

Identification of targeting peptides to human prostate cancer cells (LNCAP) using phage display peptide libraries

Saeedeh Ghiasvand¹, Fatemeh Rahbarizadeh², Babak Bakhshinejad, Majid Sadeghizadeh¹

1. Department of genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Article Information

Article history:

Received: 2014/08/17
Accepted: 2014/11/23
Available online: 2015/03/30

Article Subject:

Medical Biotechnology

IJMM 1394; 9(1): 50-60

Corresponding author at:

Majid Sadeghizadeh

Department of genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Email:

sadeghma@modares.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Prostate cancer is one the most common causes of cancer-associated death in men. Studies have indicated that targeting peptides to prostate cancer cells represent potential to be used as valuable diagnostic and therapeutic tools. Over the recent years, phage display peptide libraries have been used for identifying targeting peptides to a variety of cancer cells. In the current study, we aim to isolate peptides targeting to LNCAP cells (human prostate adenocarcinoma cells). A heptapeptide phage display library was used through biopanning to isolate peptides binding specifically to LNCAP cells.

Materials and Methods: Four rounds of positive panning on LNCAP (target cell) and 4 rounds of subtractive panning on control cells including 5637 (bladder), Huh-7 (liver) and SW480 (colon) and AGS (stomach) and human fibroblast normal cells were performed. Polyclonal phage ELISA was exploited to evaluate the process of enrichment during biopanning. Subsequently, phage clones were randomly picked out from titer plates, amplified by using plaque-PCR and their genomic DNA was sequenced. Bioinformatic analysis was conducted for further characterization of isolated peptides.

Results: Several rounds of panning resulted in the enrichment of peptides among which the peptide (NERALTL) was the most frequent. Also, in silico analysis showed the presence of several consensus amino acid motifs in peptides.

Conclusions: The NERALTL peptide identified through biopanning can be considered as a potential specific binder to LNCAP cells. Further analysis of this peptides is required to show its capacity for targeted delivery of various gene and drug delivery vehicles into prostate cancer cells.

Key Words: Phage Peptide Library, Biopanning, Prostate Cancer, Targeting peptide

Copyright © 2015 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ghiasvand S, Rahbarizadeh F, Bakhshinejad B, Sadeghizadeh M. Identification of targeting peptides to human prostate cancer cells (LNCAP) using phage display peptide libraries. Iran J Med Microbiol. 2015; 1394 (1) :50-60

شناسایی پپتیدهای هدف گیری کننده ی سلول های سرطانی پروستات (LNCAP) با استفاده از کتابخانه ی نمایش فاژی پپتیدی

سعیده قیاسوند^۱، فاطمه رهبری زاده^۲، بابک بخشی نژاد^۱، مجید صادقی زاده^۱

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: سرطان پروستات از علل شایع مرگ و میر در مردان می باشد. مطالعات نشان داده است که پپتیدهای هدف گیری کننده ی سلولهای سرطان قابلیت استفاده به عنوان ابزارهای درمانی و تشخیصی را دارند. در سالهای اخیر کتابخانه های نمایش فاژی پپتیدی برای شناسایی پپتیدهای هدف گیری کننده ی سلولهای سرطانی مختلفی بکار گرفته شده اند. هدف از این تحقیق جداسازی پپتید های هدف گیری کننده ی سلولهای آدنوکارسینومای پروستات انسان بود بدین منظور از کتابخانه فاژی پپتیدی استفاده شد و با انجام بیوپنینگ پپتیدهایی با قابلیت اتصال اختصاصی به سلول های LNCAP شناسایی و جداسازی گردید.

مواد و روش کار: چهار مرحله بیوپنینگ مثبت روی سلولهای LNCAP (سلول هدف) و ۴ مرحله پنینگ منفی روی سلول های کنترل شامل AGS, Fibroblast, SW480, 5637 و Huh-7 انجام شد. پلی کلونال الیزا برای ارزیابی روند غنی سازی انجام شد. سپس ژنوم تعدادی از فاژهای جداسازی شده در مراحل آخر بیوپنینگ با انجام PCR بر روی پلاکهای به دست آمده، تکثیر و تعیین توالی گردید. مطالعات بیوانفورماتیکی برای بررسی های بیشتر انجام شد.

یافته ها: چندین مرحله بیوپنینگ منجر به غنی سازی تعدادی پپتید شد که در بین آنها پپتید *NERALTL* بیشترین فراوانی را داشت. بررسی بیوانفورماتیکی توالیهای به دست آمده چند موتیف آمینواسیدی مشترک را نشان داد.

نتیجه گیری: پپتید *NERALTL* جداسازی شده طی فرایند بیوپنینگ می تواند به عنوان مارکری اختصاصی برای سلولهای سرطانی پروستات در نظر گرفته شود. تحقیقات بیشتری برای بررسی قابلیت ورود هدفمند این پپتیدها برای انتقال دارو یا ژنهای سرکوبگر تومور به داخل سلولهای سرطانی پروستات باید انجام شود.

کلمات کلیدی: کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی، سرطان پروستات، بیوپنینگ، پپتیدهای هدف گیری کننده

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۲۶

پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۰۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۴/۰۱/۱۰

موضوع:

بیوتکنولوژی پزشکی

IJMM 1394; 9(1): 50-60

نویسنده مسئول:

مجید صادقی زاده

گروه ژنتیک، دانشکده علوم
زیستی، دانشگاه تربیت
مدرس، تهران، ایران.

تلفن: ۰۹۱۲۲۱۴۸۴۷۵

پست الکترونیک:

sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

در خصوصیات سطحی سلول های توموری و نرمال می تواند به عنوان یک آدرس مولکولی برای اتصال و رسانش هدفمند مولکولها به سلولهای توموری بکار رود. از آن جا که یکی از بهترین راه کارها برای درمان بیماری سرطان، پیدا نمودن تفاوت هایی است که بین سلولهای توموری و نرمال وجود دارد، تعیین

سرطان بیماری پیچیده ای است و یکی از بهترین راه کارهای شناسایی و درمان این بیماری پیدا نمودن تفاوت های است که در سلول های توموری و نرمال وجود دارد. تغییرات ژنتیکی و پروتئومیکی که طی تومورزایی صورت می گیرد، منجر به تغییر خصوصیات سطحی سلولهای توموری می گردد. تفاوت

از پرکاربردترین کتابخانه های نمایش فاژی است و نسبت به سایر کتابخانه های فاژی ایمنی زایی کمتر و قابلیت نفوذ بیشتری دارد. در این کتابخانه ها انواع بسیار زیادی از پپتید های با توالی تصادفی به صورت فیوژن با پروتئین پوششی فاژ در سطح فاژ نمایش داده می شوند. در این کتابخانه ها هرکولون فاژی بیان کننده ی یک نوع توالی آمینواسیدی منحصر به خود است که در مجموع میلیاردها نوع پپتید در سطح فاژهای یک کتابخانه نمایش داده می شوند (۹-۱۱).

نمایش فاژی تکنیکی مولکولی است که در این تکنیک ژن ها به صورت فرم عملکردی در سطح خارجی باکتیوفاژ از طریق اتصال با پروتئین های پوششی ویروس نمایش داده می شوند. از مزایای تکنیک نمایش فاژی، شناسایی سریع و جداسازی فاژهای دارای اختصاصیت اتصال به هدف مورد مطالعه طی فرایندی به نام غنی سازی یا Biopanning می باشد. بیوپنینگ امکان شناسایی پپتیدهای اختصاصی را در محدوده ی میکرومولار تا نانومولار را موجب می شود. (۱۲-۱۳) طی بیوپنینگ فاژ های کتابخانه ابتدا با هدف مورد نظر که می تواند پروتئین، آنزیم، سلول، بافت و یا موجود زنده باشد انکوبه می شود سپس فاژ های اتصال نیافته طی مراحل شستشو حذف و فاژ های اتصال یافته پس از مرحله ی رها سازی در میزبان مناسب تکثیر می یابند معمولاً ۳ تا ۵ مرحله از فرایند Panning برای بدست آوردن فاژهای اختصاصی ضروری است. توالی پپتیدها از طریق تعیین توالی DNA ی هر کلون تعیین می گردد. (۱۴-۱۶) فرایند بیوپنینگ روی سلول های سرطانی منجر به جداسازی پپتیدهای با قابلیت اتصال اختصاصی به سلول های سرطانی می گردد.

این مطالعه شناسایی و جداسازی فاژ یا فاژهایی از یک کتابخانه فاژی که قابلیت اتصال اختصاصی به سلول های توموری پروستات را داشته باشند را مورد بررسی قرار می دهد. به همین منظور، کتابخانه ی فاژی هفت پپتیدی مورد استفاده قرار گرفت و طی مراحل غنی سازی متعددی فاژهای که به طور اختصاصی به سلول های توموری پروستات نسبت به رده های سلولی کنترل متصل می گردند، جداسازی و در میزبان مناسب تکثیر و سپس با تعیین توالی شناسایی گردید. در نهایت با استفاده از روش های بیوانفورماتیکی مطالعات بیشتری بر روی توالی های پپتیدی جدا شده انجام شد.

اهداف اختصاصی سرطان، نسل جدیدی از روش های درمانی برای سرطان ایجاد نموده است. گروهی از مارکرها که عملکرد و بیانشان به طور اختصاصی با پیشرفت سرطان پروستات همراه است شناسایی شده اند (۱-۳). با این وجود تاکنون مارکرهای ایده الی برای شناسایی سرطان پروستات و رسانش هدفمند داروها به این سلول ها شناسایی نشده است. بنابراین شناسایی مارکرهای اختصاصی که کارایی بهتری برای تشخیص و درمان سرطان پروستات را داشته باشند ضروری به نظر می رسد (۱-۴). سرطان پروستات به عنوان دومین علت شایع مرگ و میر در اثر سرطان در مردان یک مسئله مهم به شمار می رود. مطالعه ی مربوط به نخستین گزارش شیوع سرطان در تهران سرطان پروستات را دومین سرطان شایع در مردان معرفی می کند (۵). در حال حاضر، جراحی، رادیوتراپی، شیمی درمانی و هورمون درمانی به عنوان روش های اصلی جهت درمان سرطان پروستات محسوب می شوند که متأسفانه هیچ یک از این روش های درمانی قابلیت درمانی صد درصد ندارند. در روش جراحی برداشت بافت سرطانی صورت می گیرد، اما در شرایط بدخیمی سرطان تعدادی از سلول ها باقی می ماند و می توانند باعث عود مجدد بیماری شوند. داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی هدفمند نبوده و همه ی سلول های با سرعت تکثیر بالا را متأثر می نمایند. بنابراین یافتن شیوه های درمانی جدید خصوصاً استراتژی های جهت هدفمند نمودن درمان سرطان پروستات که موجب افزایش کارایی روش های درمانی و کاهش عوارض جانبی ناشی از روش های درمانی غیر اختصاصی می گردد ضروری به نظر می رسد. تاکنون مارکرهای ایده الی برای سرطان پروستات و اهداف آن برای رسانش هدفمند داروها شناسایی نشده است. داروهای پپتیدی به علت اندازه ی کوچک و قابلیت نفوذ بالا به بافت ها، ایمنی زایی کم گزینه های مناسبی در زمینه فارماکولوژی محسوب می شوند. اتصال این ذرات پپتیدی به داروهای ضد سرطانی موجب افزایش اختصاصیت در رسانش دارو به سلول ها و بافت های سرطانی و در نتیجه اختصاصیت درمان می شود (۶-۸).

کتابخانه های نمایش فاژی از جمله ابزارهای هستند که برای شناسایی پپتیدهای که بافت ها، تومورها و یا پروتئین های خاصی را مورد هدف قرار می دهند بکار گرفته شده اند. این کتابخانه ها ابزار های جهت غربالگری و شناسایی مولکول های دارویی محسوب می شوند. کتابخانه ی نمایش فاژی پپتیدی یکی

مواد و روش ها

داده شد. سلول ها پس از گذشت سه روز با استفاده از تریپسین (Trypsin) ۰/۲۵ درصد، EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۰۲ درصد پاساژ داده شد. تمامی مواد کشت سلول از شرکت Gibco آمریکا خریداری شد.

انجام بیوپنینگ (Biopanning) منفی و مثبت

بیوپنینگ مهمترین مرحله شناسایی ذرات فازی هدفمند با استفاده از روش نمایش فازی است. انجام مراحل متعدد غنی سازی و شستشوی با افزایش زمان و حجم می تواند منجر به جداسازی ذرات فازی با میل پیوندی بالا شود. برای انجام مرحله اول غنی سازی، سلول ها یک روز قبل از بیوپنینگ تریپسین و تعداد $10^5 \times 3$ از سلول های کنترل و توموری پروستات در پلیت های ۶ خانه ریخته شدند. در روز بعد محیط سلول ها (که کاندولونسی حدود ۹۰ درصد داشتند) با محیط فاقد سرم تعویض و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس نگهداری شد پس از آن به مدت ۱ ساعت با بافر بلاک کننده PBS+BSA 2% در دمای اتاق بلاک شد. بعد از حذف بافر بلاکینگ یکبار با بافر شستشو شسته و ذرات فازی به تعداد 3×10^{11} pfu به سلول های کنترل اضافه گردید پس از یک ساعت نگهداری ذرات فازی که به سلول های کنترل متصل نشده بودند به سلول های پروستات اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ذرات فازی که اتصال ضعیف داشتند طی شستشو با 1% PBS+BSA حذف گردید و فازی های اتصال یافته طی فرایند لیز سلولی با 0.8ml تری اتیل آمین به مدت ۸ دقیقه، و سپس خنثی نمودن آن با 0.8 ml، TRIS /HCL 1M pH= 7.4 استخراج گردید. سپس ذرات فازی تیترو و تکثیر شد. مرحله دوم و سوم و چهارم پنینگ هم به همین ترتیب انجام شد.

آزمون پلی کلونال فازی الیزا

جهت بررسی روند غنی سازی، تعداد ۲۰ هزار از سلول های LNCAP در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. روز بعد پس از بلاک نمودن، ذرات فازی مراحل مختلف پنینگ به تعداد یکسان (10^{11} Pfu) به هر چاهک افزوده گردید. سپس آنتی بادی Anti-M13 متصل به HRP اضافه و در نهایت با افزودن TMB و متوقف نمودن واکنش با اسیدسولفوریک ۱۲ نرمال واکنش متوقف و با دستگاه الیزا ریدر جذب در ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

این مطالعه بر پایه ی تحقیقات آزمایشگاهی و مطالعات بیوانفورماتیک می باشد. در مرحله اول توسط تحقیقات آزمایشگاهی فازی های که قابلیت اتصال اختصاصی به سلول های سرطانی پروستات را دارند، غنی سازی و در مرحله ی بعد با مطالعات بیوانفورماتیک بررسی شدند.

کتابخانه نمایش فازی (ph.d 7 peptide library) و

سویه باکتریایی ER2738

کتابخانه نمایش فازی پپتیدی (Ph.D.-7 phage display peptide library) از شرکت (USA) New England BioLabs خریداری شد. این کتابخانه از ناقل فازی M13KE ساخته شده است. توالی های پپتیدی تصادفی هفت اسیدآمینه ای که در انتهای آمین پروتئین پوششی pIII کلون شده اند پس از بیان در سطح فازی نمایش داده می شوند. کتابخانه هایی که با استفاده از فازی M13KE ساخته شده اند، پنج ظرفیتی می باشند و هر پنج نسخه پروتئین III موجود در یک ویرون فازی بالغ، پپتید کلون شده را در سطح خود نمایش می دهند. تنوع ذرات فازی در این کتابخانه حدود 10^9 ذره ی فازی با پپتید های متفاوت می باشد. از غربالگری این کتابخانه نمایش فازی جهت جداسازی پپتیدهای با قابلیت اتصال اختصاصی به سلول های سرطانی پروستات LNCAP استفاده شد. سویه باکتریایی که به عنوان میزبان جهت تکثیر فازی های کتابخانه در مراحل مختلف تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، ER2738 بود. این سویه از باکتری *E. coli*، دارای پیلوس جنسی (F^+) بوده و از سرعت رشد بسیار بالایی برخوردار است. (۱۷)

کشت رده های سلولی

رده های سلولی 5637 (آدنوکارسینوما ی مثانه)، AGS (آدنوکارسینوما ی معده)، SW480 (آدنوکارسینوما ی کلون)، HUH7 (کارسینوما ی کبد) و Fibroblast به عنوان سلول های کنترل و LNCAP (آدنوکارسینوما ی پروستات) به عنوان سلول هدف از بانک سلولی انیستیتو پاستور (تهران- ایران) خریداری شد. سلول ها در محیط کشت RPMI و DMEM حاوی ده درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) و یک درصد آنتی بیوتیکپنی سیلین - استرپتومایسین (PenSterp) و در شرایط انکوباسیون ۳۷ درجه ی سلسیوس و CO_2 ۵ درصد رشد

تکثیر و استخراج فاز:

اختصاصی ژن PIII فاز M13 انجام گرفت. بدین منظور توالی رونوشت ژن مورد نظر از پایگاه اینترنتی NCBI دریافت و آغازگرهای الیگونوکلوئوتیدی مستقیم (forward primer) و معکوس (reverse primer) توسط نرم افزار primer express 3 و Oilgo v.7 طراحی شد. توالی آغازگر مستقیم '5'-TTTAGTCCTCAAAGCCTCTG-3' و توالی آغازگر معکوس '5'-CAAGCCCAATAGGAACCC-3' می باشد. واکنش PCR در ۳۵ چرخه انجام شد و مراحل دمایی و زمانی برای واسرشتگی اولیه، واسرشتگی و اتصال پرایمرها و گسترش به ترتیب ۹۵ درجه سلسیوس ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه و ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه بهینه شد. کارایی تکثیر با ژل الکتروفورز بررسی شد. محصول PCR با استفاده از کیت استخراج از ژل (AITbiotech, GeneAll[®] DNA Purification) خالص سازی شد. برای تخلیص پس از برش باند های مورد نظر قطعات DNA از ژل آگارز ۱ درصد داخل یک میکروتیوب ۱/۵ قرار داده شدند و طبق دستور کیت با افزودن ۳ برابر وزن ژل بریده شده بافر GB اضافه شد و تا حل شدن ژل در دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد سپس نمونه ی ذوب شده روی ستون منتقل شده و به مدت یک دقیقه با دور 12000 rpm سانتریفوژ گردید. بعد از دور ریختن محلول زیر ستون ۷۰۰ میکرولیتر بافر NW اضافه و مجدداً سانتریفوژ گردید با انتقال ستون به میکروتیوب جدید و افزودن ۵۰ میکرولیتر بافر EB و پس از یک دقیقه سانتریفوژ محصول تکثیر ژن تخلیص شده به دست آمد که کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با نانودراپ و ژل آگارز بررسی شد. و نمونه ها برای تعیین توالی به شرکت (Bioneer, South Korea) فرستاده شدند.

آنالیز توالی های پپتیدی:

توالی های نوکلئوتیدی حاصل از تعیین توالی توسط نرم افزار آنالیز Emboss-Transseq به توالی پپتیدی ترجمه شدند. پپتید های بدست آمده با نرم افزار clustal W برای بررسی درصد هم ردیفی و همولوژی پپتید ها بررسی شدند. همچنین از پایگاه اطلاعاتی SAROTUP (-Scanner and Reporter of Target- Unrelated Peptides) به آدرس <http://immunet.cn/sarotup> که حاوی مجموعه ای از نرم افزارهای اختصاصی جهت بررسی توالی های جدا شده از کتابخانه های نمایش فاز پپتیدی می باشد،

کشت شبانه ی باکتری ER2738 به نسبت ۱ به ۱۰۰ در محیط کشت LB رقیق گردید، سپس به ازای هر پلاک ۳ میلی لیتر از محیط رقیق شده در تیوب جدید ریخته شد بعد با تیپ استریل از پلاک های آبی رنگ نمونه ای با دقت برداشته و هر کدام را در یک تیوب جداگانه ریخته شد و به مدت ۴/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه و با شیکر انکوبه نمودیم. بعد در دور 18000g به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ نمودیم. ۵۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت را به تیوب های جدید منتقل شد و به هر تیوب ۲۰۰ میکرولیتر 20% PEG/2.5M NaCl اضافه نمودیم و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه نمودیم. در مرحله بعد با ۱۰ دقیقه سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس و دور 18000 g ذرات فاز را رسوب داده شد. مجدداً سانتریفوژ نمودیم و سوپرناتانت را دور ریخته شد. رسوب را در ۱۰۰ میکرولیتر TBS بافر حل گردید. این رسوب حاوی ذرات فاز است که برای مراحل بعد (تیتراسیون و تعیین توالی) استفاده شد.

تیتراسیون فازها:

برای تعیین تیتراژ، برای تخمین اولیه ای از تعداد فازهای تکثیر یافته را در محیط کشت LB به صورت سریالی رقیق نمودیم و هر رقت فاز را به ۲۰۰ میکرولیتر باکتری ER2738 با OD مناسب در هر تیوب جداگانه اضافه نمودیم و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمودیم تا باکتری ها با فازها آلوده شوند. پس از آن با افزودن ۲ میلی لیتر TOP آگاری که از قبل در ماکروویو ذوب شده بودو دمای آن تقریباً ۴۵ درجه سلسیوس بود مخلوط و روی پلیت های LB آگار حاوی آنتی بیوتیک تتراسیکلین و IPTG/XGAL که یک ساعت قبل از تیتراسیون در انکوباتور گرم شده بودند به طور یکنواخت پخش نمودیم. تیتراژ محلول فاز با شمارش پلاک های آبی بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون مشخص گردید.

تکثیر DNA فاز، استخراج DNA از ژل و تعیین

توالی:

محصول فاز بدست آمده در مرحله بالا به عنوان الگو برای تکثیر ژن PIII فاز که توالی پپتیدی در ناحیه N-ترمینال این ژن کلون شده است مورد استفاده قرار گرفت واکنش پلیمرز زنجیره ای با استفاده از MASTER MIX و آغازگرهای

جهت بررسی و تعیین برخی ویژگی های توالیهای پپتیدی متصل شونده به سلول LNCAP استفاده گردید.

جدول ۱ تعداد فازها را در هر مرحله از بیوپنینگ نشان می دهد.

تعداد فازها بعد از بیوپنینگ (pfu)	تعداد فازها قبل از بیوپنینگ (pfu)
۵×۱۰ ^۵	مرحله اول ۱×۱۰ ^{۱۱}
۲×۱۰ ^۵	مرحله دوم ۱×۱۰ ^{۱۱}
۱/۵×۱۰ ^۷	مرحله سوم ۱×۱۰ ^{۱۱}
۱/۶×۱۰ ^۶	مرحله چهارم ۱×۱۰ ^{۱۱}

بیوپنینگ برای جداسازی فاز های با اتصال اختصاصی به سلول LNCAP و ارزیابی موفقیت غنی سازی

مرحله ی غنی سازی با استفاده از روش نمایش فازای انجام شد به همین منظور از کتابخانه ی فازای ۷ پپتیدی استفاده شد. برای جداسازی فاز های با اتصال اختصاصی به سلول های سرطانی پروستات از سلول های HUH7، AGS، SW480، 5637 و سلول های نرمال فیبروبلاست انسانی به عنوان کنترل و برای حذف فازهای غیر اختصاصی استفاده شد. در هر مرحله از بیوپنینگ کتابخانه ی فازای با تیتراژ 10¹¹ Pfu/ml به این سلول ها اضافه و ذرات فازای که به سلول های کنترل متصل نشدند را بازیابی و به سلول های LNCAP اضافه نمودیم.

جدول ۲: توالی پپتید های جداسازی شده طی فرایند بیوپنینگ و فراوانی آنها

درصد فراوانی	فراوانی	توالی اسید آمینه ای پپتید	کلون فازای
۲۶%	۷	NERALTL	L3-1, L3-6, L3-13, L3-16, L3-17, L3-24, L3-26
۷/۵%	۲	SPSTHWK	L3-19, L3-25
۷/۵%	۲	STFTSRV	L3-11, L3-27
۳/۱%	۱	ASYIQYY	L3-14
۳/۱%	۱	DEHIRRH	L3-15
۳/۱%	۱	WSTTNVP	L3-18
۳/۱%	۱	GHFNLPP	L3-21
۳/۱%	۱	SHHSQGT	L3-22
۳/۱%	۱	WSVTSAA	L3-2
۳/۱%	۱	ANYARYG	L3-3
۳/۱%	۱	HWIPRTQ	L3-4
۳/۱%	۱	HIGTIYL	L3-5
۳/۱%	۱	YNMGTVT	L3-7
۳/۱%	۱	KCCMINY	L3-8
۳/۱%	۱	ALHNRVN	L3-9
3.1%	۱	VSASDRY	L3-10
۳/۱%	۱	TVHSRMK	L3-28
۳/۱%	۱	HAMRAQP	L3-12
۳/۱%	۱	TTKALLP	L3-29

مرحله ی غنی سازی با استفاده از روش نمایش فازای انجام شد به همین منظور از کتابخانه ی فازای ۷ پپتیدی استفاده شد. برای جداسازی فازهای با اتصال اختصاصی به سلول های سرطانی

یافته ها

بیوپنینگ برای جداسازی فاز های با اتصال اختصاصی به سلول LNCAP و ارزیابی موفقیت غنی سازی

داشتن بیشترین شدت جذب برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند.

تکثیر DNA فازّی و تعیین توالی

کلون های فازّی غنی سازی شده می توانند از طریق تعیین توالی شناسایی شوند فازّی های بازیابی شده در مرحله ی سوم بیوپنینگ به باکتری ER2738 وارد شده و بر روی پلیت های IPTG/XGAL/Tet کشت داده شدند ۳۰ پلاک آبی رنگ از پلیت های که کمتر از ۱۸ ساعت در انکوباتور کشت داده شده بودند و حداکثر دارای حدود ۱۰۰ پلاک جدا از هم بودند انتخاب نمودیم. باید دقت شود که فقط پلاک های آبی رنگی که کاملاً مجزا هستند برداشته شود، تا هر پلاک فقط نشان دهنده ی یک مولکول DNA باشد. از پلاک های انتخاب شده به عنوان الگو برای واکنش زنجیره ای پلی مرازی و همچنین تهیه ی استوک استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلی مرازی با پرایمر های طراحی شده برای ژن PIII فازّی M13 انجام شد. قطعه ی ۵۵۰ نوکلئوتیدی حاوی ژن پوششی شماره ۳ فازّی و ۲۱ نوکلئوتید کلون شده در آن تکثیر شد. نتیجه ی تکثیر ژن روی ژل آگارز بررسی شد. (شکل ۱) پس از استخراج از ژل با استفاده از کیت Gene All نمونه ها برای تعیین توالی به شرکت Bioneer فرستاده شدند.

بررسی توالی های پپتیدی حاصل از تعیین توالی با

استفاده از روش های بیوانفورماتیکی

آنالیز های بیوانفورماتیکی همگام با روش های آزمایشگاهی در تکنولوژی نمایش فازّی برای شناسایی پپتید های اختصاصی به کار می رود با استفاده از روش های بیوانفورماتیکی موتیف های مشترک در پپتید های جداسازی شده شناسایی می گردد همچنین همولوژی بین پپتید های جدا شده با توالی های پروتئینی موجود در پایگاه های اطلاعاتی بررسی می گردد که در نهایت می تواند صحت پپتید های جدا شده در آزمایشگاه را تایید نماید. به همین منظور توالی های نوکلئوتیدی حاصل از تعیین توالی توسط پایگاه اطلاعاتی ExPASy به توالی آمینواسیدی ترجمه شد. توالی های پپتیدی بدست آمده در جدول ۳ قابل مشاهده می باشند. در این جدول توالی پپتیدی و فراوانی هر یک از کلون ها نشان داده شده است. همانطور که قابل ملاحظه است غنی سازی روی سلول های LNCAP و کنترل و تعیین توالی ۲۷ پلاک منجر به جداسازی ۱۹ نوع توالی پپتیدی شده است توالی

پروستات از سلول های HUH7، AGS، SW480، 5637 و سلول های نرمال فیبروبلاست انسانی به عنوان کنترل و برای حذف فازّی های غیر اختصاصی استفاده شد. در هر مرحله از بیوپنینگ کتابخانه ی فازّی با تیتراژ 10^{11} Pfu/ml به این سلول ها اضافه و ذرات فازّی که به سلول های کنترل متصل نشدند را بازیابی و به سلول های LNCAP اضافه نمودیم. در مرحله بعد ذرات فازّی که به سلول های سرطانی پروستات به طور اختصاصی اتصال یافته بودند طی مراحل متعدد شستشو و سپس رها سازی مکرر جداسازی نمودیم. با استفاده از سویه باکتریایی ER2738 فازّی های جداسازی شده برای مرحله بعدی بیوپنینگ تکثیر شدند. برای یافتن بهترین کلونی ۴ بار پنینگ را تکرار نمودیم و در هر تکرار برای افزایش اختصاصیت، افزایش سختی شرایط غنی سازی صورت گرفت. این امر موجب می شود که فازّی های دارای میل ترکیبی بالاتر برای اتصال به سلول های LNCAP باقی بمانند و تعدادشان نسبت به فازّی های با اتصال سست تر و میل ترکیبی کمتر که طی شستشو حذف می شوند، افزایش یابد. برای ارزیابی چگونگی بیوپنینگ پس از هر مرحله تعداد ذرات فازّی قبل و بعد از پنینگ محاسبه شد. افزایش تعداد فازّی بعد از هر مرحله در مقایسه با نتیجه بیوپنینگ قبلی دال بر موفقیت در انجام غنی سازی بود. نسبت فازّی های ورودی و خروجی در هر مرحله از بیوپنینگ جهت تعیین کارایی غنی سازی مورد استفاده قرار گرفت این نسبت ها را جدول ۲ نشان داده شده است.

پلی کلونال فازّی الیزا برای تایید موفقیت آمیز بودن

روند غنی سازی

علاوه بر مقایسه تیتراژها قبل و بعد از بیوپنینگ به منظور بررسی چگونگی روند غنی سازی فازّی الیزا انجام شد. فازّی های جداسازی شده در هر مرحله بیوپنینگ در باکتری ER2738 تکثیر و استخراج شدند و تیتراسیون برای تعیین رقت فازّی انجام شد. سلول های کنترل و LNCAP به تعداد مساوی (۲۰ هزار سلول) در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و فازّی های هر مرحله پنینگ به رقت 10^{11} pfu به صورت جداگانه به همه سلول ها اضافه شد و قابلیت اتصال فازّی های مراحل مختلف پنینگ به سلول های کنترل و LNCAP طی واکنش الیزا بررسی شد، افزایش شدت جذب در سلول های LNCAP در آزمون الیزای انجام شده موفقیت بیوپنینگ بر روی این سلول را تایید نمود، که با نتایج تیتراسیون نیز همخوانی داشت (نمودار ۱). براساس نتایج بدست آمده ذرات فازّی حاصل از مرحله سوم بیوپنینگ به علت

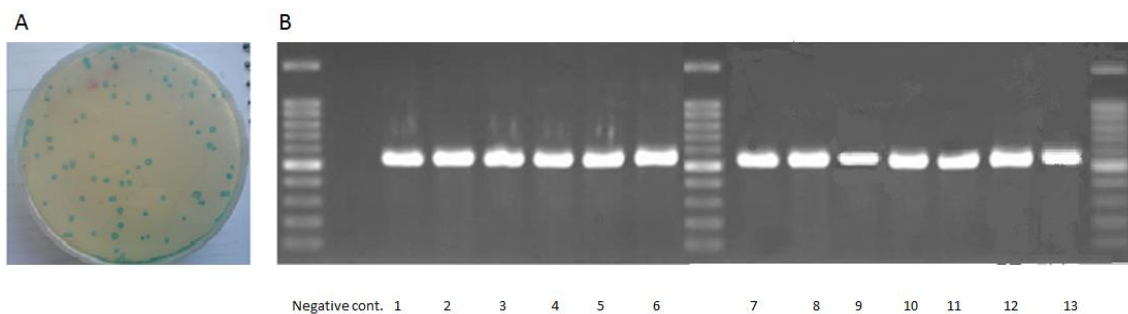
موتیف های HW, RV, RA, H-RM, T-SR, TV از موتیف های تکراری قابل مشاهده هستند. همچنین بررسی درصد و فراوانی هریک از آمینواسیدها که در جدول ۴ نشان داده شده است. بیانگر افزایش تعداد آمینواسیدهای ترئونین، لوسین، سرین، آلانین و آرژینین در پپتیدهای جداسازی شده می باشد که می-تواند خود دلیلی بر میل ترکیبی و اختصاصیت آنها در اتصال به سلول LNCAP باشد.

پپتیدی NERALTL بالاترین فراوانی را دارد و ۷ مرتبه تکرار شده است. توالی های SPSTHWK و STFTSRV نیز به میزان کمتر تکرار شده اند.

در مرحله بعد از نرم افزار clustal w جهت پیدا کردن موتیف های مشترک بین پپتید های بدست آمده استفاده شد. همردیفی پپتید ها چند موتیف اسید آمینه ی مشترک را نشان داد. وجود موتیف های مشترک می تواند بیانگر جداسازی همسانه های فازی با اتصال هدفمند به سلول های پروستات باشد.

جدول ۳. درصد آمینواسیدهای مختلف در موقعیت های مختلف پپتید های تعیین توالی شده و فراوانی کل هر آمینو اسید

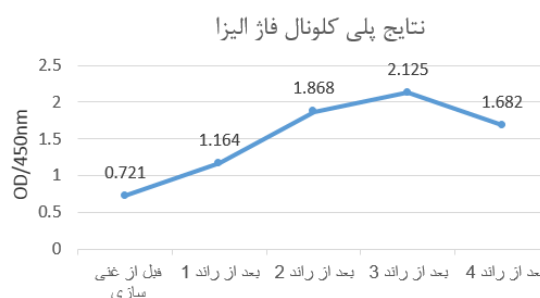
آمینواسید	درصد آمینواسیدها در موقعیت های مختلف پپتید							فراوانی کل
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
Thr	۷/۴۰	۱۱/۱۱	۳/۷۰	۲۵/۹۲	۳/۷۰	۲۹/۶۲	۷/۴۰	۱۲/۶۹
Leu	۰	۳/۷۰	۰	۰	۳۷/۰۷	۳/۷۰	۲۹/۶۲	۱۰/۰۵
Ser	۱۸/۵۱	۱۴/۸۱	۷/۴۰	۱۱/۱۱	۱۱/۱۱	۰	۰	۸/۹۹
Ala	۱۱/۱۱	۳/۷۰	۳/۷۰	۳۳/۳۳	۳/۷۰	۳/۷۰	۳/۷۰	۸/۹۹
Arg	۰	۰	۲۵/۹۲	۳/۷۰	۱۸/۵۱	۱۴/۸۱	۰	۸/۹۹
Asn	۲۵/۹۲	۷/۴۰	۰	۷/۴۰	۱۱/۱۱	۳/۷۰	۳/۷۰	۷/۴۰
His	۱۱/۱۱	۷/۴۰	۷/۴۰	۱۴/۸۱	۰	۰	۳/۷۰	۶/۳۴
Tyr	۳/۷۰	۰	۲/۲۷	۰	۰	۱۱/۱۱	۱۱/۱۱	۴/۷۶
Glu	۰	۲۹/۶۲	۰	۰	۰	۰	۰	۴/۲۳
Pro	۰	۷/۴۰	۰	۳/۷۰	۰	۳/۷۰	۱۴/۸۱	۴/۲۳
Val	۳/۷۰	۳/۷۰	۳/۷۰	۰	۰	۱۱/۱۱	۷/۴۰	۴/۲۳
Ile	۰	۳/۷۰	۳/۷۰	۷/۴۰	۷/۴۰	۰	۰	۳/۱۷
Lys	۳/۷۰	۰	۳/۷۰	۰	۰	۰	۱۱/۱۱	۲/۶۴
Gly	3.7	۰	۳/۷۰	۳/۷۰	۰	۳/۷۰	۳/۷۰	۲/۶۴
Trp	۷/۴۰	۳/۷۰	۰	۰	۰	۷/۴۰	۰	۲/۶۴
Gln	۰	۰	۰	۰	۷/۴۰	۳/۷۰	۳/۷۰	۲/۱۱
Met	۰	۰	۳/۷۰	۳/۷۰	۰	۳/۷۰	۰	۲/۱۱
Phe	۰	۷/۴۰	۳/۷۰	۰	۰	۰	۰	۱/۵۸
Cys	۰	۳/۷۰	۳/۷۰	۰	۰	۳/۷۰	۰	۱/۰۵
Asp	۳/۷۰	۰	۰	۰	۳/۷۰	۰	۰	۱/۰۵



شکل ۱: A پلاکهای آبی حاصل از تعیین تیتراژ محلول فاز بی به دست آمده از دور آخر بیوپنینگ بر روی پلیت حاوی IPTG-Xgal. را نشان می دهد. B. الکتروفورز باند 550 bp حاصل از تکثیر قسمتی از ژنوم فاز M13KE حاوی توالی نوکلئوتیدی پپتید نمایش یافته روی سطح فاز بر روی ژل آگارز یک درصد. اعداد نشان داده شده در شکل نمایانگر شماره پلاکهای فاز تکثیر شده می باشد. DNA مارکر مورد استفاده Ladder 100 bp می باشد.

بالینی مناسب می باشند می توان به carcinoembryonic antigen (CEA) و vascular endothelial growth factor (VEGF) اشاره کرد (۴). مارکرهای توموری که در سطح سلول های سرطانی بیان می گردند، گزینه های بهتر و کارآمدتری جهت استفاده به عنوان اهداف بیوپنینگ برای جداسازی پپتیدهای اختصاصی می باشند. پپتیدهایی که به این پروتئینهای سطحی متصل می گردند، این قابلیت را دارا می باشند که بتوان از آن ها جهت تشخیص سلول های سرطانی و نیز انتقال هدفمند دارو و ژن استفاده نمود. بنابراین شناسایی پپتیدهای اختصاصی متصل شونده به پروتئینهای سطحی سلول های سرطانی افق دید وسیعتری را در زمینه درمان هدفمند (Targeted therapy) و ژن درمانی در پیش روی ما می گشاید. در سال های اخیر، کاربرد کتابخانه های نمایش فاز (Phage display libraries) نقش بسیار مهمی در گسترش کاربرد تکنیک نمایش فاز داشته است. غربالگری این کتابخانه ها تحت شرایط مناسب، موجب شناسایی لیگاندهای جدید سنتتیک به صورت پپتید یا قطعات آنتی بادی می گردد که قابلیت اتصال اختصاصی به رسپتورهای سطح سلولی را دارا می باشند. این لیگاندها دارای ویژگیهای مطلوبی همچون میل ترکیبی بالا برای اتصال به رسپتورهای سطح سلولی، اختصاصیت، قابلیت وارد کردن فاز به درون سلول و ... می باشند. این امر منجر به افزایش قابل توجه تعداد مولکولهای هدفمند کننده که در سال های اخیر شناسایی شده اند، گردیده است (۲۰). حضور این لیگاندهای هدفمند کننده در سطح نانوذرات فاز، اختصاصیت و کارایی انتقال فاز به داخل سلولها را به میزان بسیار زیادی افزایش می دهد.

تاکنون در مطالعات متعددی از غربالگری کتابخانه های نمایش فاز پپتیدی جهت جداسازی و شناسایی پپتیدهای



نمودار ۱ بیانگر شدت جذب نوری حاصل از آزمون الیزای انجام شده برای هر کدام از مراحل مختلف پنینگ می باشد. و نشان دهنده ی چگونگی روند غنی سازی می باشد.

بحث

تکنیک نمایش فاز (Phage display) ابزار مولکولی بسیار قدرتمندی است که جهت شناسایی لیگاندهای اختصاصی، مورد استفاده قرار می گیرد. این تکنیک این امکان را فراهم می آورد که بتوان توالیهای پپتیدی بسیار متنوعی را در سطح فاز نمایش داد و بدین ترتیب کتابخانه های پپتیدی را ساخت (۱۸). این گونه از کتابخانه های فاز پپتیدی (libraries Phage display peptide) واجد پپتیدهای بسیار متنوعی بوده و می توان پپتیدهایی را که واجد قابلیت اتصال اختصاصی به یک هدف خاص باشند، از آن ها جدا نمود. این هدف می تواند پروتئین، آنزیم، سلول، بافت و ... باشد (۱۹).

در سلول های سرطانی پروتئینهای مختلفی وجود دارند که بیان برخی از آن ها در حالتی که سلول سرطانی می گردد، افزایش می یابد و از آن ها می توان به عنوان مارکرهای سرطان نام برد (۲). اما تنها برخی از این پروتئینها قابلیت های بالینی لازم جهت استفاده به عنوان مارکر توموری (tumor marker) را دارا می باشند. از جمله مهمترین این مارکرها که جهت کاربردهای

اختصاصی سلول های سرطانی مختلف از جمله سرطان مثانه (۲۱) و سرطان کلون (۲۲) شش (۲۳) گلیوبلاستوما (۲۴) و... استفاده شده است.

در مطالعه ای، Lee و همکارانش با استفاده از بیوپنینگ کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی و جداسازی و بازیابی فاژهای اختصاصی سرطان مثانه، از رده های سلولی سرطان مثانه و تعیین اختصاصیت اتصال نانوذرات فاژی به صورت *invivo* و *invitro* از این نانوذرات هدف گیری کننده، برای تشخیص سرطان مثانه در نمونه های ادراری افراد استفاده نمودند (۲۱). Zhang و همکارانش با غربالگری کتابخانه ی فاژی پپتیدی هفت آمینواسیدی بر روی سلول های سرطانی کولون موفق به شناسایی پپتیدی به نام cp15 شدند که قادر به اتصال اختصاصی به سلولهای SW480 و HT29 بود (۲۵). در مطالعه ی دیگری Romanov و همکارانش کلون فاژی pg35 را از غربالگری کتابخانه ی فاژی هشت پپتیدی به عنوان لیگاند پپتیدی اختصاصی برای سلول های c4-2 و c4-2b به عنوان سلول های سرطانی پروستات بدست آوردند. (۱) با توجه به پیچیدگی های گسترده سطح سلول های سرطانی و تغییرات سریع مولکول های سطحی این سلول ها و از طرفی ویژگی تکنولوژی نمایش فاژی در شناسایی دومین ها و موتیف های مختلف باید مطالعات گسترده ای برای شناسایی این تفاوت های سطحی توسط محققین صورت پذیرد.

در این تحقیق جداسازی نانو ذرات فاژی اختصاصی برای سلول های سرطانی پروستات LNCAP با استفاده از کتابخانه ی فاژی Ph.D7 peptide انجام شد. در این مطالعه بیوپنینگ منفی و مثبت همزمان و به تعداد مساوی به ترتیب روی سلول های کنترل و هدف انجام شد. این شیوه ی بیوپنینگ که در آن همزمان غربالگری مثبت و منفی انجام می شود موجب افزایش فشار انتخابی و در نتیجه افزایش اختصاصیت پپتید های جدا شده نسبت به هدف مورد نظر می شود. یکی از اهداف جداسازی پپتیدهای اختصاصی طی فرایند بیوپنینگ استفاده از آنها برای رسانش هدفمند عوامل درمانی به سلول های سرطانی می باشد. بنابراین پپتیدهای جدا شده باید قابلیت اتصال اختصاصی به سلول های سرطانی را داشته باشند و سلول های نرمال بدن متصل نشوند تا اثرات جانبی داروها که از معضلات درمان های موجود برای سرطان است کاهش یابد. بر همین اساس در این

تحقیق با انجام بیوپنینگ منفی روی سلول های کنترل پپتیدهای را که قابلیت اتصال به سلول های دیگری غیر از تومور پروستات را داشتند حتی الامکان حذف نمودیم. به همین منظور از رده ی سلولی 5637 به عنوان سلول سرطانی مثانه برای حذف پپتیدهای با قابلیت اتصال به سلول های مجاری ادراری که مرتبط با پروستات می باشد استفاده شد و از سلول HUH7 به عنوان سلول کبدی برای حذف ذرات فاژی با قابلیت اتصال به سلول های کبدی انتخاب شد چون پیش از این گزارش شده است که بافت کبدی تمایل به جذب غیر اختصاصی فاژها در *invivo* دارد (۲۶). از سلول های فیروبلست نیز به عنوان سلول نرمال و نماینده ی سلول های با ویژگی های سطحی سلول های طبیعی بدن به عنوان کنترل استفاده شد. در مجموع سعی شد با انتخاب رده های سلولی مناسب احتمال جداسازی پپتیدهای با اتصال اختصاصی به سلول های LNCAP را افزایش دهیم. اگرچه بهترین شاهد و کنترل در این قبیل مطالعات وجود سلول های نرمال بافت مورد نظر است اما به علت عدم دسترسی به سلول نرمال پروستات سعی شد با انتخاب طیف گسترده ای از رده های سلولی مختلف اختصاصیت ذرات فاژی برای اتصال به سلول های پروستات را افزایش دهیم.

یکی از مشکلات کتابخانه های فاژی پپتیدی جداسازی و انتخاب پپتید های مثبت کاذب است که به این پپتیدها، پپتیدهای غیر مرتبط با هدف یا Target Unrelated Peptide (TUP) گفته می شود، که به دلایلی غیر از اتصال اختصاصی به عامل هدف جداسازی می شوند (۲۷). بنابراین شناسایی توالی های TUP امری مهم محسوب می شود. به همین منظور بررسی توالی های پپتیدی حاصل از این تحقیق با استفاده از نرم افزار TUPscan در پایگاه اطلاعاتی SAROTUP و مطالعات آزمایشگاهی بیشتر ضروری به نظر می رسد. جداسازی این پپتیدها می تواند به علت میل ترکیبی بالا و اختصاصیت آنها در اتصال به سلول های LNCAP و یا سرعت تکثیر، بیشتر باشد.

در نهایت با انجام آزمایشات بیشتر، از ذرات فاژی جداسازی شده در این تحقیق می توان به عنوان لیگاند هدف گیری کننده برای شناسایی سلول های سرطانی پروستات در آینده استفاده نمود. همچنین تحقیقات بیشتر در این زمینه برای بررسی ورود این ذرات به داخل سلول های LNCAP می تواند قابلیت استفاده از این ذرات فاژی برای انتقال دارو یا ژنهای سرکوبگر تومور به داخل توده ی توموری را مورد بررسی قرار دهد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بر خود لازم می دانند از همکاری و زحمات تمام کسانی که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی نمایند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

References

- Romanov VI, Durand DB, Petrenko VA. Phage display selection of peptides that affect prostate carcinoma cells attachment and invasion. *Prostate*. 2001;47(4):239-51.
- Truong LD, Kadmon D, McCune BK, Flanders KC, Scardino PT, Thompson TC. Association of transforming growth factor-beta with prostate cancer: An immunochemical study. *Hum Pathol* 1993; 24:4-9.
- Fudge K, Bostwick DG, Steams ME. Platelet-derived growth factor A and B chains and the alpha and beta receptors in prostatic intraepithelial neoplasm. *Prostate* 1996; 29(5):282-286.
- Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP and et al. Angiogenesis and prostate cancer: In vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology* 1998; 51(1):161-167.
- Mohagheghi MA, Mosavi-Jarrahi A, Malekzadeh R, Parkin M. Cancer incidence in Tehran metropolis: the first report from the Tehran Population-based Cancer Registry, 1998–2001. *Arch Iran Med* 2009; 12(1):15-23.
- Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3PCA3 RNA Analysis in Urine—A New Perspective for Detecting Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2004;46(2):182-187.
- Fradet Y, Saad F, Aprikian A, et al. uPM3, a New Molecular Urine Test for the Detection of Prostate Cancer. *Urology*. 2004; 64(2):311-316.
- Landon, LA., Zou J, and S.L. Deutscher SL. Is phage display technology on target for developing peptide-based cancer drugs? *Curr Drug Discov Technol*, 2004; 1(2): 113-32.
- Jain RK. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nat Med* 1998; 4(6):655 – 7.
- Poul MA, Marks JD. Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous phage. *J Mol Biol*. 1999; 288(2):203–211.
- Cwirla SE, Peters EA, Barrett, RW, and Dower WJ: Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Nat Acad Sci* 1990; 87 (16): 6378-6382.
- Smith GP: Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228(4705):1315-1317.
- Smith GP, Schultz DA, Ladbury JE. A ribonuclease S-peptide antagonist discovered with a bacteriophage display library. *Gene* 1993; 128(1):37-42.
- Brown, KC. Peptidic tumor targeting agents: the road from phage display peptide selections to clinical applications. *Curr Pharm Des*, 2010; 16 (9):1040-54.
- Minenkova O, Pucci A, Pavoni E, De Tomassi A, Fortugno P, Gargano N, Cianfriglia M and et al. Identification of tumor-associated antigens by screening phage displayed human cDNA libraries with sera from tumor patients. *Int J Cancer* 2003; 106(4):534-544.
- Ruoslahti E, Rajotte D. An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18(1):813-827.
- Ph.D.TM-7 Phage Display Peptide Library Instruction Manual at www.neb.com/products/e8102-phd-7-phage-display-peptide-library. New England Biolabs
- Isaaks WB, Carter BS, CM E. Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Cancer Res* 1991; 51(17):4716-4720.
- Kevin JH, Richard GV, Hardev SP. *Viral Therapy of Cancer* Wiley online library, Ltd 2008.
- Monaci P, Bartoli F, Di Zenzo G, Nuzzo M, Urbanelli L. Random peptide libraries for target definition. *Tumour Targeting* 1999; 4(3):129-14.
- Lee SM, Lee EJ, Hong HY, Kwon MK, Kwon TH and et al. Targeting bladder tumor cells in vivo and invitro in the urine with a peptide identified by phage display. *Mol Cancer res* 2007; 5(1):11-9.

22. Kelly kA and David JA. Isolation of a colon tumor specific binding peptide using phage display selection. *Neoplasia*. 2003;5(5):437-444.
23. Lee TY, Lin CT, Kou SZ, et al. Peptid- mediated targeting to tumor blood vessels of lung cancer for drug delivery. *Cancer research*. 2007; 67(12):10958-10965.
24. Zhang J, Spring H, Schwab M, Zhao J. Neuroblastoma tumor cell- binding peptides identified through random peptide phage display. *Cancer Letters*.: 2001;171(2): 153-164.
25. Zhang Y, Chen J, Hu Z and et al. Panning and identification of a colon tumor binding from a phage display peptide library. *JBiomol Screen*. 2007; 12(3):429-435.
26. Aina OH, Sroka TC, Chen ML Lam KS. Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers*, 2002; **66**(3):184-99.
27. Ru B, Thoen PA, Nie F, Guo FB, Huang J. PhD7Faster: predicting clones propagating faster from the Ph.D.-7 phage display peptide library. *J Bioinform Comput Biol*. 2014;12(1): 1450005.

