DOI: 10.48305/jims.v41.i733.0736

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۳۳/هفته‌ی اول آبان ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱/۱۴ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۶ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۸/۷

بیان پری پلاسمیک یک دیابادی جدید برای هدف قرار دادن همزمان دو نقطه‌ی وارسی سیستم ایمنی PD-1 و CTLA-4

مهسا بهزادی[۱]، وجیهه اکبری[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: مطالعات بالینی نشان داده است که مصرف همزمان دو مهارکننده‌ی مختلف نقاط وارسی ایمنی، نیولومب و ایپیلیمومب، به صورت معنی‌داری ایمنی و کارآیی درمانی بهتری در مقایسه با مصرف هر کدام به تنهایی داشته است. دیابادی‌ها آنتی‌بادی‌های مهندسی شده با اختصاصیت دوگانه هستند که همزمان دو آنتی‌ژن مختلف را مورد هدف قرار می‌دهند و می‌توان آن‌ها را در سیستم بیان باکتریایی تولید کرد. هدف مطالعه‌ی حاضر، تولید یک دیابادی جدید برای هدف قرار دادن همزمان دو نقطه‌ی وارسی سیستم ایمنی در فضای پری پلاسم باکتری *اشرشیا کولای* بود.

روش‌ها: توالی آمینو اسید دیابادی بر اساس نواحی متغیر آنتی‌بادی‌های نیولومب و ایپیلیمومب طراحی شد و کد ژنتیکی آن برای بیان در سیستم باکتری بهینه‌سازی و بعد از ساخت شیمیایی در پلاسمید pET-22b وارد گردید. بیان پروتئین در باکتری *ای کولای* BL21 (DE3) در دماها و غلظت‌های مختلف القاگر انجام شد. بعد از استخراج پروتئین پری پلاسمیک، خالص‌سازی دیابادی با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج SDS-PAGE بیان پروتئین با وزن حدود ۵۵ کیلودالتون را تأیید کرد. بیشترین میزان پروتئین محلول در دمای ۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد و غلظت ۱ میلی‌مولار القاگر (IPTG) حاصل شد. پروتئین محلول بیان شده توسط کروماتوکرافی تمایلی با خلوص بالای ۹۰ درصد با موفقیت خالص‌سازی شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد که بهینه‌سازی شرایط بیان، می‌تواند منجر به بهبود بیان محلول پروتئین‌های مشابه در فضای پری پلاسمیک شود.

واژگان کلیدی: آنتی‌بادی؛ ایپیلیمومب؛ پری پلاسم؛ پروتئین‌های نقاط وارسی ایمنی؛ نیولومب

ارجاع: بهزادی مهسا، اکبری وجیهه. **بیان پری پلاسمیک یک دیابادی جدید برای هدف قرار دادن همزمان دو نقطه‌ی وارسی سیستم ایمنی PD-1 و CTLA-4**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۳۳): ۷۴۲-۷۳۶

مقدمه

اساس کار سیستم ایمنی بدن، بر پایه‌ی تشخیص سلول‌های خودی از بیگانه می‌باشد. برای این کار سلول‌های ایمنی از مولکول‌های سطحی خود که برای شروع یک پاسخ ایمنی نیاز به فعال‌سازی یا غیرفعال‌سازی دارند استفاده می‌کنند. به این مولکول‌های سطحی، نقاط وارسی ایمنی (Immune checkpoints) گفته می‌شود (۱). در حالت فیزیولوژیک، نقاط وارسی سبب بروز پاسخ‌های ایمنی مناسب و حفاظت از بافت‌های سالم در برابر حملات ایمنی می‌شوند. سلول های سرطانی گاهی از این نقاط وارسی استفاده کرده و از حمله‌ی سیستم ایمنی در امان می‌مانند اما داروهایی که این نقاط وارسی را هدف قرار می‌دهند، نتایج امیدبخشی در درمان سرطان در بالین داشته‌اند (۲). از جمله نقاط وارسی که مهار آن‌ها در بالین اثربخش بوده می‌توان به پروتئین ۱ مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Programmed cell death protein 1) PD-1 و پروتئین شماره ٤ مرتبط با لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک (Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) CTLA-4 اشاره کرد. مطالعات اخیر نشان داده است، مصرف همزمان دو آنتی‌بادی ضد PD-1 و CTLA-4، نیولومب (Nivolumab) و ایپیلیمومب (Ipilimumab)، می‌تواند اثربخشی بهتری در درمان برخی از سرطان‌ها از جمله ریه، ملانوما و کلیه داشته باشد (۳-۵).

۱- داروساز، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: وجیهه اکبری: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: v_akbari@pharm.mui.ac.ir

آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه (Bispecific antibody) یک راهکار جایگزین برای استفاده‌ی همزمان از دو آنتی‌بادی درمانی می‌باشد. این آنتی‌بادی‌ها معمولاً یک مولکول مهندسی شده‌ی هیبرید و ترکیبی از دو آنتی‌بادی بوده که همزمان دو آنتی ژن یا اپی توپ را هدف قرار می‌دهند (٦). استفاده از آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه در مقایسه با مصرف همزمان دو آنتی‌بادی، ایمنی بهتر و عوارض جانبی کمتری دارد. همچنین کارآیی درمانی این آنتی‌بادی‌های دوگانه بالاتر است چراکه می‌تواند به صورت همزمان چندین مسیر مهاری یا نقاط وارسی را مورد هدف قرار دهد (٧).

یکی از انواع آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه، دیابادی است (٨). دو دمین متصل شونده به آنتی ژن در دو طرف دیابادی باهم متفاوت هستند به طوری که آن را قادر به اتصال به دو سلول یا دو اپی‌توپ مختلف می‌سازد، در حالی که آنتی‌بادی‌های طبیعی فقط یک دامنه‌ی اتصال اختصاصی دارند (٦). به طور کلی ساختار کوچک‌تر دیابادی به عنوان یک مزیت برای نفوذپذیری به یک تومور جامد در نظر گرفته می‌شود (٩). همچنین دیابادی‌ها می‌توانند در باکتری‌ها مثل *اشرشیا کولای* به مقدار بالا تولید شوند (٩).

ای کولای سرعت رشد بی‌نظیری دارد که باعث می‌شود به راحتی به تراکم سلولی بالا دست یابد. این باکتری به راحتی ماده‌ی ژنتیک بیگانه را می‌پذیرد؛ علاوه بر این، ویژگی‌های ژنتیکی و مولکولی این گونه به خوبی شناخته شده است و میزان بیان پروتئین نوترکیب در این سیستم سلولی بسیار بالاست (١٠). با وجود مزایای ذکر شده برای سیستم بیانی *ای‌کولای* مشکلاتی نیز در ارتباط با تولید پروتئین نوترکیب از یک ژن خارجی کلون شده در این باکتری وجود دارد. شاید مهم‌ترین محدودیت ای‌کولای به عنوان یک سیستم بیان باکتریایی، تجمع پروتئین‌های خارجی، به ویژه پروتئین‌های پیچیده، به صورت اجسام نامحلول یا انکلوژنی (Inclusion body) باشد (١١). تشکیل اجسام انکلوژنی به عوامل متعددی مانند طبیعت پروتئین نوترکیب، سرعت بیان پروتئین، غلظت واسطه‌های تاخوردگی، ویسکوزیته و دمای محیط تا خوردن پروتئین، بستگی دارد. اجسام انکلوژنی مولکول‌های نامحلول و فاقد فعالیت زیستی هستند، در حالی که پروتئین های فعال، خالص و محلول در بیوتکنولوژی مدنظر است (١٢).

بیان پروتئین در فضای پری پلاسم باکتری‌های گرم منفی از جمله *ای‌کولای*، یکی از راه‌های رایج برای جلوگیری از ایجاد اجسام انکلوژنی است.

در اغلب موارد، بیان پروتئین هدف در پری پلاسم، باعث تسهیل تاخوردگی و افزایش پایداری شده و در نتیجه، پروتئین به صورت محلول و کارآمد تولید می‌گردد (١٣). محیط پری پلاسم نسبت به سیتوپلاسم اکسایندهتر است و به تشکیل پیوندهای دی سولفیدی کمک می‌نماید (١٤).

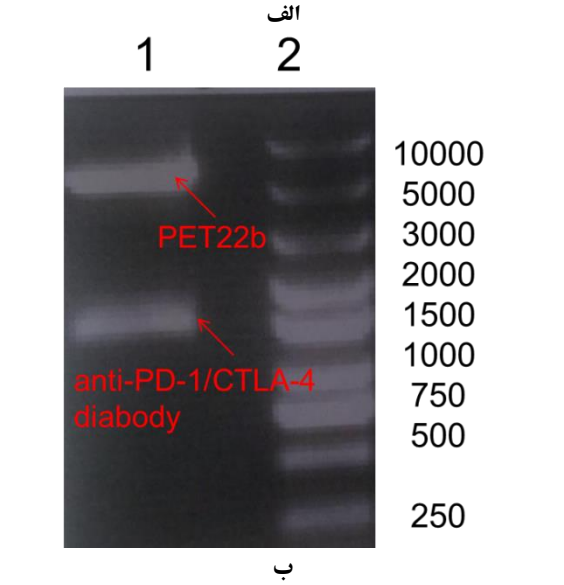
هدف این مطالعه، بهینه‌سازی تولید محلول یک دیابادی جدید برای هدف قرار دادن همزمان دو نقطه‌ی وارسی سیستم ایمنی در فضای پری پلاسم باکتری *ای کولای* بود. بهینه‌سازی شرایط کشت (دما و غلظت القاگر) برای افزایش بازده بیان محلول پروتئین انجام شد.

روش‌ها

طراحی و ساخت ژن: توالی آمینو اسید دیابادی بر اساس توالی آمینواسیدی ناحیه‌ی متغیر زنجیره سبک (VL) و سنگین (VH) آنتی‌بادی نیولومب (A) و ایپیلیمومب (B) طراحی شد. دو تک زنجیره VH_A-VL_B و VH_B-VL_A که هر کدام شامل دمین VH از یک آنتی‌بادی که توسط یک اتصال‌دهنده‌ی کوتاه هیدروفیل به دمین VL از آنتی‌بادی دیگر متصل شده می‌باشند، به‌وسیله‌ی یک لینکرهیدروفیل ١٥ آمینواسیدی به یکدیگر وصل شدند (VH_A-$linker_{G4S}$-VL_B-$linker_{(G4S)4}$-VH_B-$linker_{G4S}$-VL_A). توالی نوکلئیک اسید ژن دیابادی بر اساس الگوی به کارگیری کدون در میزبان باکتری *ای کولای* بهینه‌سازی شد (سایت Genscript). یک توالی شش‌تایی هیستیدینی به عنوان برچسب شناسایی و خالص‌سازی در انتهای کربوکسیل پروتئین قرار گرفت. بعد از سنتز شیمیایی ژن مربوطه (شرکت Biomatik، کانادا)، این ساختار توسط آنزیم‌های محدودالاثر *Nco*I و *Xho*I درون حامل pET22b توسط شرکت Biomatik کلون گردید (شکل ١.الف). این وکتور حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و پپتید پیام ترشح به پری پلاسم pelB می‌باشد.

ترانسفورم حامل نوترکیب و بیان دیابادی در ای کولای BL21(DE3): حامل نوترکیب توسط روش شوک حرارتی وارد سلول‌های پذیرای سویه BL21(DE3) گردید. کلونی‌های مثبت بر روی پلیت (Luria-Bertani) LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک (آمپی‌سلین) غربال‌گری شد. یک کلونی مثبت از پلیت برداشته شده و محیط کشت مایع LB حاوی ١٠٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین اضافه شد. این مخلوط یک شب در دمای ٣٧ درجه‌ی سانتی‌گراد در شیکر-انکوباتور با دور ١٨٠ دور در دقیقه قرار گرفت. از این کشت شبانه به عنوان مایه تلقیح، محیط LB مایع تازه با نسبت ١ به ١٠ استفاده شد. مخلوط حاصل تا به تراکم سلولی (OD_{600} (Optical density at 600 nm)) بین ٠/٦ تا ٠/٨) مطلوب برسد انکوبه شد. سپس القای بیان پروتئین با افزودن القاگر IPTG (opropyl β-D-2-thiogalactopyranoside) با غلظت ١میلی‌مولار، انجام گرفت. نمونه به شیکر- انکوباتور برگردانده و حدود ٣ ساعت در دمای ٣٧ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. نمونه به

مـدت ۱۰ دقیقـه بـا دور g ٤۰۰۰ در دمـای ٤ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد سانتریفیوژ شد و رسوب باکتریایی جمع‌آوری گردید.



شکل ۱. الف) آنالیز هضم آنزیمی پلاسمید حاوی ژن دیابادی. (۱) پلاسمید pET22b-anti-PD-1/CTLA-4-diabody هضم شده با آنزیم‌های محدودالاثر *Nco*I و *Xho*I و (۲) نشانگر DNA ب) ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد نمونه‌های بیان دیابادی در باکتری BL21(DE3) با اضافه کردن ۱ میلی‌مولار IPTG در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد. (۱) نشانگر پروتئینی (Thermo Scientific, #26614)، پروتئین تام سلولی باکتری ترانسفرم شده توسط پلاسمید نوترکیب قبل از القا (۲)، یک (۳)، دو (٤)، سه (۵) و چهار (٦) ساعت بعد از القا، (۷) پروتئین تام سلولی باکتری فاقد پلاسمید، ٤ساعت بعد از القا. میلی‌مولار (پروتئین مورد نظر با فلش مشخص شده است).

بهینه‌سازی شرایط بیان پروتئین محلول: جهت بهینه‌سازی تولید محلول دیابادی در فضای پری پلاسم بیان پروتئین با غلظت‌های مختلف IPTG (۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) در دماهای ۳۷، ۳۰، ۲۳ و ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳، ٤/۵، ۱٦ و ۱۸ ساعت القا شد.

استخراج پروتئین دیابادی از پری پلاسم و خالص‌سازی آن: بعد از بیان پروتئین و جداسازی پلت باکتریایی از محیط کشت؛ در دو مرحله پروتئین مورد نظر از فضای پری پلاسم استخراج شدند: در مرحله‌ی اول، شوک هایپرتونیک با افزودن بافر سرد هایپرتونیک (۲۰ ٪ سوکروز، ۵۰ میلی مولار تریس هیدروکلراید، ۱ میلی‌مولار EDTA، pH ۸) به رسوب و پراکنده کردن آن‌ها انجام می‌شود. سوپانسیون حاصل به مدت ٤۵ دقیقه روی یخ انکوبه و تکان داده می‌شود. سپس با استفاده از سانتریفیوژ محلول رویی (۱) و سلول‌ها از هم جدا می‌شوند. در مرحله‌ی دوم، شوک هایپوتونیک با افزودن بافر سرد هایپوتونیک حاوی ۵ میلی‌مولار منیزیم سولفات به رسوبطها و پراکنده کردن آن‌ها انجام شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه و تکان داده می‌شود. سپس با استفاده از سانتریفیوژ سوپرناتانت (۲) و سلول‌ها از هم جدا می‌شوند. پروتئین استخراج شده در محلول رویی ۱ و ۲ قرار دارد.

محلول رویی ۱ و ۲ باهم مخلوط شده و جهت خالص‌سازی با ستون حاوی رزین Ni-NTA agarose (شرکت Invitrogen، آمریکا) استفاده شد. ستون ابتدا با native binding buffer و سپس با native wash buffer شسته شد. و در نهایت با گرادیانت افزایشی غلظت ایمیدازول (۲۰۰–٤۰۰ میلی‌مولار) در Native elution buffer از ستون خارج گردید.

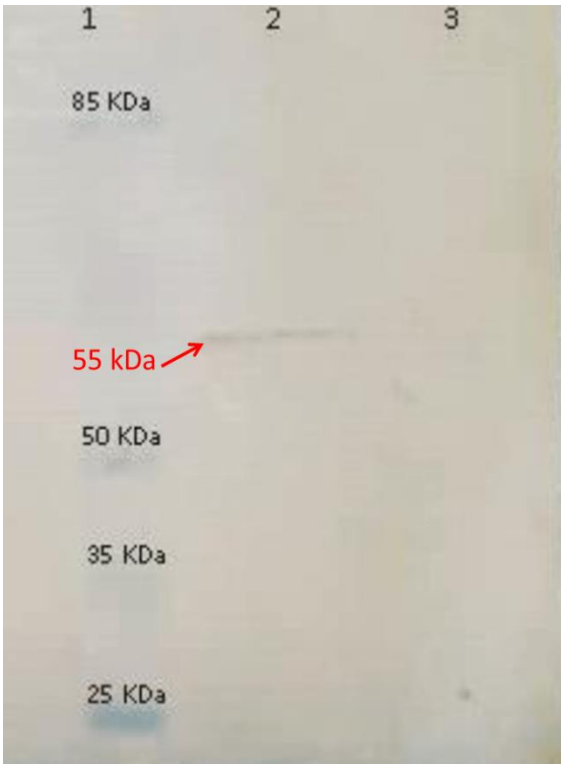
آنالیز نمونه‌ها: نمونه‌های پروتئینی توسط روش ژل الکتروفرز سدیم دودسیل سولفات–پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) بررسی شدند. همچنین روش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد برچسب هیستیدینی برای تأیید پروتئین به کار گرفته شد.

یافته‌ها

بیان دیابادی: جهت تأیید بیان پروتئین، نمونه‌های قبل از القا و ۱، ۲، ۳ و ٤ ساعت بعد از القا، جمع‌آوری و نمونه‌ها بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE بررسی شدند (شکل ۱.ب). در شکل نشان می‌دهد که پروتئین هدف با موفقیت در سلول های ترانسفرم شده بیان گردید و میزان بیان، با افزایش مدت زمان القا، بیشتر می گردد. در عین حال، پیش از افزودن القاگر، بیان این پروتئین دیده نمی شود که این مشاهده حاکی از عدم بیان نشت‌پذیر می‌باشد. همچنین در سلول‌هایی که ترانسفرم نشده‌اند، بعد از القا، بیان پروتئین دیده نمی‌شود. آنالیز وسترن بلات هم بیان پروتئین با وزن ۵۵ کیلو دالتون واجد برچسب هیستیدینی را تأیید کرد (شکل ۲).

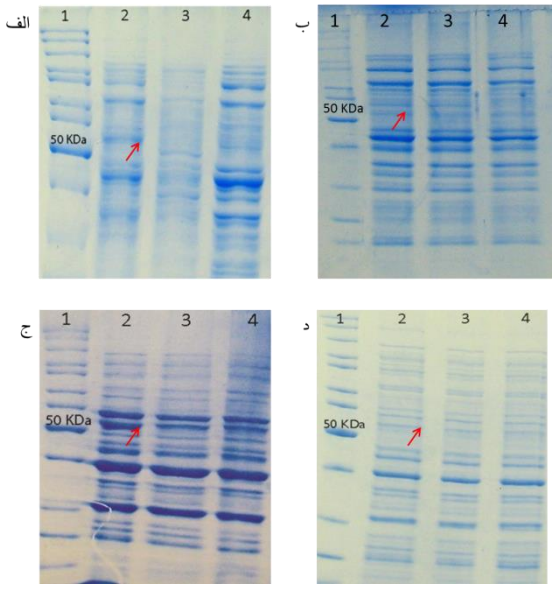
بهینه‌سازی شرایط بیان: بیان پروتئین با غلظت‌های متفاوت IPTG در دماهای مختلف انجام شد (شکل ۳: دمای ۳۷ (الف)، ۳۰ (ب)، ۲۳ (ج) و ۱۵ (د) درجه‌ی سانتی‌گراد) و بعد از استخراج

پروتئین از فضای پری پلاسم با شوک اسموزی نمونه محلول رویی ۱ و ۲ بررسی شد. بیشترین پروتئین در محلول رویی ۱ استخراج شده بود و میزان پروتئین در محلول رویی ۲ ناچیز بود (نتایج نشان داده نشده است). بر اساس آنالیز SDS-PAGE محلول رویی ۱ (شکل ۳) بیشترین میزان بیان پروتئین محلول در پری پلاسم در دما ۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد و با غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG بدست آمد (شکل ۳. ج). بیشترین میزان بیان پروتئین نامحلول در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و با غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG بود (نتایج نشان داده نشده است).



شکل ۲. آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد برچسب هیستیدنی: (۱) نشانگر پروتئینی (SeeBlue® Pre-Stained, Invitrogen) مارکر، (۲) و (۳) پروتئین تام سلولی باکتری ترانسفورم توسط پلاسمید به ترتیب بعد از القای بیان پروتئین توسط ۱ میلی‌مولار IPTG در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و قبل از القا (پروتئین مورد نظر با فلش مشخص شده است).

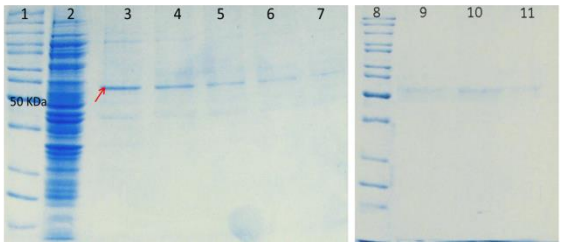
خالص‌سازی: پروتئین محلول استخراج شده از پری‌پلاسم توسط ستون کروماتوگرافی نیکل تخلیص شد (شکل ٤). همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، میزان پروتئین هدف، در نمونه‌های شستشو بسیار ناچیز بود. در فراکسیون‌های الوشن، دیابادی تا حد بسیار زیادی و با خلوص بالای ۹۰ درصد خالص شده است. فراکسیون اول که با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار ایمدازول جدا شده، بیشترین غلظت و خلوص پروتئین را داشته است.



شکل ۳. ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد نمونه‌های استخراج شده از پری پلاسم در دمای ۳۷ (الف)، ۳۰ (ب)، ۲۳ (ج) و ۱۵ (د) درجه‌ی سانتی‌گراد. (۱) نشانگر پروتئینی (Thermo Scientific, #26614)، (۲)، (۳) و (٤) به ترتیب نمونه‌های استخراج شده توسط بافر هایپرتونیک (محلول رویی ۱) از بیان دیابادی با غلظت ۱، ۰/۵ و ۰/۱ میلی مولار IPTG. (پروتئین مورد نظر با فلش مشخص شده است).

بحث

تاکنون، چندین آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه توسط FDA (Food and Drug Administration) مورد تأیید قرار گرفته است و بیش از ٤٠ آنتی‌بادی در مراحل کارآزمایی بالینی قرار دارد (۱۵).



شکل ٤. ژل SDS-PAGE 12 درصد نمونه‌های تخلیص. (۱) نشانگر پروتئینی (Thermo Scientific, #26614، 2) نمونه عبور کرده از ستون، (۳) فراکسیون اول (۲۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول)، (٤) فراکسیون دوم (۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول)، (۵) فراکسیون سوم (۳۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول)، (٦) فراکسیون چهارم (٤۰۰ میلی‌مولار ایمیدازول)، (۷) شستشو چهارم (۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول)، (۸) نشانگر پروتئینی، (۹) شستشو سوم (۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول)، (۱۰) شستشو دوم (۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول)، (۱۱) شستشو اول (۲۰ میلی مولار ایمیدازول). (پروتئین خالص شده با فلش مشخص شده است).

در مورد هدف قرار دادن هم زمان نقاط وارسی PD-1 و CTLA-4 هم چندین فرمت آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه پیشنهاد شده است که یکی از آن‌ها کادونیلیمب (Cadonilimab) در کشور چین تأیید شده است و برخی از آن‌ها در حال گذراندن مراحل کارآزمایی بالینی هستند. کادونیلیمب، به عنوان یک تترا بادی جدید طراحی شده است که در آن دمین VH و VL آنتی‌بادی ضد CTLA-4 یک اتصال C ترمینال با زنجیره‌های سنگین آنتی‌بادی ضد PD-1 ایجاد می‌کند (۱۶). در مثال دیگر، XmAb20717، یک آنتی‌بادی با اختصاصیت دوگانه ضد PD-1/CTLA-4 در فرمت شبه IgG است که بخش Fc آن طوری مهندسی شده که برهمکنش‌های مربوط به گیرنده‌ی گامای Fc حذف شود و در نتیجه واکنش‌هایی مثل سمیت سلولی وابسته به آنتی‌بادی (Antibody-dependent cellular cytotoxicity) ADCC کاهش یابد. همچنین برهمکنش با گیرنده‌ی Fc نوزادی یا FcRn افزایش یافته تا نیمه‌ی عمر آنتی بادی در پلاسما بیشتر شود. این آنتی‌بادی درحال گذراندن مراحل کارآزمایی فاز دو می‌باشد (۱۷).

در مطالعه‌ی حاضر یک دیابادی (ساختار غیر شبه IgG) ضد PD-1/CTLA-4 طرحی و تولید شد که با توجه به عدم وجود بخش Fc امکان تولید در سیستم باکتریایی را دارد. استفاده از میزبان باکتریایی با وجود مزایای ارزان و راحت بودن تولید، با چالش تولید پروتئین محلول و عملکردی روبرو است. پروتئین تولید شده در مطالعه‌ی حاضر دارای وزن مولکولی تقریبی ۵۵ کیلودالتون و pH ایزوالکتریک ۸/۸ می‌باشد. این ملکول واجد ٤ باند دی‌سولفیدی است.

سیستم بیان پری پلاسم نسبت به سیتوپلایم دارای مزایایی می‌باشد. میزان پروتئازهای موجود در پریپلاسم و در نتیجه احتمال تخریب پروتئین خارجی، کمتر است. پروتئین‌های باکتریایی کمی در آن فضا ترشح می‌شوند و بنابرین پروتئین هدف بیان شده در پریپلاسم خالص‌تر می‌باشد و فرایندهای پایین‌دستی آسان‌تری دارد. علاوه بر این، پریپلاسم غنی از چاپرون‌ها (مانند SKp) و پروتئین‌هایی است که به تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی و تا خوردن در نتیجه بیان محلول پروتئین‌های هدف کمک می‌کنند (مانند DsbA، PDI و Dsb) (۱۸). هر چند این سیستم بیانی در مقایسه با سیتوپلاسم، بازده پایین‌تری در تولید پروتئین دارد (۱۹). برای بهبود بازده و بازیابی پروتئین هدف، مراحل مختلف کشت و خالص‌سازی بایستی بهینه‌سازی شود (۲۰).

در این مطالعه بیان محلول دیابادی در پری‌پلاسم با بهینه‌سازی غلظت القاگر و دما بهبود پیدا کرد. اثر غلظت IPTG در گستره‌ی ۰/۱-۱ میلی‌مولار بر روی بیان محلول زیاد نبود. مشابه مطالعه‌ی ما، گروه تحقیقاتی دیگری گزارش کرده‌اند که غلظت IPTG در این گستره، اثر معنی‌داری بر بیان محلول آنتی‌بادی scFv ضد EGFRvIII نداشت. هر چند غلظت‌های پایین‌تر القاگر در گستره‌ی ۰/۰۱-۰/۱ میلی‌مولار باعث افزایش ۲ تا ۱۰ برابری ترشح پروتئین محلول به فضای پری پلاسم شد (۲۱).

نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد که بیان در دمای ۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد باعث بهبود قابل توجه بیان محلول پروتئین دیابادی می‌شود. هم‌سو با نتایج ما، مطالعه‌ی دیگری گزارش کرده‌اند که بیان محلول پریپلاسمیک قطعه Fab آنتی‌بادی 3H6 در دماهای کشت زیر ۳۰ درجه افزایش می‌یابد (۲۲).

کاهش دما باعث کاهش سرعت تولید پروتئین‌ها و واکنش‌های سلولی می‌شود. به نظر می‌رسد کاهش سرعت بیان پروتئین نوترکیب، می‌تواند بار متابولیکی سلول را کاهش داده و منجر به بهبود فرایند تاخوردگی شود؛ تعداد کمتر پلی‌پپتید ساخته شده در هر سلول، به ماشین سلولی اجازه می‌دهد دقیق‌تر کار کرده و تاخوردگی صحیح‌تری ایجاد نماید (۲۳). این شرایط، از تجمع پلی‌پپتیدهای تانخورده که تمایل به گردهم‌آیی داشته و می‌توانند یک اثر سمی ایجاد کنند، جلوگیری می‌کند. بنابراین، کنترل دقیق سرعت بیان پروتئین نوترکیب، برای محدود کردن بار متابولیکی و ایجاد سمیت سلولی، حیاتی است (۲٤).

با وجود اینکه کاهش دما باعث بهبود بیان محلول دیابادی در پری پلاسم شده است اما همچنان میزان بازده بیان پایین‌تری نسبت به بیان در فضای سیتوپلاسم دارد. این امر می‌تواند محدود به ظرفیت انتقال پروتئین به فضای پری پلاسم باشد یا کارآیی کم پپتید پیام در انتقال پروتئین باشد. استفاده از سایر پپتیدهای پیام مثل MalE, OmpA, PhoA, DsbA ممکن است منجر به افزایش بیان شود. همچنین استفاده از سویه‌هایی مانند ShuffleT7 و Origami می‌تواند به افزایش بیان محلول منجر شود.

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن نتایج مطالعه‌ی حاضر، ژن دیابادی با موفقیت در فضای پری پلاسم باکتری *ای کولای* BL21(DE3) بیان گردید و پروتئین محلول با روش کروماتوگرافی تمایلی نیکل خالص‌سازی شد. می‌توان گفت متغیرهای مورد بررسی (دما و غلظت القاگر)، تأثیر متوسطی بر افزایش بیان محلول پروتئین در پری پلاسم داشتند. در مطالعات آینده، بیان هم زمان چاپرون‌های مولکولی و استفاده از سویه‌های دستکاری شده، مانند، Origami (DE3) می‌تواند برای دستیابی به بیان محلول بالاتر، به کار گرفته شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایانامه‌ی داروسازی عمومی با کد علمی ۳۹۸۱۰۳۲

مـی‌باشـد. از سـرکار خـانم مـوذن کارشـناس محتـرم آزمایشـگاه بیوتکنولوژی که در انجام گرفتن این پایانامه ما را یاری کرده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Zhang Y, Zheng J. Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion. Adv Exp Med Biol 2020; 1248: 201-26.
2. Marin-Acevedo JA, Kimbrough EO, Lou Y. Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. J Hematol Oncol 2021; 14(1): 45.
3. Li Z, Lu S. Who should receive the chemotherapy-free combination of nivolumab plus ipilimumab as the first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer? J Clinic Oncol 2023; 41(6): 1172-5.
4. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. N Engl J Med 2015; 373(1): 23-34.
5. Ready NE, Ott PA, Hellmann MD, Zugazagoitia J, Hann CL, de Braud F, et al. Nivolumab monotherapy and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small cell lung cancer: results from the CheckMate 032 randomized cohort. J Thorac Oncol 2020; 15(3): 426-35.
6. Esfandiari A, Cassidy S, Webster RM. Bispecific antibodies in oncology. Nat Rev Drug Discov 2022; 21: 411-2.
7. Torres ETR, Emens LA. Emerging combination immunotherapy strategies for breast cancer: dual immune checkpoint modulation, antibody-drug conjugates and bispecific antibodies. Breast Cancer Res Treat 2022; 191(2): 291-302.
8. Lu D, Jimenez X, Witte L, Zhu Z. The effect of variable domain orientation and arrangement on the antigen-binding activity of a recombinant human bispecific diabody. Biochem Biophys Res Commun 2004; 318(2): 507-13.
9. Liguori L, Polcaro G, Nigro A, Conti V, Sellitto C, Perri F, et al. Bispecific antibodies: A novel approach for the treatment of solid tumors. Pharmaceutics 2022; 14(11): 2442.
10. Sandomenico A, Sivaccumar JP, Ruvo M. Evolution of escherichia coli expression system in producing antibody recombinant fragments. Int J Mol Sci 2020; 21(17): 6324.
11. Singhvi P, Saneja A, Srichandan S, Panda AK. Bacterial inclusion bodies: A treasure trove of bioactive proteins. Trends Biotechnol 2020; 38(5): 474-86.
12. Singhvi P, Saneja A, Srichandan S, Panda AK. Bacterial inclusion bodies: A treasure trove of bioactive proteins. Trends Biotechnol 2020; 38(5): 474-486.
13. Malik A. Protein fusion tags for efficient expression and purification of recombinant proteins in the periplasmic space of E. coli. 3 Biotech. 2016; 6(1): 44.
14. Manta B, Boyd D, Berkmen M. Disulfide bond formation in the periplasm of Escherichia coli. EcoSal Plus 2019; 8(2).
15. Syed YY. Amivantamab: first approval. Drugs 2021; 81(11): 1349-53.
16. Lyu X, Zhao Q, Hui J, Wang T, Lin M, Wang K, et al. The global landscape of approved antibody therapies. Antib Ther 2022; 5(4): 233-57.
17. Keam SJ. Cadonilimab: First Approval. Drugs. 2022; 82(12): 1333-9.
18. Shum E, Daud A, Reilley M, Najjar Y, Thompson J, Baranda J, et al. 407 Preliminary safety, pharmacokinetics/pharmacodynamics, and antitumor activity of XmAb20717, a PD-1 x CTLA-4 bispecific antibody, in patients with advanced solid tumors. J Immunother Cancer 2020; 8(Suppl 3): A247-A8.
19. Mirzadeh K, Shilling PJ, Elfageih R, Cumming AJ, Cui HL, Rennig M, et al. Increased production of periplasmic proteins in Escherichia coli by directed evolution of the translation initiation region. Microb Cell Fact 2020; 19(1): 85.
20. Ayat H, Darvishi O, Moazeni E, Momeni Bidezard A. Comparison of periplasmic and cytoplasmic expression of bovine enterokinase light Chain in E. coli. Protein J 2022; 41(1): 157-65.
21. Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in E. coli. Curr Protoc Protein Sci 2010; Chapter 5(1): 5.24.1-5.24.29.
22. Dewi KS, Retnoningrum DS, Riani C, Fuad AM. Construction and periplasmic expression of the anti-EGFRvIII ScFv antibody gene in Escherichia coli. Sci Pharm 2016; 84: 141-52.
23. Luo M, Zhao M, Cagliero C, Jiang H, Xie Y, Zhu J, et al. A general platform for efficient extracellular expression and purification of Fab from Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol 2019; 103(8): 3341-53.
24. Rodríguez-Carmona E, Cano-Garrido O, Dragosits M, Maurer M, Mader A, Kunert R, et al. Recombinant fab expression and secretion in Escherichia coli continuous culture at medium cell densities: Influence of temperature. Process Biochem 2012; 47: 446-52.
25. Kim SJ, Ha GS, Lee G, Lim SI, Lee CM, Yang YH, et al. Enhanced expression of soluble antibody fragments by low-temperature and overdosing with a nitrogen source. Enzyme Microb Thechnol 2018; 115: 9-15.

DOI: *10.48305/jims.v41.i733.0736*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 733, 1st Week, November 2023**

Received: 03.04.2023 Accepted: 28.09.2023 Published: 29.10.2023

Periplasmic Expression of a Novel Diabody for Co-Targeting Two Immune Checkpoints, PD-1 and CTLA-4

Mahsa Behzadi[1], Vajihe Akbari[2]

Original Article

Abstract

Background: Clinical studies have shown that the simultaneous use of two different immune checkpoint inhibitors, nivolumab and ipilimumab, has significantly improved the safety and efficacy compared to using each one alone. Diabodies are engineered antibodies with dual specificity that simultaneously target two different antigens and can be produced in bacterial expression systems. The present study aimed to produce a novel diabody to simultaneously target two immune checkpoints in the periplasmic space of *Escherichia coli*.

Methods: The amino acid sequence of diabody was designed based on the variable regions of nivolumab and ipilimumab antibodies; its genetic code was optimized for expression in the bacterial system and after chemical synthesis, the gene was ligated into pET-22b plasmid. Protein expression was performed in *E. coli* BL21 (DE3) at different temperatures and with different inducer concentrations. After periplasmic protein extraction, the diabody purification was carried out using nickel affinity chromatography.

Findings: SDS-PAGE results confirmed a protein's expression with a molecular weight of approximately 55 kilodaltons. The highest amount of soluble protein was obtained with 1 mM IPTG (the inducer) and at 23 °C. The expressed soluble protein was successfully purified by affinity chromatography with a purity of about 90%.

Conclusion: Our results indicated that optimization of culture conditions can lead to improvement of soluble expression of similar proteins in the periplasmic space.

Keywords: Antibody; Immune checkpoint proteins; Ipilimumab; Nivolumab; Periplasm

Citation: Behzadi M, Akbari V. **Periplasmic Expression of a Novel Diabody for Co-Targeting Two Immune Checkpoints, PD-1 and CTLA-4.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(733): 736-42.

1- Pharmacist, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Vajihe Akbari, Associate Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: v_akbari@pharm.mui.ac.ir