[ DOI: 10.29252/koomesh.22.2.341 ]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Friday September 11th 2020

کومش- جلد ۲۲، شماره ۲ (پیاپی ۷۸)، بهار ۱۳۹۹

# بهینه‌سازی الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن HER2 و مبتنی بر سلول برای شناسایی بیوسیمیلار تراستوزومب

مریم احمدزاده [۱،۲](M.Sc)، فرزانه فرشداری [۱](M.Sc)، لیلا نعمت الهی [۳](Ph.D)، شایان ملک نیا [۴](M.Sc)، الهام محیط [۱*](Ph.D)

۱- گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲ - کمیته دانشجویی پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دارویی، آریوژن فارمد، دانشکده علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۸۲۰۰۰۶۷ – ۰۲۱ e.mohit@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۳

## چکیده

**هدف: الایزا یک روش حساس، اختصاصی، تکرارپذیر و سریع است که جهت سنجش فعالیت بیولوژیک آنتی‌بادی‌ها استفاده می‌شود. تراستوزومب یک آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی ضد گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲ (Human Epidermal growth factor Receptor 2, HER2) است که از شروع مسیر پیام‌رسانی پایین‌دستی جلوگیری می‌کند. تراستوزومب می‌تواند به‌عنوان کنترل مثبت در تعیین فعالیت آنتی‌بادی‌های ضد گیرنده HER2 مورد استفاده قرار گیرد. از دلایل محتمل ایجاد پس‌زمینه در الایزا، شستشو و بلوک کردن ناکافی است که لازم است بهینه شود. هم‌چنین، در الایزای غیر مستقیم جهت صرفه‌جویی در میزان آنتی‌ژن، ضروری است حداقل میزان آنتی‌ژن که می‌تواند منحنی تیتراسیون مناسب تراستوزومب را بدهد، تعیین شود. هدف از این مطالعه، بهینه‌سازی روش الایزا برای بیوسیمیلار تراستوزومب (آریوتراست™، شرکت آریوژن فارمد) بود.**

**مواد و روش ها: در این مطالعه، متغیرهایی مانند دفعات شستشو، نوع ماده بلوک‌کننده و غلظت آنتی‌ژن در الایزای مبتنی بر HER2 و نوع سلول HER2 منفی و ماده‌ی بلوک‌کننده در الایزای مبتنی بر سلول بررسی گردید.**

**یافته ها: در الایزای مبتنی بر HER2 مشخص گردید، شستشوی ۵ مرتبه‌ای بین مراحل مختلف الایزا به‌صورت معناداری باعث ایجاد پس زمینه کم‌تری نسبت به شستشوی ۳ مرتبه‌ای می‌شود. به‌علاوه، میزان اتصال غیر اختصاصی در حضور مسدودکننده‌ی شیر خشک ۵ درصد به‌طور معناداری از BSA ۱ و ۳ درصد کم‌تر بود. کم‌ترین میزان HER2 که منجر به ایجاد منحنی تیتراسیون مناسب برای آریوتراست شد، غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. هم‌چنین، در الایزای مبتنی بر سلول نشان داده شد که استفاده از رده‌ی سلولی MDA-MB-231 به عنوان رده‌ی سلولی HER2 منفی به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش پاسخ پس‌زمینه در مقایسه با MCF-7 شد. هم‌چنین، در این نوع الایزا محلول BSA ۳ درصد به عنوان مسدودکننده‌ی مناسب انتخاب شد.**

**نتیجه گیری: داده‌های به‌دست آمده، می‌تواند برای طراحی الایزای مبتنی بر HER2 و مبتنی بر سلول آنتی‌بادی‌های ضد گیرنده HER2 و قطعات آن مورد استفاده قرار گیرد.**

**واژه‌های کلیدی: الایزا، فعالیت بیولوژیک، تراستوزومب، آنتی‌بادی‌ها، بهینه‌سازی**

## مقدمه

سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان در زنان و اولین علت مرگ ناشی از سرطان آن‌ها است [۱-۳]. انواع اصلی سرطان پستان بر اساس بیان سه نشانگر تومور، گیرنده استروژنی، گیرنده پروژسترونی و گیرنده‌ی فاکتور رشد اپیدرمی انسانی ۲(HER2) ارزیابی می‌شوند، که معمولاً راهنمای مناسبی جهت انتخاب درمان بالینی بیماران است [۴]. گیرنده HER2 که به نام c-erbB2 و neu نیز شناخته می‌شود یک گیرنده‌ی گلیکوپروتئینی گذرنده از غشا به وزن ۱۸۵ کیلودالتون می‌باشد. این گیرنده متعلق به خانواده ErbB از گیرنده‌های فاکتور رشد با فعالیت تیروزین کینازی ذاتی بوده و دارای ۳ ناحیه‌ی خارج سلولی غنی از سیستئین، یک ناحیه‌ی درون غشایی و یک ناحیه‌ی داخل سلولی با خاصیت تیروزین کینازی می‌باشد [۵]. این گیرنده به صورت همودایمر و یا هترودایمر با سایر اعضا فعال شده که موجب رشد و تمایز سلول‌ها می‌شود. در برخی از سرطان‌ها از جمله سرطان پستان و تخمدان افزایش بیان در سطح HER2 مشاهده شده است

[ DOI: 10.29252/koomesh.22.2.341 ]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Friday September 11th 2020

[۶]. تکثیر ژن HER2 و یا افزایش بیان پروتئین مربوط به آن در ۲۵ تا ۳۰ درصد افراد مبتلا به سرطان پستان اتفاق می‌افتد. این افراد سرطان سینه بدخیم دارند و پیش‌آگهی مطلوبی را نشان نمی‌دهند [۷]. تومورهایی که HER2 را بیش از حد بیان می‌کنند بسیار بدخیم‌تر از انواع دیگر هستند و دارای سرعت مرگ بالاتری نسبت به تومورهایی که این ویژگی را ندارند، هستند [۸،۹].

تراستوزومب یک آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی است که به گیرنده‌ی HER2 متصل می‌شود که در سال ۱۹۹۸ توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) تأیید شده است. تراستوزومب اثر درمانی مؤثری را در مراحل اولیه و متاستاز مبتلایان به سرطان سینه نشان می‌دهد و با اتصال به ناحیه خارج سلولی HER2 سبب القا آپوپتوز از طریق سمیت سلولی با واسطه آنتی‌بادی (ADCC) و هم‌چنین سرکوب مسیر پیام‌رسانی سلول‌های سرطان سینه می‌شود که نهایتاً در تکثیر سلول، رگ‌زایی و تعمیر DNA تداخل ایجاد می‌کند [۱۰]. بسیاری از مطالعات نشان دادند که متوسط میزان پاسخ کلی در بیمارانی‌که از تراستوزومب در مراحل اولیه متاستاز سرطان استفاده کردند حدود ۱۹ تا ۲۶ درصد می‌باشد. در صورتی‌که در خط اول درمان تراستوزومب همراه شیمی‌درمانی به‌کار رود، میزان و مدت پاسخ بیش‌تر شده و خطر مرگ تا ۲۰ درصد کاهش می‌یابد [۱۱]. علاوه بر تراستوزومب، آنتی‌بادی‌های مختلف و قطعات حاصل از آن‌ها برای گیرنده HER2طراحی شده و در مراحل مختلف مورد آزمایش قرار گرفته است. آنتی‌بادی و قطعات آن به تنهایی و یا همراه با داروها و عوامل درمانی جهت هدف‌یابی اختصاصی آن‌ها به سمت محل اثرشان به کار می‌روند.

جهت تعیین خصوصیات محصولات بیوتکنولوژی مانند آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی، فعالیت بیولوژیک، خصوصیات ایمونوشیمیایی، خلوص و ناخالصی‌ها توسط روش مناسب ضروری است. همان‌طور که در دستورالعمل ICH Q6B کنفرانس بین‌المللی هماهنگ‌سازی (ICH) ذکر گردیده است، ارزیابی فعالیت بیولوژیک در تعیین خصوصیات کامل یک محصول از مراحل بسیار ضروری است [۱۲]. برای رسیدن به این هدف، از آزمایش‌های بیوشیمیایی بر مبنای اندازه‌گیری میزان واکنش آنزیمی ناشی از تعاملات ایمنولوژیکی استفاده می‌شود [۱۳].

سنجش جذب ایمنی آنزیمی (الایزا Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) یکی از رایج‌ترین روش‌ها برای بررسی فعالیت بیولوژیک آنتی‌بادی می‌باشد. در این روش اتصال اختصاصی آنتی‌بادی به آنتی‌ژن ویژه خود مورد سنجش قرار می‌گیرد، که بسیار ساده‌تر از روش‌های بر پایه مطالعه حیوانی و یا سلولی است. الایزا در مقایسه با سایر روش‌های بررسی‌کننده‌ی ایمنی، دقیق، با حساسیت بالا و کاملاً اختصاصی می‌باشد [۱۲]. در طراحی الایزا جهت اطمینان از صحت و درستی کل روش می‌بایست از یک نمونه به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شود. تراستوزومب تجاری می‌تواند به‌عنوان کنترل مثبت در آزمایش الایزای آنتی‌بادی‌های ضد گیرنده HER2 و قطعات آن مورد استفاده قرار گیرد [۱۴].

در آزمون چندمرحله‌ای الایزا بسیار مهم است که پس‌زمینه را تا حد امکان به حداقل رساند تا بتوان سیگنال‌های ضعیف را هم تشخیص داد. پلیت‌های الایزا ظرفیت بالایی برای اتصال به پروتئین، پپتید و سایر مولکول‌ها دارند [۱۵]. پس‌زمینه عمدتاً به علت واکنش‌های ناخواسته مواد با یک‌دیگر و هم‌چنین اتصال غیر اختصاصی موادی غیر از آنتی‌ژن و آنتی‌بادی به سایت‌های اشباع‌نشده سطوح جامد چاهک‌ها ایجاد می‌شود [۱۵] و یکی از خطاهای مهم در روش الایزا است. اتصال غیر اختصاصی ناخواسته را می‌توان با اشباع کردن سایت‌های اتصال باقی‌مانده سطح پلاستیک با مواد پروتئینی مختلف (مواد بلوک‌کننده) که لازم است با ایمونواسی تداخل نداشته باشد، به حداقل رساند [۱۶]. مرحله‌ی شستشو بین هر مرحله‌ی الایزا انجام می‌شود تا مواد متصل‌نشده برداشته شود. از دلایل محتمل ایجاد پس‌زمینه، شستشو و بلوک کردن ناکافی است که لازم است بهینه شود [۱۷]. در الایزای غیر مستقیم به میزان بهینه آنتی‌ژن که بتواند چاهک‌ها را بپوشاند و به‌طور موفقیت‌آمیز به آنتی‌بادی متصل شود و نهایتاً با آنتی‌بادی ثانویه ضد گونه اولیه شناسایی شود احتیاج است. جهت صرفه‌جویی در میزان آنتی‌ژن، لازم است در مرحله‌ی بهینه‌سازی غلظت آنتی‌ژن، حداقل میزان آنتی‌ژن که منجر به ایجاد سیگنال مناسب می‌شود، تعیین شود [۱۹،۱۸].

هدف از این مطالعه، انجام و بهینه‌سازی روش الایزا برای بیوسیمیلار تراستوزومب (آریوتراست تولید شده در شرکت آریوژن فارمد) به‌عنوان کنترل مثبت می‌باشد. در الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن HER2، متغیرهایی مانند دفعات شستشو، نوع ماده بلوک‌کننده و غلظت آنتی‌ژن مورد بررسی قرار گرفت. در الایزای مبتنی بر سلول، نوع سلول و ماده‌ی بلوک‌کننده مورد آنالیز قرار گرفت. داده‌های بهینه‌سازی به‌دست آمده، می‌تواند برای طراحی روش الایزا برای سایر آنتی‌بادی‌های ضد گیرنده HER2 و قطعات آن مورد استفاده قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه با مجوز کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به شماره IR.SBMU.PHARMACY.REC.1398.184 انجام شد.

[ DOI: 10.29252/koomesh.22.2.341 ]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Friday September 11th 2020

**مواد و بافرها**

داروی تراستوزومب AryoTrust® از شرکت آریوژن فارمد تهیه شد. تمام مواد شیمیایی استفاده شده در مطالعه دارای درجه آزمایشگاهی می‌باشند. پودر کربنات و بی‌کربنات سدیم، هیدروکسید سدیم، شیرخشک، محلول سولفوریک اسید و توین ۲۰ از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد. محلول PBS 10× از شرکت Biosera (انگلستان)، ماده TMB (تترامتیل بنزیدین) از شرکت BD Biosciences (انگلستان) و BSA از شرکت Autocel (اتریش) تهیه شد. آنتی‌بادی ضد IgG انسانی متصل به پروکسیداز (HRP) تولید شده در بز از شرکت Sigma (آمریکا) و آنتی‌ژن HER2 نوترکیب از شرکت Invitrogen (آمریکا) خریداری شد. مواد کشت سلولی شامل محیط کشت سلولی RPMI ۱۶۴۰ از شرکت ایناکلون (ایران)، FBS از شرکت Gibco(آمریکا) و Pen/Strep از شرکت Biosera (انگلستان) تهیه گردید.

**روش الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن HER2**

در این مطالعه از روش الایزای غیر مستقیم (Indirect ELISA) استفاده شد (شکل ۱ الف). بدین منظور، کف چاهک پلیت ۹۶ خانه (SPL، کره جنوبی) با غلظت مشخص (میکروگرم در میلی‌لیتر) آنتی‌ژن HER2 (Invitrogen، آمریکا) رقیق شده در بافر کربنات- بی‌کربنات سدیم (۰/۲ مولار، pH۹/۶) پوشانده شد. سپس، پلیت به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن، چاهک‌ها سه بار با محلول PBS-T (بافر PBS 1× حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰) شستشو داده شدند. در مرحله‌ی بعد، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول مسدودکننده اضافه و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بروی شیکر قرار داده شد. پس از ۳ مرتبه شستشو چاهک‌ها با محلول PBS-T، نمونه تراستوزومب با رقت مشخص به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. سپس، چاهک‌ها ۵ مرتبه با محلول PBS-T شستشو داده شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد IgG انسانی متصل به پروکسیداز (HRP)(Sigma، آمریکا) با رقت ۱:۵۰۰۰ به هر چاهک افزوده شد. پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بروی شیکر قرار داده شد. در نهایت، پس از ۵ مرتبه شستشو چاهک‌ها با محلول PBS-T، میزان ۱۰۰ میکرولیتر TMB (BD Biosciences، انگلستان) به‌عنوان سوبسترا به هر چاهک افزوده، و با تغییر رنگ واکنش توسط اسیدسولفوریک ۲ مولار متوقف شد. سپس، $OD_{450}$ چاهک‌های پلیت، توسط دستگاه ELISA reader (Synergy Biotech، آمریکا) خوانده شد.

**تعیین تعداد دفعات شستشوی مناسب در روش الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن HER2**

برای تعیین تعداد دفعات شستشوی مناسب، از چاهک‌های بدون آنتی‌ژن HER2 که با مقدار ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از تراستوزومب مواجه شدند، استفاده شد. نتایج شستشو (بین مراحل مختلف آزمون ELISA مبتنی بر آنتی‌ژن) با دفعات ۳ و ۵ مرتبه با یک‌دیگر مقایسه شدند.

**مقایسه محلول‌های مختلف مسدودکننده در روش الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن HER2**

در این مرحله، به منظور انتخاب محلول مسدودکننده‌ی مناسب سه محلول مسدودکننده‌ی BSA (Autocel، اتریش) ۱ درصد، محلول BSA ۳ درصد و محلول شیر خشک ۵ درصد مقایسه گردید. مقدار آنتی‌ژن HER2 ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و صفر و غلظت تراستوزومب ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و صفر در نظر گرفته شد. بقیه مراحل مانند روش کلی الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن HER2 انجام گرفت.

**تعیین غلظت مناسب HER2 در روش الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن HER2**

به منظور به‌دست آوردن غلظت مناسب HER2 برای انجام الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن، در محدوده‌ی ۰ تا ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌ژن HER2 (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۰/۷ و ۱) رقت‌سازی انجام شد. هر رقت با تکرار دوتایی در کف چاهک با استفاده از بافر کربنات- بی‌کربنات سدیم ۰/۲ مولار (pH ۹/۶) به‌عنوان رقیق‌کننده پوشانده شد. از محلول شیر خشک ۵ درصد به‌عنوان مسدودکننده استفاده شد. نمونه تراستوزومب با غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۱۰) برای هر چاهک به کار گرفته شد. بقیه مراحل مانند روش کلی انجام گرفت. به منظور بررسی غلظت‌های کم‌تر از ۰/۱ آنتی‌ژن HER2 از محدوده‌ی ۰ تا ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر (۰، ۰/۰۳، ۰/۰۵، ۰/۰۷ و ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) رقیق‌سازی انجام شد. در این مرحله، از غلظت ۰، ۰/۰۵، ۰/۰۷ و ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر تراستوزومب استفاده شد. مابقی مراحل مانند روش ذکر شده در مراحل قبل انجام گرفت.

**کشیدن منحنی استاندار تراستوزومب**

منحنی استاندار تراستوزومب در دو محدوده غلظتی کم (۰ تا ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر شامل ۰/۰۵، ۰/۰۷، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۵) و زیاد (۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر شامل ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰) تراستوزومب انجام شد. برای پوشاندن کف چاهک‌ها در محدوده غلظتی کم تراستوزومب از غلظت‌های مختلف HER2 شامل ۰، ۰/۱ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. از آنتی‌ژن HER2 با غلظت‌های ۰،

[ DOI: 10.29252/koomesh.22.2.341 ]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Friday September 11th 2020

۰/۰۱، ۰/۰۶ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر برای پوشاندن کف چاهک‌ها در محدوده‌ی غلظتی بالای تراستوزومب استفاده شد. جهت مسدودسازی از محلول شیر خشک ۵ درصد استفاده شد.

**الایزای مبتنی بر سلول (Cell-based ELISA)**

رده‌ی سلولی سرطان کارسینومای پستان انسانی HER2 مثبت SK-BR-3 و HER2 منفی MDA-MB-231 و MCF-7 از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. این سلول‌ها در محیط کشت سلولی RPMI ۱۶۴۰ در حضور FBS ۱۰ درصد (v/v) و Pen/Strep ۱ درصد در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در حضور $CO_2$ ۵ درصد کشت داده شدند.

به‌طور کلی، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با غلظت $10^4$ cells/mL از هر رده‌ی سلولی در کف چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه (از نوع کف صاف) به صورت تکرار دوتایی کاشته شد (شکل ۱ ب). جهت اتصال سلول‌ها به کف چاهک‌ها، سوسپانسیون سلولی به مدت ۲۴ ساعت در حضور محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ در انکوباتور قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت، خانه‌هایی که سلول‌ها در آن‌ها به صورت تک لایه بودند جهت انجام تست انتخاب گردید. سپس، چاهک‌ها سه بار به وسیله‌ی PBS 1×شسته و سلول‌ها جهت فیکس شدن در کف چاهک‌ها، توسط ۱۰۰ میکرولیتر محلول فرمالدئید ۱۰درصد به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از آن، چاهک‌ها سه مرتبه به وسیله‌ی PBS 1× مورد شستشو قرار گرفتند. سپس، سلول‌های فیکس شده در حضور ۱۰۰ میکرولیتر محلول مسدودکننده به مدت دو ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس، چاهک‌ها ۳ مرتبه به وسیله‌ی بافر شستشو (PBS-T) (PBS 1× حاوی ۰/۵ درصد حجمی/حجمی توئین ۲۰) شسته شدند. در مرحله‌ی بعدی، ۱۰۰ میکرولیتر تراستوزومب با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن، چاهک‌ها ۳ مرتبه با بافر شستشو، شسته شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد IgG انسانی متصل به پروکسیداز (HRP)(Sigma، آمریکا) با رقت ۱:۵۰۰۰ به هر چاهک افزوده و در دمای اتاق به مدت دو ساعت روی شیکر قرار داده شد. در مرحله‌ی آخر، پس از ۳ بار شستشو توسط PBS-T، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول TMB به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. نهایتاً با تغییر رنگ، واکنش به وسیله‌ی اسیدسولفوریک mM ۳۰۰ متوقف و OD نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader (Synergy Biotech، آمریکا) خوانده شد.

**تعیین محلول مسدودکننده‌ی مناسب برای الایزای مبتنی بر سلول**

در این مرحله، از دو رده سلولی SK-BR-3 و MCF-7 استفاده شد. برای بهینه‌سازی محلول مسدودکننده، از بافر BSA ۱ درصد و BSA ۳ درصد استفاده شد. مابقی مراحل مانند روش کلی انجام گرفت.

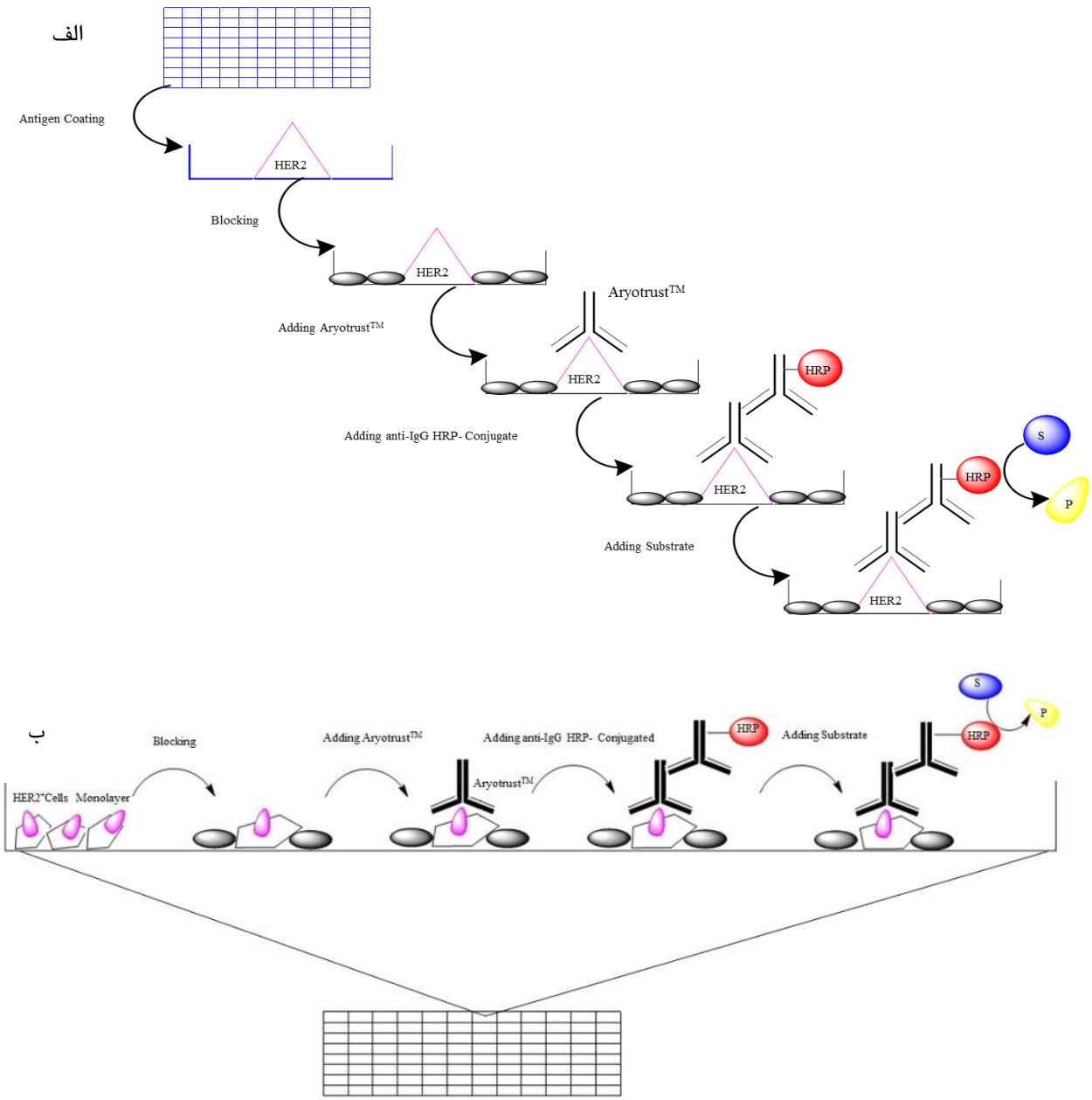
**تعیین نوع سلول HER2 منفی مناسب برای الایزای مبتنی بر سلول**

در این مرحله، از دو رده سلولی HER2 منفی MCF-7 و MDA-MB-231 استفاده شد. رده سلولی SK-BR-3 نیز به عنوان رده‌ی HER2 مثبت به‌کار گرفته شد. سلول‌ها در معرض غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از تراستوزومب قرار گرفتند. از مسدودکننده با غلظت مناسب که در مرحله قبل مشخص شد به‌عنوان محلول مسدودکننده استفاده شد. مابقی مراحل مانند روش مذکور انجام گرفت. در نهایت، در شرایط بهینه، آزمون ELISAمبتنی بر سلول برای دو غلظت ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بادی تراستوزومب انجام گرفت.

**آنالیز آماری**

مقایسه‌های آماری بین دو گروه توسط نرم‌افزار GraphPad به‌وسیله آنالیز پارامتریک T-test انجام شد.

[ DOI: 10.29252/koomesh.22.2.341 ]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Friday September 11th 2020




شکل ۱. تصویر شماتیک از (الف) الایزای مبتنی بر HER2 و (ب) الایزای مبتنی بر سلول

## نتایج

**تعیین تعداد دفعات شستشوی مناسب در الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن HER2**

تعداد دفعات شستشوی (بین مراحل مختلف آزمون ELISA مبتنی بر آنتی‌ژن) ۳ و ۵ مرتبه مقایسه گردید. در این مرحله، از چاهک‌های بدون آنتی‌ژن HER2 که با مقدار ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از تراستوزومب مواجه شدند، استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، هنگامی که از ۵ مرتبه شستشو ما بین مراحل مختلف استفاده شد، $OD_{450}$ در چاهک‌های فاقد آنتی‌ژن به‌صورت معناداری کم‌تر از زمانی بود که شستشوی بین مراحل مختلف ۳ مرتبه انجام شد ($P<۰/۰۱$) $OD_{450}$ کم‌تر در چاهک‌های فاقد آنتی‌ژن نشان‌دهنده‌ی پس زمینه غیراختصاصی کم‌تر است.

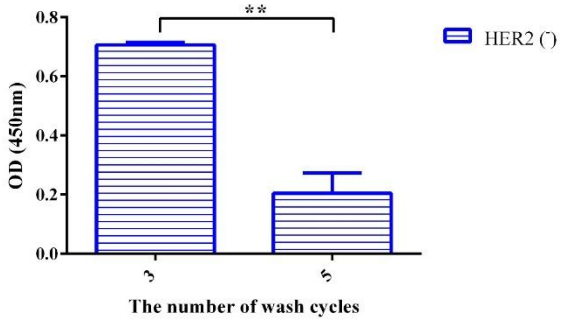
**مقایسه‌ی بافرهای‌های مسدودسازی (blocking) مختلف در الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن HER2**

در مرحله مسدودسازی از سه محلول BSA ۱ درصد، محلول BSA ۳ درصد و محلول شیر خشک ۵ درصد استفاده شد. غلظت آنتی‌ژن HER2، ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و غلظت نمونه تراستوزومب، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. غلظت صفر آنتی‌ژن HER2 و هم‌چنین غلظت صفر تراستوزومب به‌عنوان کنترل منفی برای همه آزمایش‌ها به‌کار گرفته شد. همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود، اختلاف $OD_{450}$

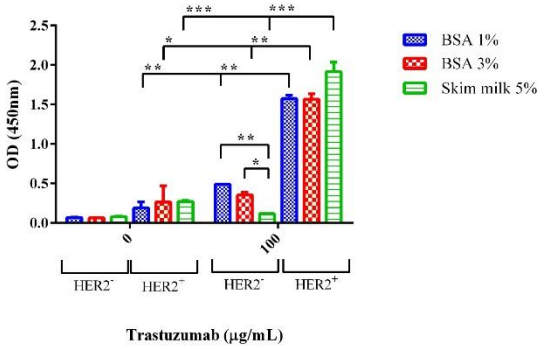
[ DOI: 10.29252/koomesh.22.2.341 ]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Friday September 11th 2020



اندازه‌گیری شده بین چاهک حاوی آنتی‌ژن HER2 که با شیر خشک ۵ درصد مسدود شده و در معرض غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ($HER^+$، شیر خشک ۵ درصد و تراستوزوماب ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از تراستوزومب قرار گرفته است با چاهک حاوی آنتی‌ژن HER2، مسدود شده با محلول شیر خشک ۵ درصد که تراستوزومب دریافت نکرده است ($HER^+$، شیر خشک ۵ درصد و تراستوزوماب ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) معنادار می‌باشد (P<۰/۰۰۱) این اختلاف معنادار ما بین چاهک ($HER^+$، BSA ۱ درصد و تراستوزوماب ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ($HER^+$، BSA ۱ درصد و تراستوزوماب ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) (P<۰/۰۱) و هم‌چنین بین چاهک ($HER^+$، BSA ۳ درصد و تراستوزوماب ۱۰۰میلیگرم برمیلی‌لیتر) و ($HER^+$، BSA ۱ درصد و تراستوزوماب ۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) (P<۰/۰۵) به میزان کم‌تری مشاهده می‌شود. از طرفی $OD_{450}$ چاهک‌های ($HER^-$، شیر خشک ۵ درصد و تراستوزوماب ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، به‌طور محسوسی از $OD_{450}$ چاهک‌های ($HER^-$، BSA ۳ درصد و تراستوزوماب ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) (P<۰/۰۵) و ($HER^-$، BSA ۱ درصد و تراستوزوماب ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) (P<۰/۰۱) کم‌تر است. در نتیجه، کم‌ترین میزان اتصال غیر اختصاصی تراستوزومب و یا آنتی‌بادی ثانویه به کف پلیت در حضور محلول مسدودکننده‌ی شیر خشک ۵ درصد دیده شد. بنابراین، محلول مسدودکننده‌ی شیر خشک ۵ درصد به عنوان مسدودکننده‌ی مناسب برای انجام الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن انتخاب شد.




شکل ۲. تعیین تعداد دفعات شستشوی مناسب در الایزای مبتنی بر HER2 . چاهک‌های بدون آنتی‌ژن HER2 با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تراستوزومب مواجه و الایزا انجام شد. داده ها نشانگر mean±SD دو تکرار است. ** نشانگر اختلاف معنی‌دار P<0.01 است.




شکل ۳. مقایسه محلول‌های مسدود سازی مختلف در الایزای مبتنی بر HER2. چاهکهای فاقد و حاوی آنتی‌ژن HER2 (غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر HER2) با محلول‌های مسدودسازی مختلف پوشانده و سپس در معرض غلظت‌های ۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تراستوزومب قرار گرفته و مراحل مختلف الایزا انجام شد. داده ها نشانگر mean±SD دو تکرار است. *، ** و *** به ترتیب نشانگر اختلاف معنی‌دار P<0.05، P<0.01 و P<0.001 می‌باشد.

### تعیین مقدار مناسب آنتی‌ژن HER2 در الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن HER2

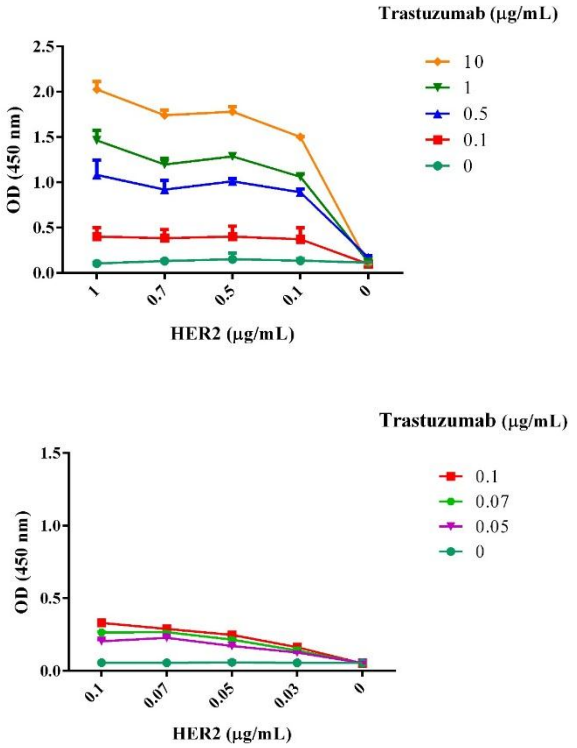
به منظور تعیین غلظت مناسب HER2 برای انجام الایزای مبتنی بر HER2، الایزا با غلظت‌های مختلف HER2 در حضور تراستوزومب انجام شد. همان‌طور که در شکل ۴ (الف) مشاهده شد $OD_{450}$ در غلظت HER2 ۰/۱ تا ۰/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر در تمامی غلظت‌های تراستوزومب مورد آزمایش تقریباً ثابت است و با افزایش غلظت HER2 افزایش $OD_{450}$ دیده نمی‌شود. بنابراین، غلظت HER2 در این محدوده برای انجام الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن مناسب است. در غلظت HER2 پایین‌تر از ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر، $OD_{450}$ با کاهش غلظت HER2، کاهش می‌یابد (شکل ۴ (الف و ب)). در نتیجه، غلظت HER2 پایین‌تر از ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر برای انجام الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن مناسب نیست. همان‌طور که در شکل ۴ (ب) مشاهده می‌شود در غلظت‌های کم‌تر از ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر HER2، میزان سیگنال ناشی از واکنش HER2 و تراستوزومب در اثر کمبود غلظت آنتی‌ژن HER2 کاهش یافت. بنابراین، کم‌ترین میزان آنتی‌ژن که منجر به شدت واکنش قابل قبول می‌شود غلظت HER2 ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر است.

### الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن HER2

جهت بررسی کارایی الایزای بهینه شده‌ی مبتنی بر آنتی‌ژن HER2 در شناسایی تراستوزومب دو محدوده‌ی غلظتی کم و زیاد تراستوزومب توسط این نوع الایزا بررسی گردید. محدوده‌ی غلظت کم تراستوزومب (۰ تا ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) در

[ DOI: 10.29252/koomesh.22.2.341 ]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Friday September 11th 2020

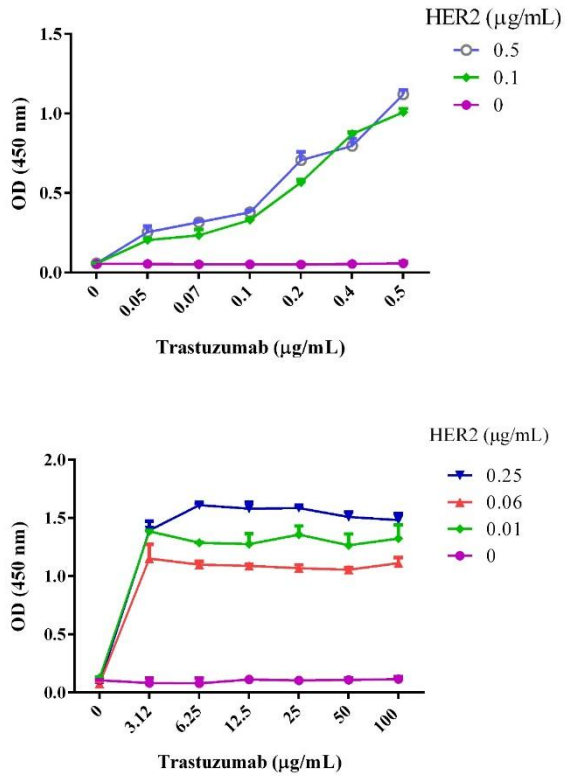
تمامی غلظت‌های HER2 با افزایش مقدار تراستوزومب، $OD_{450}$ افزایش می‌یابد (شکل ۵ (الف)). همان‌طور که در شکل ۵ (ب) مشاهده می‌شود در محدوده غلظتی بالای تراستوزومب، با افزایش غلظت تراستوزومب از ۳/۱۲ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش $OD_{450}$ مشاهده نمی‌شود. نتایج فوق در تمامی غلظت‌های HER2 مورد آزمایش به همین روال بود.




شکل ۴. تعیین غلظت مناسب HER2 برای انجام الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن. (الف) رقیق سازی آنتی‌ژن HER2 در محدوده‌ی ۰ تا ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و (ب) ۰ تا ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر انجام شد. محلول شیر خشک ۵ درصد به عنوان محلول مسدود کننده استفاده و مراحل مختلف الایزا انجام شد. داده ها نشانگر mean±SD دو تکرار است.

### تعیین محلول مسدودکننده و نوع سلول HER2 منفی مناسب در روش الایزای مبتنی بر سلول

در ابتدا از دو رده سلولی SK-BR-3 به‌عنوان سلول HER2 مثبت و MCF-7 به عنوان HER2 منفی استفاده شد. جهت تعیین درصد مناسب محلول مسدودکننده، دو بافر BSA ۱ و ۳ درصد مقایسه شدند. همان‌طور که در شکل ۶ (الف) مشاهده می‌شود، اختلاف $OD_{450}$ اندازه‌گیری شده مربوط به بافر BSA ۱ درصد بین رده سلولی SK-BR-3 و رده سلولی MCF-7 که در معرض غلظت ثابت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از تراستوزومب قرار گرفته‌اند معنادار نمی‌باشد. در حالی‌که این اختلاف بین رده سلولی SK-BR-3 و رده سلولی MCF-7 در حضور بافر BSA ۳ درصد به عنوان محلول مسدودکننده معنادار است (P<۰/۰۱). از این جهت از بافر BSA ۳ درصد به‌عنوان محلول مسدودکننده مناسب استفاده شد. در مرحله بعدی، برای انتخاب رده سلولی HER2 منفی مناسب، از رده سلولی MDA-MB-231 استفاده شد. در این آزمون محلول مسدودکننده ۳BSA درصد در نظر گرفته شد. همان‌طور که در شکل ۶ (الف) مشاهده می‌شود، اختلاف $OD_{450}$ اندازه‌گیری شده بین رده سلولی SK-BR-3 (HER2 مثبت) و رده سلولی MDA-MB-231 (HER2 منفی) که در معرض غلظت ثابت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از تراستوزومب قرار گرفته‌اند معنادار می‌باشد (P<۰/۰۰۰۱) و این اختلاف معنادار نسبت به اختلاف دو رده سلولی SK-BR-3 و MCF-7 (P<۰/۰۱) بیش‌تر است.

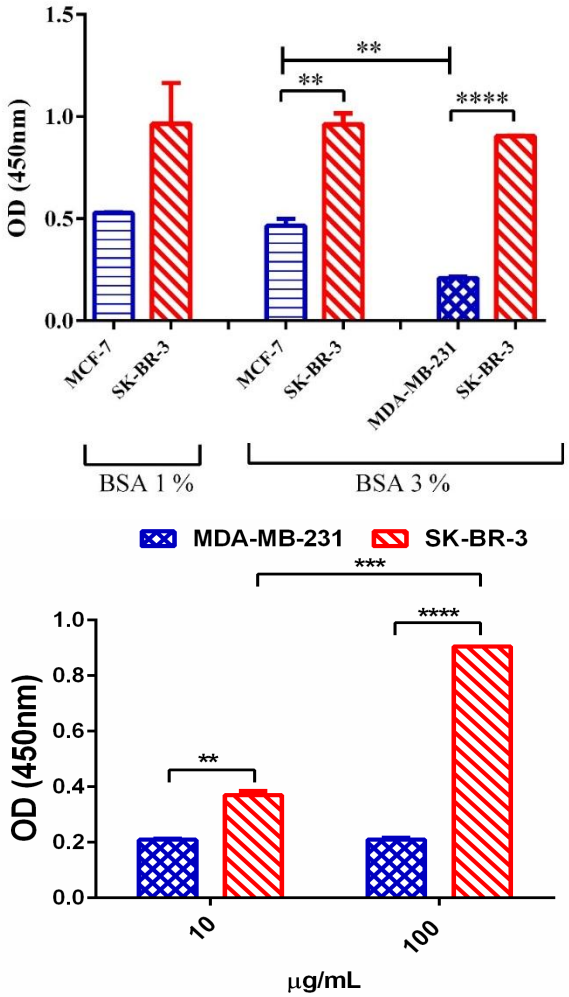



شکل ۵. منحنی استاندارد تراستوزومب توسط الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن منحنی استاندارد در محدوده‌ی غلظتی کم (الف) و (ب) زیاد تراستوزومب. (الف) الایزای مبتنی بر HER2 برای تراستوزومب در محدوده‌ی ۰ تا ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تراستوزومب در حضور HER2 با غلظتهای مختلف در محدوده ۰ تا ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر انجام شد. (ب) الایزای مبتنی بر HER2 برای تراستوزومب در محدوده‌ی غلظتی ۳/۱۲ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تراستوزومب در حضور HER2 در محدوده ۰ تا ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر انجام شد. داده ها نشانگر mean±SD دو تکرار است.

هم‌چنین، $OD_{450}$ سلول‌های MDA-MB-231 که در معرض غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از تراستوزومب قرار گرفته‌اند به‌طور محسوسی از $OD_{450}$ سلول‌های MCF-7 کم‌تر است (P<۰/۰۱). در نتیجه برای انجام الایزای مبتنی بر سلول از رده سلولی HER2 منفی MDA-MB-231 و محلول

[ DOI: 10.29252/koomesh.22.2.341 ]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Friday September 11th 2020

مسدودکننده‌ی BSA ۳ درصد استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۶ (ب) دیده می‌شود با افزایش غلظت تراستوزومب از ۱۰ به ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر $OD_{450}$ به‌صورت معنادار (P<۰/۰۰۱) افزایش می‌یابد. در هر دو غلظت بررسی شده تراستوزومب، $OD_{450}$ به‌طور محسوسی در رده‌ی سلولی SK-BR-3 از MDA-MB-231 بالاتر است.




شکل ۶. الایزای مبتنی بر سلول. (الف) تعیین نوع سلول و محلول مسدودکننده در الایزای مبتنی بر سلول. در ابتدا رده سلولی SK-BR-3 (HER2 مثبت) و رده‌ی سلولی MCF-7 (HER2 منفی) توسط محلولهای BSA ۱ و ۳ درصد مسدود شدند و در معرض غلظت ثابت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تراستوزومب قرار گرفته اند. سپس، سلول MDA-MB-231 به عنوان رده سلولی HER2 منفی توسط محلولهای BSA ۱ و ۳ درصد مسدود و در معرض غلظت ثابت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تراستوزومب قرار گرفت. (ب) الایزای مبتنی بر سلول با محلول مسدود کننده و سلول مناسب. در شرایط بهینه رده‌های سلولی SK-BR-3 و MDA-MB-231 در مواجهه با غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تراستوزومب قرار گرفتند. داده ها نشانگر mean±SD دو تکرار است. **، *** و **** به ترتیب اختلاف معنی‌دار P<0.01، P<0.001 و P<0.0001 را نشان می‌دهد.

## بحث و نتیجه‌گیری

الایزا روشی حساس، اختصاصی، تکرارپذیر و سریع جهت بررسی فعالیت بیولوژیک آنتی‌بادی‌ها و قطعات حاصل از آن می‌باشد [۲۰]. استفاده از یک ماده کنترل مثبت که هم‌زمان با نمونه‌های تست در آزمایش الایزا پیش می‌رود، صحت روش را نشان می‌دهد. در نتیجه داده‌های حاصل از روش الایزا قابل اطمینان خواهد بود [۱۴]. تراستوزومب یک آنتی‌بادی مونوکلونال می‌باشد که گیرنده HER2 را هدف قرار می‌دهد [۷] و باعث مهار مسیر پیام‌رسانی پایین‌دستی می‌شود [۱۱]. آریوتراست (AryoTrust™) از بیوسیمیلارهای تولید شده توسط کمپانی آریوژن فارمد است که توسط سازمان غذا و داروی ایران تأیید شده است [۲۱]. تراستوزومب تجاری می‌تواند یک نمونه کنترل مثبت مناسب در روش الایزا طراحی شده برای بررسی فعالیت بیولوژیک آنتی‌بادی‌ها و قطعات حاصل از آن باشد. در این مطالعه، روش الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن HER2 و مبتنی بر سلول برای فرم بیوسیمیلار داروی تراستوزومب (آریوتراست™) بررسی گردید. در الایزای مبتنی بر آنتی‌ژن عوامل مختلف مانند دفعات شستشو، نوع ماده‌ی مسدودکننده و غلظت آنتی‌ژن مورد بررسی قرار گرفتند.

مرحله‌ی شستشو برای حذف مواد باند نشده ضروری است. معمولاً بین هر مرحله‌ی الایزا ۳ تا ۵ مرتبه شستشو انجام می‌شود. در این مطالعه، اتصال غیر اختصاصی در چاهک‌های فاقد HER2 زمانی‌که بین مراحل مختلف الایزا ۵ مرتبه شستشو انجام شد کم‌تر از زمانی بود که بین مراحل مختلف الایزا ۳ مرتبه شستشو صورت گرفت. در بسیاری از مطالعات، به منظور جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی از ۵ مرتبه شستشو بین مراحل مختلف الایزا استفاده شده است [۲۳،۲۲].

برای تشخیص درست در روش الایزا لازم است حداقل پس‌زمینه غیراختصاصی و تفاوت ما بین مقادیر OD کنترل‌های مثبت و منفی بالا باشد [۲۰]. به‌دلیل کاهش سیگنال غیر اختصاصی با مسدود کردن مناسب کف پلیت، حساسیت روش بالا می‌رود. در بسیاری از مطالعات ماده‌ی مسدودکننده برای انجام الایزا بهینه می‌شود. به عنوان مثال، Peterfi و همکارش در طراحی آزمایش الایزا جهت تشخیص LPS باکتریایی در مرحله مسدودسازی محلول کازیین، BSA و سرم چند حیوان از جمله بز، خوک و گوسفند را مقایسه کردند. در مطالعه مذکور، سرم بز به‌طور معناداری بیش‌ترین $OD_{450}$ در نمونه کنترل مثبت و کم‌ترین $OD_{450}$ در نمونه منفی را از خود نشان داد [۲۰]. هم‌چنین، Kaur و همکارانش جهت بهینه‌سازی محلول مسدودسازی الایزای شناسایی‌کننده آنتی‌ژن Vitreoscilla hemoglobin (VHb)، محلول کازئین، شیر خشک، BSA،

[ DOI: 10.29252/koomesh.22.2.341 ]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Friday September 11th 2020

ژلاتین پوست ماهی، سرم اسب و سرم بز را مورد آزمایش قرار دادند که محلول کازئین به عنوان محلول مسدودسازی بهینه انتخاب شد [۲۴]. در مطالعه حاضر، اثر محلول مسدودکننده بر کاهش سیگنال غیر اختصاصی بررسی گردید. بدین منظور، سه محلول BSA ۱ درصد، BSA ۳ درصد و شیر خشک ۵ درصد مقایسه شدند. شیر خشک ۵ درصد به‌طور محسوسی سبب کاهش $OD_{450}$ در چاهک کنترل منفی (چاهک فاقد آنتی‌ژن HER2 مواجه شده با تراستوزومب ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در مقایسه با سایر محلول‌های مسدودکننده (BSA ۱ و ۳ درصد) شد. از طرفی $OD_{450}$ سنجش شده در چاهک‌های حاوی آنتی‌ژن HER2 مسدود شده با محلول شیر خشک ۵ درصد نسبت به چاهک‌های مشابه که با محلول‌های BSA ۱ درصد و ۳ درصد مسدود شده بودند بالاتر بود. به خصوصیات بلوک‌کنندگی مناسب شیر خشک در بسیاری از متون اشاره شده است. ولیکن در برخی از موارد کارایی کم این ماده در جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی نیز گزارش شده است [۱۶]. در مطالعه Sentandreu و همکارانش نشان داده شد که شیر خشک و کازئین در مهار اتصال غیر اختصاصی در الایزای طراحی شده برای کمی‌سازی مواد حاصل از عضله گاو موثر است [۱۶]. در مطالعه Khodashenas و همکارانش نیز از شیر خشک ۵ درصد جهت مسدود کردن چاهک‌های پوشیده شده با HER2 استفاده شد [۲۵]. در حالی‌که در مطالعه Meysami و همکارانش، مسدودسازی چاهک‌ها در الایزای مبتنی بر HER2 توسط BSA ۱ درصد انجام شد [۲۶].

به منظور جلوگیری از اتلاف آنتی‌ژن در الایزای غیر مستقیم می‌توان آنتی‌ژن را تا قبل از از دست رفتن رنگ رقیق کرد. زمانی‌که کاهش اتصال آنتی‌بادی به دلیل کاهش آنتی‌ژن پوشانده شده در کف چاهک‌های پلیت باشد، ارتفاع پلاتوی منحنی تیتراسیون آنتی‌ژن کاهش می‌یابد [۱۸]. همان‌طور که در شکل ۴ الف مشاهده می‌شود، غلظت ۰/۱ تا ۰/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر برای انجام الایزای مبتنی بر HER2 مناسب است. غلظت‌های پائین‌تر از ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر منجر به کاهش سیگنال به دلیل کاهش غلظت آنتی‌ژن پوشیده شده در کف چاهک‌های پلیت است. نتایج این مطالعه نشان داد که حداقل غلظت آنتی‌ژن که منجر به بیش‌ترین میزان صرفه‌جویی می‌شود و شدت سیگنال قابل قبولی را حتی برای غلظت‌های کم تراستوزومب ارائه می‌دهد، غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر HER2 است. Maple و همکارانش در سال ۲۰۰۴ روش الایزا جهت بررسی تراستوزومب موجود در سرم بیماران طراحی نمودند. غلظت آنتی‌ژن HER2 استفاده شده در این الایزا ng/mL ۱ بود [۲۷]. Suarez و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۶ جهت بررسی تراستوزومب موجود در سرم بیماران، کیت الایزای خاص بیماران را طراحی نمودند. در این الایزا، HER2 با غلظت μg/mL ۱ استفاده شده بود [۱۲].

به‌طور کلی، در این مطالعه عوامل مختلف الایزای مبتنی بر HER2 مانند تعداد دفعات شستشو، بافر مسدودکننده و غلظت آنتی‌ژن HER2 بررسی گردید.

در این مطالعه، به منظور انجام الایزای مبتنی بر سلول، سلول HER2 منفی MCF-7 و MDA-MB-231 مقایسه گردیدند. نتایج حاکی از کاهش محسوس سیگنال در الایزای مبتنی بر سلول MDA-MB-231 در مقایسه با سلول MCF-7 بود. در تعدادی از مطالعات سلول MCF-7 به عنوان سلول HER2 منفی استفاده شده است [۲۹،۲۸]. ولیکن، Latrich و همکارانش گزارش دادند که mRNA HER2 به مقدار بسیار کمی در فرم وحشی MCF-7 وجود دارد [۳۰]. در مطالعه Huang و همکارانش سلول‌های SK-BR-3، MCF-7 وMDA-MB-231 از لحاظ بیان پروتئین HER2 در سطح سلول مقایسه شدند. هم‌راستا با نتایج مطالعه‌ی ما، نتایج فلوسیتومتری مطالعه Huang و همکارانش نشان دادند که SK-BR-3 بیش‌ترین میزان HER2 را بیان می‌کند. سلول‌های MCF-7 میزان HER2 کمی را بیان می‌کنند. سلول‌های MDA-MB-231، HER2 را بسیار کم‌تر از MCF-7 و به سختی بیان می‌کنند [۳۱].

در مطالعه حاضر، الایزای مبتنی بر HER2 و مبتنی بر سلول برای آریوتراست™ بهینه شد. از داده‌های به‌دست آمده از این مطالعه می‌توان برای طراحی روش الایزا برای سایر قطعات آنتی‌بادی‌های ضد گیرنده HER2، ایمونوتوکسین‌ها و قطعات آن استفاده نمود. به این ترتیب می‌توان فعالیت بیولوژیک این آنتی‌بادی‌ها را با اطمینان در حضور آریوتراست™ به عنوان کنترل مثبت سنجید. هر چند که لازم است به منظور اطمینان از اختصاصیت، صحت، دقت، حساسیت، تکرارپذیری در محدوده‌ی مورد نظر و هم‌چنین استحکام (robustness) روش الایزای بهینه شده، آزمایشات معتبرسازی بر اساس دستورالعمل ICH Q2 (R1) برای این روش طراحی و انجام گردد [۳۲،۱۲].

## تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی حوزه پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردیده است. مراحل آزمایشگاهی این تحقیق در آزمایشگاه‌های بخش بیوتکنولوژی دارویی دانشکده داروسازی این دانشگاه انجام گرفته است. لذا محققین این مطالعه بر خود لازم می دانند که از زحمات و حسن همکاری مسئولین مربوطه و همچنین شرکت دارویی آریوژن فارمد به دلیل

فراهم نمودن داروی آریوتراست ™ کمال تشکر و قدردانی خود را ابراز نمایند.

## منابع

[1] Thongsuksai P, Chongsuvivatwong V, Sriplung H. Delay in breast cancer care: a study in Thai women. Med Care 2000; 38: 108-114.

[2] Taslimi Y, Zahedifard F, Habibzadeh S, Taheri T, Abbaspour H, Sadeghipour A, et al. Antitumor effect of IP-10 by using two different approaches: live delivery system and gene therapy. J Breast Cancer 2016; 19: 34-44.

[3] Semnani V, Farhidzadeh E, Mirmohammadkhani M, Ghahremanfard F. Investigation of blood levels of vitamin D in women with breast cancer and its correlation with prognostic markers. Koomesh 2017; 735-741. (Persian).

[4] Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999–2004. Breast J 2009; 15: 593-602.

[5] Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. Nat Rev Clin Oncol 2012; 9: 16-32.

[6] Ahmadi A, Mohagheghi MA, Fazeli MS, Nahavandian B, Bashardoost N, Jarahi AM, Gharipoor M. HESA-A: new treatment for breast cancer and choroidal metastasis. Med Sci Monit 2005; 11: CR300-CR303.

[7] Murphy CG, Modi S. HER2 breast cancer therapies: a review. Biologics 2009; 3: 289-301.

[8] Kauraniemi P, Kallioniemi A. Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer. Endocr Relat Cancer 2006; 13: 39-49.

[9] Foroumadi S, Rajabi bazl M, Hosseini H, Rajabi S, Shahidi S, Daraei A, Toofani Milani A. Expression and characterization of recombinant human epidermal growth factor receptor antigene (HER-2) as an indicator of breast cancer in yeast fermented systems. Koomesh 2016; 18: 110-116. (Persian).

[10] Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. J Control Release 2010; 146: 264-275.

[11] Mohit E, Hashemi A, Allahyari M. Breast cancer immunotherapy: monoclonal antibodies and peptide-based vaccines. Expert Rev Clin Immunol 2014; 10: 927-961.

[12] Suárez I, Salmerón-García A, Cabeza J, Capitán-Vallvey LF, Navas N. Development and use of specific ELISA methods for quantifying the biological activity of bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in stability studies. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2016; 1032: 155-164.

[13] Cheng W, Allen T. The use of single chain Fv as targeting agents for immunoliposomes: an update on immunoliposomal drugs for cancer treatment. Expert Opin Drug Deliv 2010; 7: 461-478.

[14] Damen CW, de Groot ER, Heij M, Boss DS, Schellens JH, Rosing H, et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of trastuzumab in human serum and plasma. Anal Biochem 2009; 391: 114-120.

[15] Steinitz M. Quantitation of the blocking effect of tween 20 and bovine serum albumin in ELISA microwells. Anal Biochem 2000; 282: 232-238.

[16] Sentandreu MA, Aubry L, Toldrá F, Ouali A. Blocking agents for ELISA quantification of compounds coming from bovine muscle crude extracts. Eur Food Res Technol 2007; 224: 623-628.

[17] Khan MS, Pande T, van de Ven TG. Qualitative and quantitative detection of T7 bacteriophages using paper based sandwich ELISA. Colloids Surf B Biointerfaces 2015; 132: 264-270.

[18] Crowther R. The ELISA Guidebook. ed. Humana Press; 2009; 88-97.

[19] Mosayebi G, Abtahi H, Ghazavi A, Zareinfar N, Khaki M, Payani MA. Design of enzyme-linked immunosorbent assay method for detection of anti-streptolysin-O antibodies on base of recombinant streptolysin-O. Koomesh 2012; 13: 362-368. (Persian).

[20] Péterfi Z, Kocsis B. Comparison of blocking agents for an ELISA for LPS. J Immunoassay 2000; 21: 341-354.

[21] Coory M, Thornton K. Randomised clinical endpoint studies for trastuzumab biosimilars: a systematic review. Breast Cancer Res Treat 2019; 1: 17-25.

[22] Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2001; 130: 119-131.

[23] Dixit CK, Vashist SK, MacCraith BD, O'kennedy R. Multisubstrate-compatible ELISA procedures for rapid and high-sensitivity immunoassays. Nat Protoc 2011; 6: 439-445.

[24] Kaur R, Dikshit KL, Raje M. Optimization of immunogold labeling TEM: an ELISA-based method for evaluation of blocking agents for quantitative detection of antigen. J Histochem Cytochem 2002; 50: 863-873.

[25] Khodashenas S, Khalili S, Moghadam MF. A cell ELISA based method for exosome detection in diagnostic and therapeutic applications. Biotechnol Lett 2019; 41: 523-531.

[26] Meysami P, Rezaei F, Marashi SM, Amiri MM, Bakker E, Mokhtari-Azad T. Antitumor effects of a recombinant baculovirus displaying anti-HER2 scFv expressing Apoptin in HER2 positive SK-BR-3 breast cancer cells. Future Virol 2019; 14: 139-152.

[27] Maple L, Lathrop R, Bozich S, Harman W, Tacey R, Kelley M, Danilkovitch-Miagkova A. Development and validation of ELISA for Herceptin detection in human serum. J Immunol Methods 2004; 295: 169-182.

[28] Tan WB, Jiang S, Zhang Y. Quantum-dot based nanoparticles for targeted silencing of HER2/neu gene via RNA interference. Biomaterials 2007; 28: 1565-1571.

[29] Alric C, Hervé-Aubert K, Aubrey N, Melouk S, Lajoie L, Même W, et al. Targeting HER2-breast tumors with scFv-decorated bimodal nanoprobes. J Nanobiotechnology 2018; 16: 18.

[30] Lattrich C, Juhasz-Boess I, Ortmann O, Treeck O. Detection of an elevated HER2 expression in MCF-7 breast cancer cells overexpressing estrogen receptor β1. Oncol Rep 2008; 19: 811-817.

[31] Huang R, Wang Q, Zhang X, Zhu J, Sun B. Trastuzumab-cisplatin conjugates for targeted delivery of cisplatin to HER2-overexpressing cancer cells. Biomed Pharmacother 2015; 72: 17-23.

[32] Sarial S, Sonboli R, Maleknia S, Ashori F, Rezaeiravesh S, Nouri SZ, et al. Development, optimization and validation of a sandwich ELISA for detection of recombinant human factor VII. South Asian J Exper Biol 2015; 5: 26-31.



[ DOI: 10.29252/koomesh.22.2.341 ]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Friday September 11th 2020

[ DOI: 10.29252/koomesh.22.2.341 ]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:45 +0430 on Friday September 11th 2020

Volume 22, Issue 2 (Spring 2020), 341- 350

# Optimization of HER2-based and cell-based ELISA for detection of trastuzumab biosimilar

Maryam Ahmadzadeh (M.Sc)[1,2], Farzaneh Farshdari (M.Sc)[1], Leila Nematollahi (Ph.D)[3], Shayan Maleknia (M.Sc)[4], Elham Mohit (Ph.D)[*1]

*1 - Dept. of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
*2 - Student's Research Committee, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
*3- Biotechnology Research center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*
*4- Biopharmaceutical Research Center, AryoGen Pharmed Inc., Alborz university of Medical Sciences, Karaj, Iran*

* Corresponding author. +98 21-88200067 e.mohit@sbmu.ac.ir Received:1 Jul 2019; Accepted: 25 Sep 2019

***Introduction**:* ELISA is a sensitive, specific, reproducible and fast method to quantify the biological activity of antibodies. Trastuzumab is a humanized monoclonal antibody against HER2 receptors which prevents the initiation of downstream signaling pathway. Trastuzumab can be used as a positive control in the ELISA experiments for anti-HER2 antibodies. Additionaly, insufficient washing and blocking can be the cause of background in the ELISA experiment that is necessary to be optimized. As we do not want to waste antigen, it is also important to determine the last dilution of antigen that can give good titration curve for trastuzumab. The aim of this study was to optimize ELISA method for trastuzumab biosimilar (AryoTrust™, Aryogen pharmed).

***Materials and Methods**:* In this study, different variables including the number of washing cycle, the blocking agent and antigen concentration in HER2-based ELISA and the type of HER2 negative cell line and the blocking agent in cell-based ELISA were studied.

***Results:*** It was demonstrated that 5 times washing between different steps of HER2-based ELISA causes significant lower non-specific background as compared to 3 times washing. Moreover, the nonspecific binding was significantly lower in the presence of % 5 skim milk as blocking agent as compared to BSA %1 or BSA %3. In addition, the lowest HER2 concentration which gives good titration curve for trastuzumab was 0.1 µg/ml. In cell-based ELISA experiment, it was demonstrated that the use of MDA-MB-231 as negative HER2 cell line caused significant lower background than MCF-7. Furthermore, BSA 3% was chosen as proper blocking agent.

***Conclusion:*** The results of this study can be used for development of HER2 and cell-based ELISA for anti HER2 antibodies and its fragments.

***Keywords**:* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Biological Activity, Trastuzumab, Antibodies, Optimization.