب تحت شرایط in vivo و in vitro مناسب است.

✓ میزان اتصال mAb165 برروی لیپوزوم با روش سنجش پروتئین BCA بررسی شد.

- مشخص شد که مقدار مناسبی جهت ارتباط و ورود به سلول به لیپوزوم کونژوگه شده است.

- ✓ یکپارچگی mAb165 توسط SDS-Page غیر احیایی تایید شد.
  - باند جدا تقریبا 150کیلودالتون بود که نشان دهنده ی عدم تخریب آنتی بادی حین عمل کونژوگه است.

- ✓ قابلیت اتصال آنتی بادی کونژوگه روی لیپوزوم با روش الایزا بااستفاده از VEGF به عنوان بستر اتصال تایید شد.
  - در مقایسه با آنتی بادی آزاد، آنتی بادی کونژوگه با لیپوزوم واکنش ایمنی 80%نسبت به آنتی ژن نشان دادند.
  - آنتی بادی کونژوگه تاحدزیادی خاصیت هدف گیری اختصاصی اش را حفظ می کند.
- ✓ انتظار داشتیم پس از کونژوگاسیون لیپزوم میزان جذب و اتصال سلولی افزایش یابد اما این اتفاق نیافتاد.
  - ممکن است به دلیل ویژگی های بیان VEGF باشد.
  - برخلاف سایر گیرنده های غشای سلولی ایزوفرم VEGF165 یک پروتئین اصلی است که می تواند در غشا باقی مانده یا درخون ترشح شود.

- در تست الایزا تحت in vitro بیشتر VEGF به محیط کشت ترشح شد ونه روی سطح سلولی.
- به همین دلیل کونژوگه کردن لیپوزوم با آنتی بادی نتوانست روند اتصال وداخلی سازی با اندوسیتوز را بهبود بخشد.
- علاوه براین mab165 به دلیل خاصیت آب دوستی و وزن مولکولی بالا به سختی جذب سلول ها می شود.

✓ در بخش in vivo مشاهده شد در تومورهای با بیان بالای VEGF آنتی بادی مونوکلونال ضد VEGF توانست به طور موثری VEGF را در تومور تشخیص دهد.

لیپوزوم کونژوگه با mAb165 پتانسیل هدفگیری تومورررا در شرایط in vivo دارد که ممکن است مستقل ازمسیراندوسیتوز سلولی باشد.

با تشکر از توجه شما