Archive of SID

کومش- جلد ۲۱، شماره ٤ (پیاپی ۷۶)، پائیز ۱۳۹۸

ساخت سویه بیانی *پیکیا پاستوریس* مولد قطعه‌ی تک‌زنجیره‌ای ناحیه‌ی متغیر آنتی‌بادی علیه ناحیه خارج سلولی EpCAM

فاطمه محمدقلیزاد (Pharm.D Student)، عطیه هاشمی *(Ph.D)

بخش بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۸۸۲۰۰۰۶۷-۰۲۱ at_hashemi@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۳

چکیده

هدف: مولکول چسباننده سلول‌های اپیتلیال (EpCAM) در سطح سلول‌های توموری اپیتلیال به طور فزاینده‌ای بیان می‌شود. بنابراین EpCAM یک آنتی‌ژن با ارزش در درمان هدفمند محسوب می‌شود. استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال رویکردی جذاب در درمان هدفمند سرطان است. محدودیت‌های آنتی‌بادی‌های منوکلونال نظیر اندازه‌ی بزرگ منجر به توسعه قطعات تک‌زنجیره‌ای ناحیه متغیر آنتی‌بادی (scfv) شد. *پیکیا پاستوریس* به علت انجام فرایندهای پس از ترجمه و قیمت ارزان به عنوان میزبانی مناسب در بیان پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس بالا مورد توجه است. در این مطالعه، *پیکیا پاستوریس* بیان‌کننده scfv علیه قسمت خارج سلولی EpCAM (EpEX) ساخته شد.

مواد و روش‌ها: ژن بهینه شده‌ی کدونی مولد پروتئین anti-EpEX-scfv در سایت‌های آنزیمی *XhoI* و *XbaI* وکتور pPICZαB وارد شد. صحت سازه نوترکیب به کمک توالی‌یابی و آنالیز آنزیمی تأیید شد. سازه نوترکیب با کمک الکتروپوراسیون در سویه GS115 وارد شد. کلون‌های مثبت با کمک PCR و با به‌کارگیری سه جفت پرایمر ارزیابی شدند.

یافته‌ها: صحت سازه نوترکیب با استفاده از آنزیم‌های *HindIII* و *BamHI* (باندهای ۲۷۸۸ و ۱۵۳۷ جفت باز) هم‌چنین *XhoI* و *XbaI* (باندهای ۳۵۰۶ و ۸۱۹ جفت باز) تأیید شد. کلون‌های نوترکیب با کمک PCR با مشاهده دو باند (۲۲۰۰ و ۱۳۲۱ جفت باز) زمانی‌که دو پرایمر AOX استفاده شد، هم‌چنین یک باند (۹۶۸ جفت باز) زمانی‌که پرایمر AOX و پرایمر اختصاصی ژن استفاده شد، تأیید شد. هنگامی‌که دو پرایمر اختصاصی ژن به‌کار گرفته شد، یک باند (۷۵۱ جفت باز) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها ساخت سویه مهندسی شده را تأیید می‌کند. پروتئین anti-EpEX-scfv می‌تواند انتخابی مناسب در زمینه‌ی ایمنی‌درمانی سرطان باشد.

واژه‌های کلیدی: *پیکیا پاستوریس*، anti-EpEX-scfv، آنتی‌بادی منوکلونال، EpCAM، ایمنی درمانی سرطان

مقدمه

مولکول چسباننده‌ی سلول‌های اپیتلیال (EpCAM) یک گلیکوپروتئین تراغشایی تیپ یک به وزن ۴۲-۳۹ کیلودالتون می‌باشد که در سطح سلول‌های اپیتلیال به جز هپاتوسیت‌ها و کراتینوسیت‌ها بیان می‌شود [۱] و منجر به اتصالات هموفیلیکی سلول به سلول غیر وابسته به کلسیم می‌شود [۲]. EpCAM به لحاظ ساختاری شامل یک دومین خارج سلولی (EpEX)، یک دومین بین غشایی و نیز یک دومین داخل سلول (EpICD) می‌باشد [۳].

در سال‌های اخیر درمان سرطان از حالت مرسوم و رایج که با داروهایی با خاصیت سلول‌کشی که به طور غیر اختصاصی سلول‌های عادی را نیز درگیر می‌کرد به سمت درمان هدفمند پیش رفته است. از مزایای این درمان هدفمند می‌توان به مؤثرتر بودن آن و عوارض جانبی پایین‌تر آن اشاره کرد. امروزه آنتی‌بادی‌هایی با ساختار کامل به دلیل معایبی چون ماندگاری بالا در بافت غیر هدف، سیتوتوکسیسیته‌ی بالا به علت کلیرانس پایین، سایز بزرگ و عدم دسترسی به اپی‌توپ‌های پنهان با قطعات نوترکیب آنتی‌بادی‌های منوکلونال نظیر قطعه‌ی تک‌زنجیره‌ای ناحیه‌ی متغیر آنتی‌بادی (scfv)جایگزین شده‌اند. این ترکیبات به دلیل عملکرد اختصاصی و میل اتصال بالا جایگزین‌های مناسبی برای آنتی‌بادی‌هایی با ساختار کامل به نظر می‌رسند. scfv از بخش‌های متغیر(Vl,Vh) تشکیل شده است که با یک اتصال‌دهنده‌ی پپتیدی در کنار هم قرار گرفته‌اند [۴]. در خیلی از موارد scfv به دلیل سایز کوچک و کلیرانس بالا از خون و نفوذ به سلول‌های توموری به تنهایی به عنوان عامل هدفمندسازی به‌کار می‌رود [۵]. از آن‌جائی‌که بیان EpCAM در گروهی از سرطان‌ها در مقایسه با سلول‌های طبیعی افزایش می‌یابد، لذا امروزه انواع

www.SID.ir

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 11:48 +0330 on Monday November 11th 2019

Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 11:48 +0330 on Monday November 11th 2019

ایمونوتراپی با هدف قرار دادن EpCAM در تشخیص و درمان مورد توجه قرار گرفته است [۶].

به منظور بیان آنتی‌بادی‌های نوترکیب تاکنون شماری از سیستم‌های بیانی نظیر سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی به کار برده شده‌اند. امروزه اغلب آنتی‌بادی‌های درمانی برای انسان به‌کمک رده‌های سلولی پستانداران ساخته می‌شوند [۷]. این در حالی است که تولید آنتی‌بادی در این دسته از سلول‌ها یک فرایند وقت‌گیر و گران‌قیمت محسوب می‌شود. در این موارد مخمرها به عنوان سیستم‌های بیانی یوکاریوتی گزینه‌ی مناسبی به‌نظر می‌رسند. چرا که این یوکاریوت‌ها برخلاف سیستم‌های بیانی باکتریایی، علاوه بر گلیکوزیلاسیون و تسهیل انجام بسیاری از تغییرات پس از ترجمه‌ی معمول دیگر نظیر تاخوردگی صحیح، تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی، پردازش توالی سیگنالی و نیز پردازش پروتئولیتیک قادرند در محیط کشت ارزان خیلی سریع رشد کنند [۸]. امروزه محققین در مطالعات متعددی مخمرها از جمله *پیکیا پاستوریس* *(Pichia pastoris)* را به عنوان سیستم بیانی جایگزین در تولید قطعات آنتی‌بادی‌های منوکلونال ارزیابی کرده‌اند [۹]. این میزبان یوکاریوتی دارای سیستم بیانی کارایی است که دارای محیط کشت مشخص با هزینه‌های تولیدی پایین می‌باشد. علاوه بر آن به آلودگی محیط و استرس‌های وارده حین تولید نیز حساس نمی‌باشد [۱۰]. در این مطالعه با توجه به کاربردهای متعدد قطعه تک زنجیره‌ای ناحیه متغیر آنتی‌بادی علیه EpEX در تشخیص و درمان و به‌منظور دستیابی به مقادیر بالایی از پروتئین با حلالیت و فعالیت بیولوژیکی مناسب در *پیکیا پاستوریس*، برای نخستین بار حامل بیانی نوترکیب حاوی ژن مولد scfv مشتق شده از کلون D5MOCB4 علیه EpEX ساخته شد. هم‌چنین سویه‌های ترانسفورم شده‌ی *پیکیا پاستوریس* (GS115) با این سازه ایجاد شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آنزیم‌های محدودکننده و لیگاز از Thermo Fisher، کیت استخراج پلاسمید GF-PL-050 از شرکت vivantis، کیت خالص‌سازی پلاسمید high pure PCR product purification kit از شرکت Roche، آنتی‌بیوتیک Zeocine از Invitrogen، PCR product (master mix) از Ampliqon و DNA ladder از شرکت سیناکلون خریداری شد.

سویه‌های میکروبی، پلاسمیدها و محیط کشت. *E. coli* DH5-α (اهدایی دکتر کرامتی) به عنوان میزبان برای دست‌کاری DNA و *پیکیا پاستوریس* سویه GS115 با فنوتیپ Mut مثبت برای مطالعات بیانی انتخاب شدند. وکتور pPICZαB که دارای پروموتور القایی AOX1 *پیکیا پاستوریس* است از بانک ژن انستیتوپاستور ایران تهیه شد. *E. coli* DH5-α در محیط کشت Luria Bertani (LB)(حاوی تریپتون ۱ درصد وزنی–حجمی و عصاره مخمر ۰/۵ درصد و سدیم کلراید ۱ درصد و PH برابر با ۷) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. و نیز محیط کشت LB با درصد نمک پایین (حاوی تریپتون ۱ درصد وزنی–حجمی و عصاره مخمر ۰/۵ درصد و سدیم کلراید ۰/۵ درصد و PHبرابر با ۷/۵) برای کشت انتخابی سویه‌های ترانسفورم شده مقاوم به زئوسین استفاده شد. به‌منظور جداسازی های‌ترانسفرمنت حاوی وکتور بیانی از آنتی‌بیوتیک زئوسین ۲۵µg/ml و آمپی‌سیلین ۱۰۰µg/ml در محیط کشت LB استفاده شد. سویه‌ی مخمر *پیکیا پاستوریس* در محیط YPD (حاوی ۱ درصد وزنی–حجمی عصاره مخمر و ۲ درصد پپتون و ۲ درصد دکستروز) کشت داده شد. در حالی‌که محیط کشت YPDS علاوه بر مقادیر ذکر شده حاوی سوربیتول ۱ مولار نیز بود. پلیت حاوی YPD آگار برای رشد پیکیا پاستوریس سویه GS115 و پلیت YPD آگار حاوی زئوسین (غلظت µg/ml ۲۰۰ یا هر غلظت دلخواه دیگری) در انتخاب سویه‌های ترانسفورم شده‌ی *پیکیا پاستوریس* به‌کار گرفته شد.

ساخت سازه بیانی pPICZαB-anti EpEX- scfv . به‌منظور بیان کامل توالی انتهای آمینی anti EpEX- scfv، در طراحی سازه مربوطه، ژن مولد این پروتئین بلافاصله پس از سایت برشی Kex2 قرار داده شد. هم‌چنین یک قطعه‌ی ژنی مولد دنباله‌ی شش هیستیدینی در انتهای کربوکسیلیک ژن مورد نظر در جهت تسهیل در فرایند خالص‌سازی قرار داده شد [۱۱]. ژن مولد anti EpEX-scfv پس از بهینه‌سازی کدونی توسط شرکت سنتز شد. به‌منظور آماده‌سازی کاست بیانی، قطعه سنتز شده ژنی مولد anti EpEX-scfv از وکتور کلونینگ حد واسط به نام pGH-anti EpEX-scfvتوسط دو آنزیم *XhoI, XbaI* برش داده شد و ژن مولد anti EpEX- scfv در وکتورpPICZαB طوری قرار گرفت تا پروموتر AOX1 در قسمت بالا دست ژن مورد نظر قرار گیرد. سازه نهایی بیانی، pPICZαB-anti EpEX-scfv نام گرفت و به داخل سلول‌های باکتریایی مستعد *E. coli* DH5-α ترنسفورم شد. سپس سویه‌های ترانسفورم شده حامل pPICZαB-anti EpEX-scfvدر محیط کشت LB با غلظت نمک پایین و غلظت زئوسین برابر با ۲۵ µg/mL انتخاب شدند. به‌منظور تأیید حضور ژن مولدanti EpEX-scfv در سازه بیانی pPICZαB-anti EpEX- scfv، وکتور نوترکیب با دو جفت آنزیم (*HindIII* و *BamHI*) هم‌چنین (*XhoI* و XbaI) برش داده شد. هم‌چنین صحت وکتور نوترکیب به‌کمک توالی‌یابی مورد تأیید قرار گرفت. روش عمومی دست‌کاری ژنتیکی بر اساس

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 11:48 +0330 on Monday November 11th 2019

روش‌های استاندارد انجام شد. آنزیم‌های محدودالاثر و لیگاز از شرک(USA) Thermo Fisher Scientific تهیه شدند. ترکیبات شیمیایی از منابع شیمیایی استاندارد نظیر سیگما و مرک تهیه شدند.

ترانسفورماسیون پیکیا پاستوریس و انتخاب کلونی‌های نوترکیب. وکتور خطی شده‌ی pPICZαB–scfv توسط آنزیم *SacI* برای ترانسفورم کردن پیکیا پاستوریس سویه‌ی مستعد GS115طبق پروتکل استفاده شد. بدین ترتیب که سویه‌ی مستعد، با رشد GS115 در محیط YPD مایع و شست و شو با آب سرد و سوربیتول حاصل شد. ۵ میکروگرم از وکتور خطی شده‌pPICZαB–scfv و نیز وکتور مادر که فقط شامل pPICZαBمی‌باشد (به عنوان کنترل منفی) با ۸۰ میکرولیتر سلول‌های مستعد شده، مخلوط شد. سپس جهت الکتروپوراسیون و تکمیل فرایند ترانسفورماسیون از Pulser Xcell (BioRad, Germany) با تنظیمات ۱۵۰۰ ولت و ظرفیت ۲۵ میکروفاراد و مقاومت ۲۰۰ اهم استفاده شد. سپس سویه‌های ترانسفورم شده به مدت ۲–۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت YPDبا غلظت زئوسین ۲۰۰µg/ml انکوبه شد که پس از طی این مدت کلونی‌های ترانسفورم شده ظاهر شدند.

استخراج ژنوم مخمر. به‌منظور استخراج ژنوم مخمر از روش لیتیم استات– سدیم دو دسیل سولفات (LiOAc-SDS) استفاده شد [۱۲]. بدین ترتیب که تک کلون ایجاد شده روی پلیت در ۱۰۰µL محلول حاوی لیتیم استات ۲۰۰ mM و SDS یک درصد وارد شد. پس از ۵ min انکوباسیون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰۰µL اتانل ۱۰۰–۹۶ درصد به محتویات افزوده شد و ورتکس شد. سپس پلت همراه با ژنوم به‌کمک سانتریفوژ رسوب داده شد و با اتانل ۷۰ درصد شستشو داده شد. در نهایت پلت در ۱۰۰ µL آب حل شد و پس از سانتریفیوژ،µL ۱ از بخش سوپرناتانت برای PCR به‌کارگرفته شد.

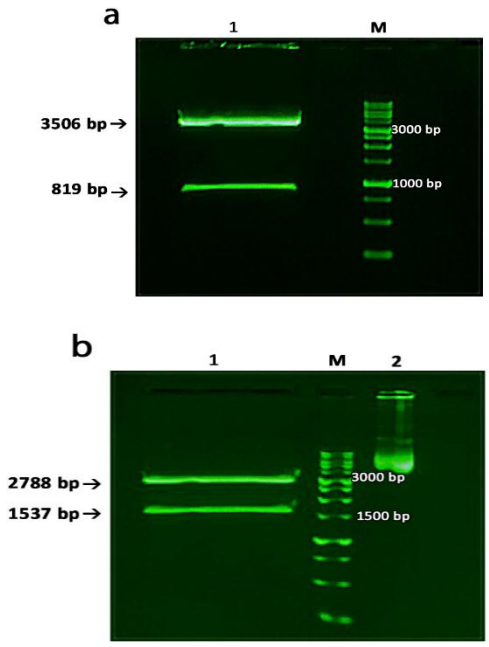
آنالیز سویه‌های ترانسفورم شده پیکیا پاستوریس توسط PCR. به‌منظور آنالیز حضور سازه ژنی pPICZαB-anti EpEX- scfv در کلونی‌های مقاوم به زئوسین از روش PCR استفاده شد. فرایند PCR با استفاده از سه جفت پرایمر انجام شد. در واکنش اول از دو پرایمر ریورس و فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv (GATGATGATGTGAGGAAAC-3 R: 5- و F: 5- GATATTCAAATGACCCAATCT-3) استفاده شد.

واکنش دوم با استفاده از دو پرایمر ریورس و فوروارد اختصاصی ژن (F: AOX1 5-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-R: 5- GCAAATGGCATTCTGACATCC-3) انجام شد و در واکنش سوم، پرایمر فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv و ریورس اختصاصی ژن AOX1 به‌کار گرفته شد. در تمام واکنش‌ها از سویه‌ی GS115 ترانسفورم شده با پلاسمید pPICZαB به عنوان کنترل منفی استفاده شد. به این گونه که در ۳۰ سیکل که هر سیکل شامل مراحل ۹۵ درجه برای ۵ دقیقه و ۵۱ درجه برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه انجام شد.

نتایج

ساخت سازه نوترکیب pPICZαB-anti EpEX-scfv

پس از ترانسفورم کردن سلول‌های مستعد DH5-α با محصول الحاق یا لیگاسیون pPICZαB وpGH-anti EpEX- scfv هضم آنزیمی شده با استفاده از دو آنزیم *XbaI* و *XhoI* و انجام کشت پلیت ۹ خانه از تک کلون‌های حاصل، محتوای پلاسمید تک کلون‌ها استخراج گردید. به‌منظور تأیید تشکیل پلاسمید نوترکیب، محصول استخراج با دو جفت آنزیم (*HindIII* و *BamHI*) هم‌چنین (*XhoI* و *XbaI*) مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. مشاهده دو قطعه به اندازه‌های ۲۷۸۸ و ۱۵۳۷ جفت باز در هضم توسط توسط جفت آنزیم *BamHI-HindIII* و مشاهده قطعاتی به طول ۳۵۰۶ و ۸۱۹ جفت باز در هضم توسط توسط جفت آنزیم *XbaI* و *XhoI* تأییدکننده تشکیل پلاسمید نوترکیب pPICZαB-anti EpEX-scfv است (شکل ۱).



شکل ۱- تأیید ساخت سازه نوترکیب pPICZαB-anti EpEX- scfv به روش هضم آنزیمی. a) مشاهده قطعاتی به طول ۳۵۰۶ و ۸۱۹ جفت باز در ستون ۱ ژل الکتروفورز ناشی از هضم آنزیمی توسط جفت آنزیم *XbaI* و *XhoI*، همچنین b) مشاهده دو نوار ۲۷۸۸ و ۱۵۳۷ جفت باز در ستون ۱ ژل الکتروفورز ناشی از هضم آنزیمی توسط جفت آنزیم *BamHI-HindIII* تأیید کننده صحت ساخت سازه نوترکیب می‌باشد. ستون M لدر ا کیلو جفت باز و نمونه هضم آنزیمی نشده در ستون ۲ مشاهده می‌شوند.

تعیین توالی پلاسمید نوترکیب با استفاده از پرایمرهای AOX-1 promoter و AOX-2 promoter نشان‌دهنده‌ی صحت سازه

www.SID.ir

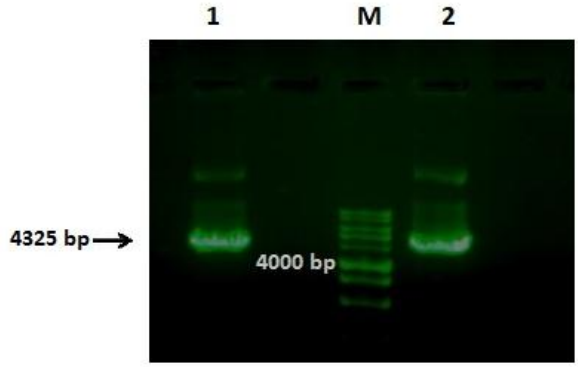
Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 11:48 +0330 on Monday November 11th 2019

ژنی از لحاظ ورود ژن، جهت صحت ورود ژن و عدم وجود جهش در توالی ژن بود.

ورود سازه نوترکیب pPICZαB-anti EpEX-scfv به مخمر *پیکیا پاستوریس* با استفاده از روش الکتروپوراسیون

مخلوط وکتور خطی شده‌ی pPICZαB-anti EpEX-scfv توسط آنزیم *SacI* (شکل ۲) و سلول‌ها در معرض پالس الکتریکی قرار گرفت و در نتیجه‌ی تشکیل منافذ موقتی در غشا سلولی، DNA به داخل سلول جذب شد. پس از گذشت ۳-۲ روز از کشت این مخلوط بر روی محیط کشت YPD آگار حاوی ۲۰۰µg/ml از آنتی‌بیوتیک زئوسین کلونی‌های حاصل مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۲- هضم سازه نوترکیب pPICZαB-anti EpEX- scfv با آنزیم *SacI* در این شکل ستون ۱ و ۲ نشانگر نمونه pPICZαB-anti EpEX- scfv خطی شده توسط آنزیم *SacI* با اندازه ۴۳۲۵ جفت باز و ستون M لدر ۱ کیلو جفت باز می‌باشند.

شکل ۳- ورود سازه نوترکیب pPICZαB-anti EpEX- scfv به مخمر *پیکیا پاستوریس* با استفاده از روش الکتروپوراسیون. مخلوط DNA و سلول‌ها در معرض پالس الکتریکی قرار گرفت و درنتیجه‌ی تشکیل منافذ موقتی در غشا سلولی، DNA به داخل سلول جذب شد. پس از گذشت ۳-۲ روز از کشت این مخلوط بر روی محیط کشت YPDS آگار حاوی ۲۰۰µg/ml از آنتی‌بیوتیک زئوسین کلونی‌های حاصل مشاهده شد.

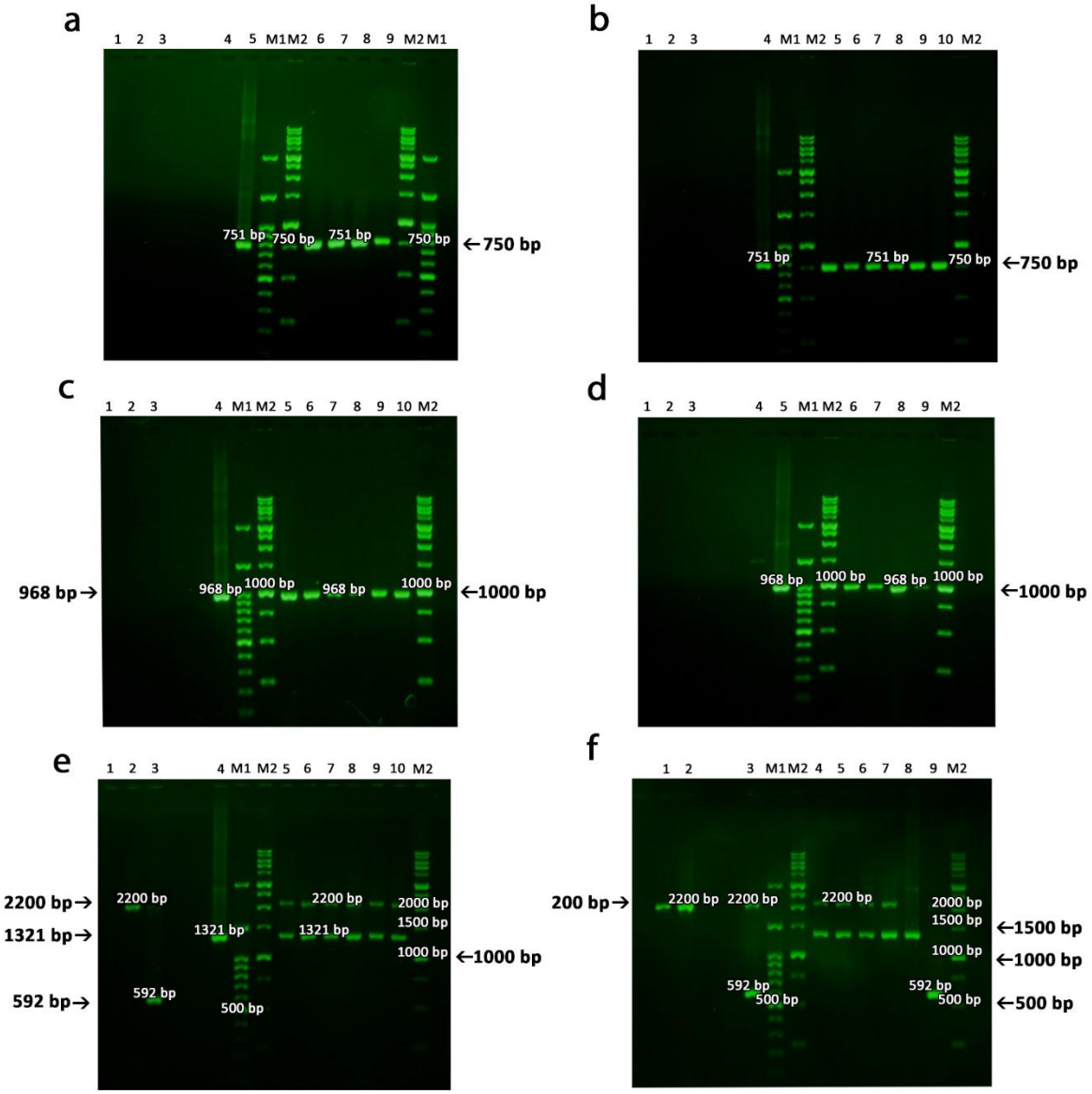
تأیید ورود حامل بیانی نوترکیب pPICZαB-anti EpEX- scfv به ژنوم مخمر با استفاده از روش PCR

در واکنش اول با استفاده از دو پرایمر ریورس و فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv ترنسفورمنت‌های مثبت با حضور قطعه تکثیر شده ۷۵۱ جفت باز تأیید شدند در حالی‌که هیچ قطعه تکثیریافته‌ای در ستون مربوط به کنترل منفی (ژنوم مخمر و ژنوم مخمر حاوی بخش اینتگره شده pPICZαB بدون قطعه ژنی وارد شده یا اینسرت) در الکتروفورز قابل مشاهده نبود (شکل ۴ a و b). نتایج حاصل از آنالیز PCR با استفاده از پرایمر فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv و ریورس اختصاصی ژن AOX1، نشان‌دهنده‌ی قطعه تکثیر شده ۹۶۸ جفت بازی در ترنسفورمنت‌ها است. در حالی‌که هیچ قطعه تکثیریافته‌ای در ستون مربوط به کنترل منفی (ژنوم مخمر و ژنوم مخمر حاوی بخش اینتگره شده pPICZαB بدون قطعه ژنی وارد شده) در الکتروفورز قابل مشاهده نبود. نتیجه حاصل از PCR با این جفت پرایمر نشان‌دهنده‌ی حضور ژن مورد نظر به‌صورت دست‌نخورده روی ژنوم مخمر است (شکل ۴ c و d). هم‌چنین واکنش PCR با استفاده از دو پرایمر ریورس و فوروارد اختصاصی ژن AOX1 منجر به تکثیر قطعات با اندازه‌های ۲۲۰۰ و ۱۳۲۱ جفت باز شد. از آن‌جائی‌که GS115 یک میزبان +mut است تکثیر ژنوم با استفاده از این جفت پرایمر منجر به تکثیر قطعه‌ی ۲۲۰۰ جفت بازی خواهد شد. هم‌چنین زمانی‌که ژنوم اینتگره شده با پلاسمید pPICZαB به‌عنوان الگو در واکنش PCR به‌کار می‌رود، باندهای ۲۲۰۰ و ۵۹۲ جفت باز به‌دست می‌آید که دلیل آن این است که فاصله این دو جایگاه اتصال پرایمر روی پلاسمیدی که اینتگره شده است ۵۹۲ نوکلئوتید است و در صورتی‌که قطعه ژنی وارد شده هم وارد این بخش شده باشد باندهای حاصله ۲۲۰۰ و اندازه مجموع قطعه ژنی وارد شده و ۵۹۲ که در این‌جا ۱۳۲۱ جفت باز است بر روی ژل الکتروفورز مشاهده می‌شود (شکل ۴ e و f). در تمام واکنش‌ها از سویه‌ی GS115 ترانسفورم شده با پلاسمید pPICZαB هم‌چنین سویه‌ی GS115 ترانسفورم نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد. علاوه بر آن پلاسمید pPICZαB همراه با قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 11:48 +0330 on Monday November 11th 2019



شکل ۴- تأیید ورود حامل بیانی نوترکیب pPICZαB-anti EpEX- scfv به ژنوم مخمر با استفاده از روش PCR. واکنش PCR با استفاده از دو پرایمر (a ریورس و فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv منجر به تکثیر قطعه با اندازه‌ی ۷۵۱ جفت باز (ستون ۷-۹) شد. ستون ۲ ژنوم مخمر و ستون ۳ و ۴ ژنوم مخمر به همراه pPICZαB (کنترل منفی)، ستون ۵ وکتور حاوی قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) (کنترل مثبت) می‌باشند. (b ریورس و فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv منجر به تکثیر قطعه با اندازه‌ی ۷۵۱ جفت باز (ستون ۵-۱۰) شد. ستون ۲ ژنوم مخمر و ستون ۳ ژنوم مخمر به همراه pPICZαB (کنترل منفی)، ستون ۴ وکتور حاوی قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) (کنترل مثبت) می‌باشند. (c پرایمر فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv و ریورس اختصاصی ژن AOX1 منجر به تکثیر قطعه با اندازه‌ی ۹۶۸ جفت باز (ستون ۱۰-۵) شد. ستون ۲ ژنوم مخمر و ستون ۳ ژنوم مخمر به همراه pPICZαB (کنترل منفی)، ستون ۴ وکتور حاوی قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) (کنترل مثبت) می‌باشند. (d پرایمر فوروارد اختصاصی قطعه‌ی ژنی مولد scfv و ریورس اختصاصی ژن *AOX1* منجر به تکثیر قطعه با اندازه‌ی ۹۶۸ جفت باز (ستون ۹-۶) شد. ستون ۲ ژنوم مخمر و ستون ۳ و ۴ ژنوم مخمر به همراه pPICZαB (کنترل منفی)، ستون ۵ وکتور حاوی قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) (کنترل مثبت) می‌باشند. (e ریورس و فوروارد اختصاصی ژن *AOX1* منجر به تکثیر قطعات با اندازه‌های ۲۲۰۰ و ۱۳۲۱ جفت باز (ستون ۵-۱۰) شد. ستون ۲ ژنوم مخمر و ستون ۳ ژنوم مخمر به همراه pPICZαB (کنترل منفی)، ستون ۴ وکتور حاوی قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) (کنترل مثبت) می‌باشند. (f ریورس و فوروارد اختصاصی ژن AOX1 منجر به تکثیر قطعات با اندازه‌های ۲۲۰۰ و ۱۳۲۱ جفت باز (ستون ۴-۷) شد. ستون ۱،۲ ژنوم مخمر و ستون ۳،۹ ژنوم مخمر به همراه pPICZαB (کنترل منفی)، ستون ۸ وکتور حاوی قطعه ژنی وارد شده (pPICZαB-anti EpEX- scfv) (کنترل مثبت) می‌باشند. ستون M1 شامل لدر ۱۰۰ جفت باز و ستون M2 لدر ۱ کیلو جفت باز می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

پیشرفت در طراحی سیستم‌های بیانی کارآمدتر برای تولید مقادیر بالای قطعات نوترکیب آنتی‌بادی با پتانسیل درمانی مناسب مقوله‌ای چالش‌برانگیز است [۱۳]. اگرچه تاکنون بسیاری از قطعات آنتی‌بادی به میزان بالا در *اشریشیاکلی* تولید شده‌اند، ولی گزارشاتی مبنی بر عدم توانایی این سیستم در بیان و تولید scfvهای مشخصی نیز منتشر شده است. مقاله‌ای که در سال ۱۹۹۵ منتشر شد، نشان داد که ویژگی‌های وابسته به توالی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 11:48 +0330 on Monday November 11th 2019

آمینواسیدی یک قطعه آنتی‌بادی نظیر سایز پروتئینی، کارآمدی تاخوردگی، پایداری، محلولیت و مقاومت به پروتئاز هم‌چنین سمیت پروتئین برای میزبان بیانی می‌توانند سطح واقعی بیان این پروتئین را تعیین کنند [۱۴]. با توجه به موارد فوق‌الذکر چنین می‌توان گفت که سیستم ایده‌آل بیانی برای هر scfv باید به طور جداگانه بررسی شود. مطالعات بسیاری نشان می‌دهند که *پیکیا پاستوریس* می‌تواند به‌عنوان میزبانی مناسب در بیان scfvهایی که بیان پایینی در *E.coli* دارند مطرح باشد. به عنوان مثال Krauss و همکاران نشان دادند که بازده تولید آنتی‌بادی انسانی با قطعات متغیر علیه CD22 در میزبان *E.coli* پایین است (۴۵µg/l) [۱۵]. و این بازده پایین نیاز به مقادیر بالای scfv برای کاربردهای درمانی و تشخیصی را تأمین نمی‌کند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت این پروتئین به میزان ۲۵ mg/l در میزبان بیانی *پیکیا* بیان شد. این قبیل مطالعات نشانگر موفقیت‌آمیز بودن سیستم بیانی *پیکیا پاستوریس* در بیان تعدادی از scfvها می‌باشد [۱۷،۱۶]. در این مطالعه به منظور افزایش سطح بیانی scfv مشتق شده از کلون D5MOCB4 علیه EpEX، پس از بهینه‌سازی کدونی بر اساس ترجیح کدونی مخمر متیلوتروف *پیکیا پاستوریس*، ژن مولد این قطعه‌ی آنتی‌بادی در وکتور بیانی pPICZαB همسانه‌سازی شد. سپس وکتور نوترکیب در سویه GS115 *پیکیا پاستوریس* ترانسفورم شد و کلون‌های نوترکیب بر اساس مقاومت به زئوسین جداسازی و تأیید شدند. هر چند scfv مشتق شده از کلون D5MOCB4 علیه EpEX تاکنون در سویه‌ی بیانی *اشریشیاکلی* بیان شده است. اما بازده تولید این پروتئین به‌صورت پری‌پلاسمیک در این میزبان بیانی به میزان ۱ mg/l گزارش شده است [۱۸]. که بر این اساس تولید ۱۰۰–۱۰mg آنتی‌بادی scfv برای موارد کاربردی متعدد دشوار خواهد بود. هم‌چنین از آن جهت که این پروتئین در *اشریشیاکلی* به‌صورت اجسام انکلوزیونی بیان شده است، نیاز به مراحل دناتوراسیون و شکل‌دهی مجدد وجود دارد (بر اساس نتایج منتشر نشده از همین گروه). هدف از این مطالعه ساخت سویه‌ای است که قادر باشد به‌منظور تأمین مقدار کافی از پروتئین scfv علیه EpEX برای مطالعات بیولوژیکی، این پروتئین را به مقدار بالا، به صورت محلول، فعال، با صرف هزینه پایین و بدون به‌کارگیری ترکیبات دناتوره‌کننده فراهم کند.

در این مطالعه از وکتور pPICZαB استفاده شده است. این وکتور دارای توالی سیگنال ترشحی فاکتور آلفاست که تاکنون با موفقیت منجر به بیان پروتئین‌های متعدد به‌صورت ترشحی در *پیکیا پاستوریس* شده است. به‌عنوان مثال رسپتور فاکتور رشد اپیدرمی انسانی– ۲ نوترکیب با کمک وکتور pPICZα با موفقیت در این میزبان به‌صورت ترشحی بیان شده است [۱۹]. هم‌چنین زارع و همکاران در سال ۲۰۱۴ موفق شدند با استفاده از وکتور pPICZα پروتئین scfv علیه CD22 را به میزان ۲۵mg/l به‌صورت ترشحی در *پیکیا* بیان کنند [۲۰]. به‌منظور تأیید ورود ژن به‌داخل ژنوم مخمر از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با کمک سه جفت پرایمر استفاده شد. مطابق با یافته‌های پیشین در صورت به‌کارگیری جفت پرایمر متصل‌شونده به ژن مولد الکل اکسیداز (AOX)، در مورد سویه‌هایی نظیر GS115 که +mutهستند انتظار داریم پس از الکتروفورز، باندهای ۲۲۰۰ و ۵۹۲ جفت باز در مورد حالت پایه (زمانی‌که پلاسمید pPICZαB بدون قطعه ژنی وارد شده ژن مورد نظر) مشاهده شود به‌دلیل آن‌که فاصله دو جایگاه اتصال پرایمر فوروارد و ریورس AOX روی پلاسمیدی که اینتگره شده است ۵۹۲ نوکلئوتید است. در صورتی‌که قطعه ژنی وارد شده هم وارد این بخش شده باشد باندهای حاصله ۲۲۰۰ و باندی مربوط به مجموع اندازه قطعه ژنی وارد شده و ۵۹۲ خواهد شد. مطابق با انتظار باندهای ۱۳۲۱ و ۲۲۰۰ جفت باز در مورد ژنوم حاوی پلاسمید همراه با ژن مولد پروتئین scfv مشاهده شد (شکل ۴ e و f). در مطالعه‌ای مشابه به‌منظور تأیید ورود ژن مولد scfv علیه CD22 بداخل ژنوم *پیکیا پاستوریس* سویه GS115 از این جفت پرایمر استفاده شد [۲۰]. هم‌چنین chan و همکاران در مطالعه انجام گرفته در سال ۲۰۱۸ به‌منظور تأیید ورود ژن مولد توپوایزومراز انسانی به‌داخل ژنوم سویه X33 که +mut است از همین جفت پرایمر استفاده کردند. نتایج الکتروفورز منتشر شده توسط این گروه حضور دو باند ۲۲۰۰ و ۲۳۰۰ جفت باز را تأیید کرد [۲۱]. در مطالعه حاضر هم‌چنین برای اطمینان از کامل بودن ژن مولد scfv اینتگره شده داخل ژنوم از جفت پرایمر اختصاصی ژن استفاده شد و به‌منظور اطمینان از قرارگیری صحیح قطعه ژنی موردنظر بر روی ژنوم از پرایمر فوروارد متصل شونده به ابتدای ژن موردنظر و پرایمر ریورس متصل‌شونده به ژن مولد AOX استفاده شد (شکل ۴ a-d). Tsai و همکاران نیز به منظور بررسی حضور ژن مولد پروتئین دی سولفید ایزومراز پلاسمودیوم فالسیپاروم در ژنوم *پیکیا پاستوریس* الکتروپوریت شده با وکتور pPICZA حاوی ژن مورد نظر از جفت پرایمر اختصاصی متصل‌شونده به ژن استفاده کردند [۲۲].

عوامل متعددی بر بیان ژن‌های هترولوگ در *پیکیا پاستوریس* مؤثر هستند از آن‌جمله می‌توان به ترجیح کدونی، محتوای بازهای ژن مورد نظر، محدودیت‌های موجود در سطح رونویسی و ترجمه اشاره کرد. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که بهینه‌سازی کدونی بر اساس ترجیح کدونی مخمر منجر به بیان بالا هم‌چنین افزایش فعالیت محصولات ژنی در *پیکیا پاستوریس* می‌شود [۲۳]. از همین رو در این مطالعه ابتدا ژن مولد بر اساس ترجیح کدونی مخمر بهینه شد. مشابه این مطالعه Liu و همکارانش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 11:48 +0330 on Monday November 11th 2019

با جایگزینی کدون‌های نادر با کدون‌های ترجیحی پیکیا *پاستوریس* توانستند در مقایسه با ژن بهینه نشده به بیان بالاتری از اینترلوکین ۲۵ در این میزبان برسند [۲۴]. در سال ۲۰۱۳ ژن مولد اندواینولیناز استخراج شده از *آسپرژیلوس* نایجر مطابق با ترجیح کدونی پیکیا *پاستوریس* بهینه شد و توسط He و همکارانش در کنار فرم اولیه در پیکیا بیان شد. نتایج نشان داد که فرم بهینه، پروتئین بیش‌تر با فعالیت بالاتری (حدود ۴،۱۸ برابر) را نسبت به فرم بهینه نشده ژن تولید می‌کند [۲۵]. شبیه این نتایج توسط Li و همکارانش که فرم اولیه و بهینه شده ژن مولد سیستاتین C انسانی را در مخمر پیکیا *پاستوریس* بیان کردند مشاهده شد. نتایج مطالعه Li نشان داد که بهینه‌سازی کدونی می‌تواند بیان پروتئین را ۳ تا ۵ برابر افزایش دهد [۲۶]. Hu و همکارانش گزارش کردند که افزایش میزان بیان به‌واسطه بهینه‌سازی کدونی بیش‌تر به‌دلیل تأثیر مثبت بر کارآمدی طویل‌سازی در مرحله ترجمه است تا اثر بر آغاز ترجمه. در مطالعه مذکور، آنالیز نورترن بلات نشان داد که سطح mRNA هنگام بیان پروتئین نوترکیب بین دو فرم اولیه و بهینه شده ژن یکسان است لذا بیان بالاتر، بیش‌تر می‌تواند ناشی از تسهیل مراحل پس از رونویسی باشد [۲۷]. این نتایج مطابق با یافته‌های آزمایشگاهی منتشر شده در مورد بیان در مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* بود. این یافته نشان می‌داد که میزان کدون‌های نادر ارتباط مستقیمی با کاهش پایداری mRNA و سرعت طویل‌سازی در مرحله ترجمه دارد [۲۸]. همسو با این نتایج، Yadava و Ockenhouse گزارش کردند که بهینه‌سازی کدونی منجر به افزایش بیان دمین F2 پروتئین EBA-175 در دو میزبان *اشریشیاکلی* و پیکیا *پاستوریس* می‌شود هر چند پروتئین بیان شده در پیکیا فعالیت بیولوژیکی بالاتری را نشان می‌دهد [۲۹].

یکی از مشکلات موجود در راستای استخراج سریع و کارآمد ژنوم مخمر حذف دیواره سلولی آن است. در روش‌های رایج از تخریب آنزیمی و یا بیدهای شیشه‌ای به منظور تخریب دیواره سلولی استفاده می‌شود. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ توسط Tsygankov و همکارانش انجام شد به‌منظور بررسی تأثیر بیان پروتئین دی سولفید ایزومراز بر بیان اینترفرون نوترکیب در پیکیا *پاستوریس*، جهت استخراج ژنوم از بیدهای شیشه‌ای و دستگاه Smash & Grab استفاده شد [۳۰]. این روش‌ها زمانگیر بوده و از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه نیستند و به‌کارگیری بیدها نیازمند حضور تجهیزاتی در آزمایشگاه است. Lõoke و همکارانش در سال ۲۰۱۱ پروتکلی را به‌منظور استخراج سریع و کم‌هزینه محتوای ژنومیک مخمر با استفاده از استات لیتیوم و SDS ارائه دادند. این روش نیازی به استفاده از آنزیم و یا دمای بالا هم‌چنین دستگاه آزمایشگاهی ندارد و در یک لوله آزمایش در زمان کوتاه ۱۵ دقیقه با قدرت استخراج بالا قابل انجام است. این روش قابلیت انجام در سویه‌های مختلف مخمری نظیر *هانسونلا پلی‌مرفیا*، *ساکارومایسس سرویزیه* و پیکیا *پاستوریس* را دارد [۱۲]. در مطالعه حاضر از این روش استفاده شد. مطابق با مطالعه ما، Mala و همکارانش نیز جهت استخراج ژنوم پیکیا *پاستوریس* حاوی ژن مولد قطعه تک‌زنجیره‌ای آنتی‌بادی علیه نورفلوکساسین از این روش استفاده کردند [۳۱].

به منظور افزایش سطح بیانی scfv مشتق شده از کلون D5MOCB4 علیه EpEX در این مطالعه سویه نوترکیب GS115 که حاوی ژن مولد این قطعه‌ی آنتی‌بادی در ژنوم خود می‌باشد ساخته شد و سویه ساخته شده با استفاده از روش PCR و سه جفت پرایمر مورد تأیید قرار گرفت. این سویه مهندسی شده را می‌توان در گام بعدی در بیان پروتئین anti-EpEX-scfv به عنوان انتخابی مناسب در زمینه‌ی ایمنی–درمانی سرطان به‌کار گرفت.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است. هم‌چنین کلیه مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دارویی این دانشکده انجام شده است.

منابع

[1] Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. Somat Cell Genet 1979; 5: 957-971.

[2] Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Prins F, et al. Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell–cell interactions mediated by classic cadherins. J Cell Biol 1997; 139: 1337-1348.

[3] Munz M, Fellinger K, Hofmann T, Schmitt B, Gires O. Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. Front Biosci 2008; 13: 5195-5201.

[4] Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee S-M, et al. Single-chain antigen-binding proteins. Science 1988; 242: 423-426.

[5] Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. Cancer Res 1992; 52: 3402-3408.

[6] Di Paolo C, Willuda J, Kubetzko S, Lauffer I, Tschudi D, Waibel R, et al. A recombinant immunotoxin derived from a humanized epithelial cell adhesion molecule-specific single-chain antibody fragment has potent and selective antitumor activity. Clin Cancer Res 2003; 9: 2837-2848.

[7] Frenzel A, Hust M, Schirrmann T. Expression of recombinant antibodies. Front Immunol 2013; 4: 217.

[8] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. Yeast 2005; 22: 249-270.

[9] Butler M, Meneses-Acosta A. Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. Appl Microbiol Biot 2012; 96: 885-894.

[10] Martínez JL, Liu L, Petranovic D, Nielsen J. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. Curr Opin Biotech 2012; 23: 965-971.

[11] Yousefian S, Dehnavi E, Borjian Burojeni M. Secretive expression of bacterial β-xylosidase gene including hexahistidin-tag in Pichia pastoris. Koomesh 2013; 14: 389-395. (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 11:48 +0330 on Monday November 11th 2019

disulfide isomerase affects expression, folding and O-linked glycosylation of a malaria vaccine candidate expressed in P. pastoris. J Biotechnol 2006; 121: 458-470.

[23] Qian P, Li X, Tong G, Chen HJVg. High-level expression of the ORF6 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Pichia pastoris. Virus Genes 2003; 27: 189-196.

[24] Liu Y, Wu C, Wang J, Mo W, Yu M. Codon optimization, expression, purification, and functional characterization of recombinant human IL-25 in Pichia pastoris. Appl Microbiol Biotechnol 2013; 97: 10349-10358.

[25] He M, Wu D, Wu J, Chen J. Enhanced expression of endoinulinase from Aspergillus niger by codon optimization in Pichia pastoris and its application in inulooligosaccharide production. J Ind Microbiol Biotechnol 2014; 41: 105-114.

[26] Li Y, Li D, Xu X, Cui M, Zhen H, Wang Q. Effect of codon optimization on expression levels of human cystatin C in Pichia pastoris. Genet Mol Res 2014; 13: 4990-5000.

[27] Hu S, Li L, Qiao J, Guo Y, Cheng L, Liu J. Codon optimization, expression, and characterization of an internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in Pichia pastoris. Protein Expres Purif 2006; 47: 249-257.

[28] Liu X, Wu D, Wu J, Chen J. Optimization of the production of Aspergillus niger α-glucosidase expressed in Pichia pastoris. World J Microb Biotechnol 2013; 29: 533-540.

[29] Yadava A, Ockenhouse CF. Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. Infect Immun 2003; 71: 4961-4969.

[30] Tsygankov M, Padkina MJ. Influence of PDI Gene Overexpression on the Production of Heterologous Proteins in Yeast Pichia pastoris. Russ J Genet 2018; 8: 197-205.

[31] Mala J, Puthong S, Maekawa H, Kaneko Y, Palaga T, Komolpis K, et al. Expression and characterization of functional single-chain variable fragment against norfloxacin in Pichia pastoris GS115. Int Food Res J 2018; 25: 1726-1732.

[12] Lõoke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. Biotechniques 2011; 50: 325-328.

[13] Malpiedi LP, Díaz CA, Nerli BB, Pessoa Jr A. Single-chain antibody fragments: Purification methodologies. Process Biochem 2013; 48: 1242-1251.

[14] Knappik A, Plückthun A. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. Protein Eng Des Sel 1995; 8: 81-89.

[15] Krauss J, Arndt MA, Martin AC, Liu H, Rybak SM. Specificity grafting of human antibody frameworks selected from a phage display library: generation of a highly stable humanized anti-CD22 single-chain Fv fragment. Protein Eng 2003; 16: 753-759.

[16] Tanfous NGB, Kallel H, Jarboui MA, Fathallah DM. Expression in Pichia pastoris of a recombinant scFv form of MAb 107, an anti human CD11b integrin antibody. Enzyme Microb Tech 2006; 38: 636-642.

[17] Emberson LM, Trivett AJ, Blower PJ, Nicholls PJ. Expression of an anti-CD33 single-chain antibody by Pichia pastoris. J Immunol Methods 2005; 305: 135-151.

[18] Willuda J, Honegger A, Waibel R, Schubiger PA, Stahel R, Zangemeister-Wittke U, et al. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. Cancer Res 1999; 59: 5758-5767.

[19] Foroumadi S, Rajabibazl M, Hosseini SH, Rajabi S, Shahidi S, Daraei A, et al. 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).

[20] Zarei N, Vaziri B, Shokrgozar MA, Mahdian R, Fazel R, Khalaj VJ, et al. High efficient expression of a functional humanized single-chain variable fragment (scFv) antibody against CD22 in Pichia pastoris. Appl Microbiol Biot 2014; 98: 10023-10039.

[21] Chan MK, Lim SK, Miswan N, Chew AL, Noordin R, Khoo BY, et al. Expression of stable and active human DNA topoisomerase I in pichia pastoris. Protein Expres Purif 2018; 141: 52-62.

[22] Tsai CW, Duggan PF, Shimp Jr RL, Miller LH, Narum DL. Overproduction of Pichia pastoris or Plasmodium falciparum protein

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 11:48 +0330 on Monday November 11th 2019

Volume 21, Issue 4 (Autumn 2019), 743-750

Construction of recombinant *Pichia pastoris* expressing single-chain antibody fragment against extracellular domain of EpCAM

Fatemeh Mohammadgholizad (Pharm.D Student), Atieh Hashemi (Ph.D)*
Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author. +98 21-88200067 at_hashemi@sbmu.ac.ir

Received: 2 Sep 2018; Accepted: 4 Mar 2019

Introduction*:* Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is highly expressed on epithelial tumors. So, EpCAM is a valuable antigen for targeted therapy. Using monoclonal antibodies (mabs) is an attractive approach for targeted cancer therapy. Importantly, limitations of intact mabs including large size led to the development of antibody fragments such as single chain fragment variable (scfv). *Pichia pastoris* is considered as a suitable host for large-scale production of recombinant proteins because of post-translation modification system and low cost. Here, the *Pichia* expressing a scfv against EpCAM extracellular domain (EpEX) was constructed.

Materials and Methods*:* The codon optimized gene encoding anti-EpEX-scfv protein was cloned in the *XhoI* and *XbaI* sites of the pPICZαB vector. The recombinant plasmid was confirmed by restriction enzyme analysis and sequencing. The constructed plasmid was integrated into GS115 strain by electroporation. Positive clones were evaluated by PCR using three sets of primers.

Results: Restriction enzyme analysis utilizing *Hind*III and *Bam*HI (2788, 1537 bp bands), as well as *XhoI*, *XbaI* (3506, 819 bp bands) confirmed construction of recombinant pPICZαB-anti EpEX- scfv. In this way, PCR based screening results of integrants showed two bands (2200 and 1321 bp), when AOX1 primer set was used as well as one band (968 bp) when the 3´ insert-specific primer paired with 5´ AOX1 primer. There was one band (751 bp) in PCR result of confirmed integrants when insert-specific primer set was utilized.

Conclusion: These findings imply that the engineered strain was constructed. The anti-EpEX-scfv protein can be used as a potential candidate in cancer immunotherapy.

Keywords*: Pichia pastoris*, Anti-EpEX-scfv, Monoclonal Antibodies, EpCAM, Cancer Immunotherapy.

www.SID.ir